



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**LABORATORIO DE FISIOPATOLOGÍA CARDIOVASCULAR**

**“EFECTO DE LA DIABETES MELLITUS TIPO 1 EXPERIMENTAL EN LA  
CORRIENTE DE POTASIO TRANSITORIA DE SALIDA ( $I_{to}$ ) EN EL NODO  
SENOAURICULAR DE RATÓN”**

**TESIS QUE PARA OBTENER  
EL TÍTULO DE MAESTRO EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**Biol. Ana Laura López Serrano**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D. en C. Julián Torres Jácome**

**Mayo 2015**

## ÍNDICE

<b>Resumen</b> .....	1
<b>1. Introducción</b> .....	2
1.1 Función del corazón.....	2
1.2 El nodo senoauricular es el marcapasos del corazón.....	4
1.3 Canales iónicos dependientes de voltaje.....	7
1.4 El rol de la corriente de potasio transitoria de salida en el potencial de acción .....	9
1.5 La Diabetes Mellitus.....	10
1.6 Efectos de la diabetes mellitus en la actividad eléctrica del corazón.....	11
1.7 Justificación .....	14
1.8 Hipótesis, objetivo general y objetivos particulares.....	15
<b>2. Material y métodos</b> .....	16
2.1 Inducción de diabetes mellitus tipo 1.....	16
2.2 Aislamiento de células de nodo senoauricular.....	16
2.3 Registro de corriente iónica en Patch Clamp .....	17
2.4 Dependencia de voltaje de $I_{to}$ .....	17
2.5 Cinética de activación, inactivación, desactivación y Recuperación de la inactivación.....	18
2.6 Análisis de datos.....	19
2.7 Reactivos y soluciones.....	20
<b>3. Resultados</b> .....	21
3.1 Caracterización de animales con diabetes mellitus tipo 1.....	21
3.2 Obtención de células del nodo senoauricular de ratón.....	21
3.3 Registro del potencial de acción .....	22
3.4 Registro de la corriente de potasio transitoria de salida ( $I_{to}$ ).....	22
3.5 Cinética de la corriente $I_{to}$ y efectos por la diabetes mellitus.....	24
3.5.1 Curva de activación.....	24
3.5.2 Curva de inactivación.....	24
3.6 Cinética de activación desactivación inactivación y recuperación de la inactivación y efectos por la diabetes mellitus.....	24
<b>4. Discusión</b> .....	30
4.1 Células aisladas del nodo senoauricular de ratón y registro del potencial de acción.....	30
4.2 Corriente de potasio transitoria de salida en miocitos de ratón control.....	31
4.3 Corriente de potasio transitoria de salida en miocitos de ratón diabético .....	32
<b>5. Conclusiones</b> .....	35
<b>6. Bibliografía</b> .....	36
Anexo.....	41

## RESUMEN

El corazón es un órgano que funciona como bomba para mantener la homeostasis de todo el sistema, para ello se sincroniza la propagación de la actividad eléctrica con la contracción cardiaca. El corazón es uno de los órganos que puede afectarse por patologías como la diabetes mellitus.

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa caracterizada por presentar elevada concentración de glucosa en sangre debido a un fallo en la secreción o acción de la insulina.

La diabetes mellitus afecta la electrofisiología cardiaca en pacientes como en modelos animales donde se han reportado afecciones solo a nivel ventricular.

El presente trabajo evaluó el efecto de la diabetes mellitus en células del nodo senoauricular de ratón, en particular en la corriente de potasio transitoria de salida ( $I_{to}$ ) que participa en la fase rápida de repolarización y por tanto tiene influencia en la duración del potencial de acción. Cambios en la duración del potencial de acción por ejemplo, un incremento, están relacionados con la generación de arritmias. Para este estudio, se utilizó un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en ratón, se realizaron experimentos usando la técnica de Patch Clamp en la modalidad de célula completa y se registró esta corriente de potasio.

Se encontró que en condiciones control y de diabetes en el nodo senoauricular participa la corriente  $I_{to}$  y esta corriente es de tipo  $I_{tof}$  ya que la constante de tiempo de recuperación de la inactivación es del orden de milisegundos cómo ha sido reportada en el ventrículo de ratón. Y no se presenta diferencia significativa entre control y diabético.

El efecto de la diabetes mellitus en las células del nodo senoauricular en ratones diabéticos es una disminución en la densidad de corriente  $I_{to}$  a comparación de los animales control. La menor densidad de la corriente no fue causada por alteraciones en la cinética de los canales, puesto que no cambia la dependencia de voltaje, ni la cinética de activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación de la corriente. En este sentido, la disminución en la densidad de corriente podría estar relacionada con disminución en la expresión de canales para  $I_{to}$ .

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Función del corazón

El corazón es un órgano que forma parte del sistema circulatorio cuya función es bombear sangre a todo el organismo vía el sistema circulatorio, dicho funcionamiento permite el mantenimiento de la homeostasis. Para que se cumpla esta función por parte del corazón es necesaria la sincronización de la propagación ordenada de la actividad eléctrica con la contracción del músculo cardíaco. Dicho fenómeno es conocido como acople excitación contracción (Mohrman & Heller, 2007).

La actividad eléctrica del corazón es iniciada en las células marcapaso del nodo senoauricular (NSA), este potencial de acción se propaga a través de las vías internodales (Wenckebach, Thorel y Backman) hacia las aurículas derecha e izquierda y el nodo auriculo ventricular (NAV), sufre una breve pausa en esta zona y la actividad eléctrica se propaga hacia el haz de His y las fibras de Purkinje, hasta el ápex del corazón y dentro de las paredes ventriculares. La generación y posterior propagación de la actividad eléctrica es seguida por la relajación y un periodo refractario, hasta el siguiente potencial generado y propagado (Nerbonne & Kass, 2005).

El potencial de acción es un cambio súbito de voltaje, debido a la activación de canales voltaje dependientes, generado en las células excitables como los miocitos cardíacos, debido a cambios en la permeabilidad de la membrana. Para el estudio del potencial de acción cardíaco en los mamíferos, este se divide en fases, como a continuación se describe: (Grant, 2009)

Fase 0: Es la fase de ascenso rápido que es consecuencia de un aumento de la permeabilidad a los iones sodio ( $\text{Na}^+$ ) en las células de trabajo y calcio ( $\text{Ca}^{++}$ ) en las células marcapaso.

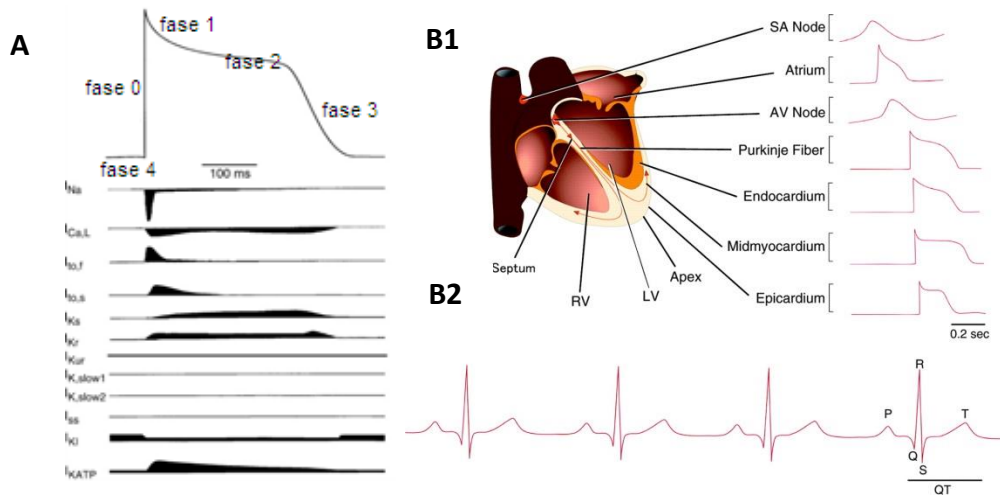
Fase 1: Es la fase de repolarización rápida y se debe a que los canales de  $\text{Na}^+$  se inactivan y al mismo tiempo hay un aumento en la permeabilidad a potasio ( $\text{K}^+$ ), se presentan las corrientes de  $I_{\text{to f}}$  y la  $I_{\text{to s}}$ .

Fase 2: En los miocitos de trabajo se caracteriza por presentar la corriente de calcio tipo L, también es llamada fase de meseta; mientras que en los miocitos del tejido marcapaso hay ausencia de esta fase.

Fase 3: Es la fase de repolarización lenta para regresar al potencial de reposo de membrana, se caracteriza por presentar corrientes de potasio como la  $I_{\text{kr}}$  y la  $I_{\text{ks}}$ .

Fase 4: Es la fase del potencial de reposo de la membrana de los miocitos donde se presentan corrientes como la  $I_{K1}$ . En miocitos de tejido de conducción como el nodo seno auricular se presenta la  $I_f$

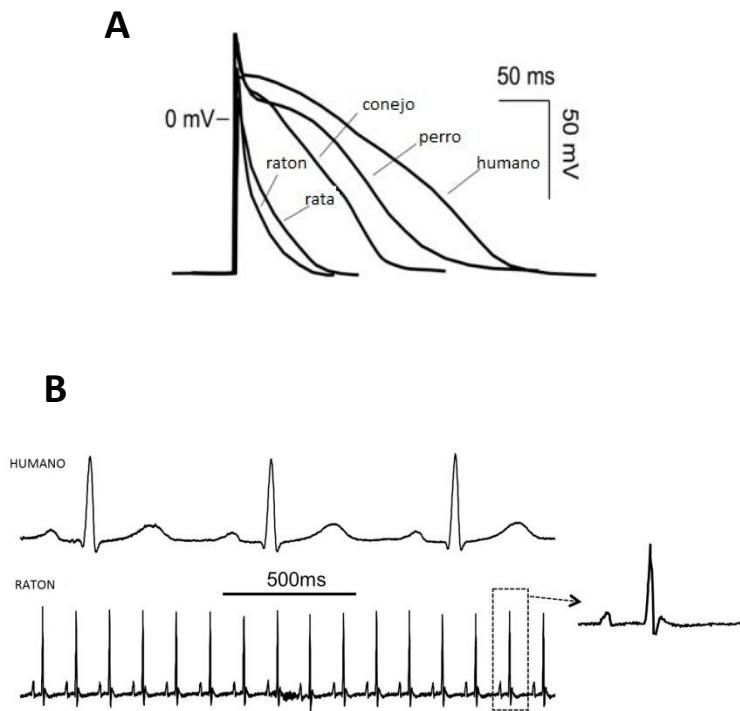
Y



**Figura 1. Actividad eléctrica del corazón.** A. El potencial de acción se divide en fases para su estudio, en la figura se ve un potencial de acción ventricular de humano y además se observan las corrientes que participan en cada fase. B1. El potencial de acción es distinto en morfología en diferentes zonas del corazón; B2 la suma espacial y temporal de toda la actividad eléctrica se representa en un electrocardiograma. (Tomado de Nerbonne & Kass, 2005).

La generación del potencial de acción y las diferencias regionales en su morfología son resultado de la permeabilidad selectiva de los canales iónicos, la gran diversidad en su expresión y la corriente iónica que presentan (Nerbonne & Kass, 2005).

La suma espacial y temporal de todos los potenciales de acción en el corazón, se representan en un electrocardiograma (ECG), mediante ondas nombradas por letras; la onda P corresponde a la actividad del nodo senoauricular y de las aurículas, el complejo QRS corresponde a la despolarización ventricular y la onda T corresponde a la repolarización de los ventrículos (Koeppen & Stanton, 2009; Fig. 1). Sin embargo, el potencial de acción no sólo es distinto en diferentes zonas del corazón, sino que además, cambia entre especies de mamíferos como se muestra en la figura.2.



**Figura 2. Cambios en la actividad eléctrica del corazón entre especies mamíferas.** A. El potencial de acción ventricular de diferentes especies de mamíferos presenta diferente morfología. B. Como la morfología del potencial de acción es diferente, la forma del electrocardiograma también cambia, en esta figura se puede ver un electrocardiograma de humano y de ratón, distinguiéndose diferencias en la frecuencia por ejemplo (Tomado y modificado de Kaese, 2012).

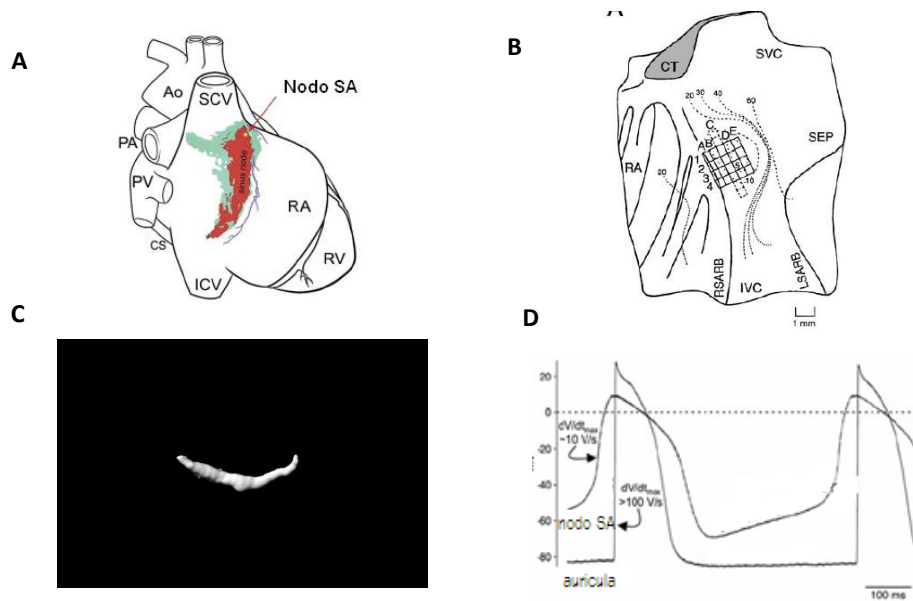
### 1.2 El nodo seno auricular es el marcapasos del corazón.

Sin importar de qué especie se trate o de la gran variabilidad en la morfología del potencial de acción, el responsable de iniciar la actividad eléctrica para su propagación a través de todo el corazón, es el nodo senoauricular. Esta estructura está localizada en la parte lateral de la aurícula derecha, delimitada por la crista terminalis auricular, el septum interauricular y la desembocadura de la vena cava superior e inferior. (Boyett *et al*, 1998; Fig. 3A)

Se ha definido al nodo senoauricular como un tejido tanto estructural como electrofisiológicamente no homogéneo (Boyett *et al*, 2000). Dentro de las características histológicas podemos encontrar que las células nodales tienen pocos miofilamentos, con espacio intercelular de 20 nm, presentan forma de uso o “araña” con una longitud de 25 a 30  $\mu$  en diferentes especies de mamíferos, como el conejo y el cobayo (Sato, 2003; Fig. 3c).

Algunos estudios apuntan a que el nodo senoauricular tiene al menos dos grupos celulares distinguidos por sus propiedades electrofisiológicas, pues se describe la existencia de un pequeño grupo celular

responsable de generar el potencial de acción, el resto de las células (la mayor cantidad y correspondientes al segundo grupo) sirven como un conductor de la onda de excitación (Bleeker *et al*, 1980). Las células marcapaso han sido llamadas centrales y se distinguen del segundo grupo, o células periféricas, porque el disparo del potencial de acción es menor, el overshoot<sup>1</sup> es menor, el potencial tiene mayor duración, el máximo potencial diastólico es menos negativo y la frecuencia marcapasos intrínseca es más baja, que en la periferia; sin dejar de mencionar que el potencial de acción del nodo es carente de meseta o fase 2, que se presenta en los cardiomiocitos de trabajo (Boyett *et al*, 1998; Fig.3D).

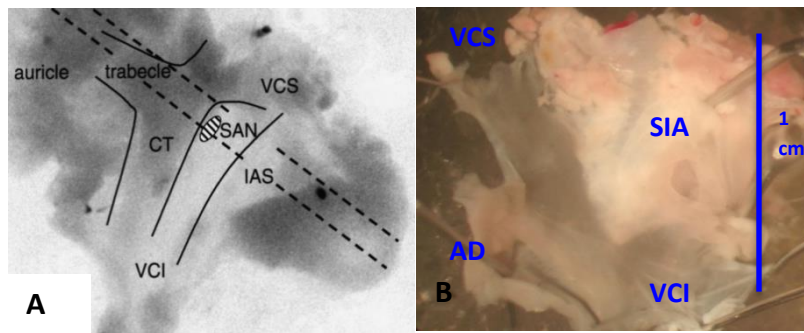


**Figura 3. El nodo seno auricular.** **A.** La ubicación del nodo seno auricular en el corazón de conejo tiene como estructuras vecinas las venas cavas superior (SCV) e inferior (ICV). Tomada y modificada de Boyett 2009. **B.** Dibujo de la preparación del nodo seno auricular de conejo donde se observa en una “cuadrícula” la zona central. Tomada y modificada de Boyett *et al* 1998. **C.** MIOCITO del nodo seno auricular de conejo; es posible notar la morfología de huso descrita para especies mamíferas. Tomado y modificado de Jones *et al*, 2008. **D.** Potencial de acción nodal. En la figura se pueden ver las diferencias en las fases del potencial de acción del nodo y de la aurícula de conejo, nótese la velocidad de despolarización lenta y la pendiente en la fase 4. Tomada de Boyett 2009.

Overshoot<sup>1</sup>: Cuando la fase de despolarización rápida o fase cero sobrepasa los 0 mv

En el conejo, se ha descrito la zona central en la región intercaval a 1-2 mm de la crista terminalis. Además es posible mencionar que la actividad eléctrica generada en estas células, viaja de forma craneal hacia la periferia, hasta alcanzar la crista terminalis (Boyett *et al*, 1998; Fig.3B).

Verheijck y colaboradores en 2001 hicieron un registro de la distribución bidimensional de las morfologías del potencial de acción con microelectrodos convencionales, del nodo seno auricular de ratón. En este trabajo determinaron la existencia de dos tipos celulares en el nodo, un grupo celular al que llamaron marcapasos primario o células centrales y las células periféricas fueron llamadas marcapasos secundario, aunque su ubicación, dentro del tejido del nodo completo, difiere al de conejo, ya que la zona central está en la desembocadura de la vena cava superior hacia la crista terminalis (Fig.4A)



**Figura 4. Nodo seno auricular de ratón.** **A.** Fotografía de la preparación de nodo seno auricular de ratón obtenida por Verheijck *et al*, (2001), se observan las estructuras vecinas como la aurícula derecha (AD) y el septum interauricular, (IAS) la vena cava superior (VCS) y la vena cava inferior (VCI) la zona central se localizó en elipse marcada en la imagen y se ubica en la región de la desembocadura de la vena cava superior y la crista terminalis (CT). **B** Fotografía de la preparación de nodo de ratón obtenida en el laboratorio de fisiopatología cardiovascular IF. BUAP.

### 1.3 Canales iónicos dependientes de voltaje

Los canales iónicos dependientes de voltaje son complejos proteicos que están embebidos en la membrana para la generación de señales eléctricas en las células, permiten un rápido y selectivo transporte de iones a través de la membrana y por tanto funciones fisiológicas (Terlau & Stuhmer, 1998). Los canales iónicos tienen dos propiedades fundamentales que son la permeabilidad iónica y su cinética (Grant, 2009).

Para el caso de canales de potasio voltaje dependientes, este complejo proteico consta de un tetrámero o ensamble de 4 subunidades alfa ( $\alpha$ ), cada una de estas subunidades tiene seis segmentos transmembrana llamados S1-S6. Los segmentos S1-S4 conforman el sensor de voltaje, el segmento S4 se distingue por tener los aminoácidos arginina y lisina mientras que S1-S3 poseen aminoácidos cargados negativamente. Los segmentos S5 y S6 forman un poro a partir de una asa extracelular que los une. (Cheng & Claydon, 2012). Los canales pueden estar acompañados por subunidades accesorias llamadas subunidades beta ( $\beta$ ) que están implicados en la regulación de la cinética, por ejemplo la subunidad Mink es una pequeña proteína conformada por 130 aminoácidos, con un solo dominio transmembrana (Nerbonne & Kass, 2005)

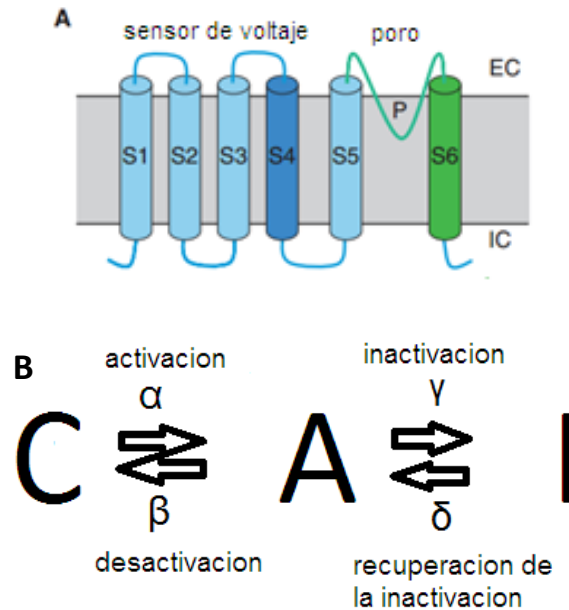
Los canales se activan con un cambio en el potencial eléctrico de la membrana, lo que permite un flujo de iones entrante o saliente de la célula. Este flujo se da cuando el poro de canal está en estado abierto, sin embargo, el canal puede cambiar de conformación y producir un cambio a otros estados como cerrado e inactivo. Estos cambios de estado en el canal y la velocidad con la que se da el cambio de estado es llamado cinética del canal (Ashcroft, 2000).

La transición de un estado a otro en los canales iónicos esta descrita por los siguientes procesos:

- Activación: Es la transición del estado cerrado del canal al estado abierto y que permite el paso de corriente.
- Desactivación: Es la transición del estado abierto, donde hay paso de corriente iónica hacia el estado cerrado, donde cesa el flujo de corriente.
- Inactivación: Es el paso del estado activo al estado inactivo. El canal puede sufrir cambios conformacionales, de tal manera que no hay paso de corriente pero el poro del canal no está cerrado, al respecto, es conocido el fenómeno de bola y cadena en el canal de sodio, donde una

partícula que es un dominio pegado a la proteína de canal intracelularmente, obstruye el poro del canal impidiendo que conduzca.

- Recuperación de la inactivación: Es la transición del estado del canal inactivo al estado abierto, este cambio permite al canal volver a permitir el paso de corriente.



**Figura 5. Canales iónicos dependientes de voltaje.** **A.** Dibujo de la estructura básica de un canal iónico de potasio, los segmentos S1-S4 forman el sensor de voltaje y S5-S6 son los formadores de poro. (Tomado y modificado de Sands *et al*, 2005) **B** Diagrama que explica los diferentes estados que adopta un canal iónico **C** es cerrado, **A** es abierto e **I** es inactivo, las letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  y  $\gamma$  son las velocidades de transición

En el miocardio existen diferencias en la amplitud y duración del potencial de acción que genera diferentes morfologías, debido a que los potenciales de acción reflejan la sincronización en la activación, inactivación y desactivación de un gran número de corrientes salientes y entrantes (Guo & Nerbonne 2002). En particular las corrientes de potasio repolarizantes dependientes de voltaje juegan un papel determinante en la amplitud y la duración del potencial de acción en los cardiomiocitos. Lo anterior tiene una importancia significativa en la fisiología cardiaca, puesto que cambios en las densidades o las propiedades de las corrientes pueden producir arritmias (Xu et al, 1999).

#### 1.4 El rol de la corriente de transitoria de salida en el potencial de acción cardiaco

La corriente de potasio transitoria de salida ( $I_{to}$ ) ha sido de gran interés desde que fue descrita por primera vez en fibras de Purkinje de oveja (Fozzard *et al*, 1973) y posteriormente se registró su presencia en otras especies como la rata (Josephson *et al*, 1984), el ratón, el gato, el conejo y el humano. La  $I_{to}$  es una corriente de activación e inactivación rápida que repolariza parcialmente la membrana justificando la fase 1 del potencial de acción, además de influir en la activación de los canales de calcio durante la fase de la meseta, mediando la duración y la amplitud de esta misma fase, y por tanto influye en la duración total del potencial de acción (Niwa & Nerbonne, 2010).

Estudios posteriores demostraron en el ventrículo de ratón que existen 2 tipos de corriente  $I_{to}$ , de acuerdo a su cinética, denotaron  $I_{tof}$  a la corriente de rápida recuperación de la inactivación (en milisegundos) e  $I_{to,s}$  a la corriente de lenta recuperación de la inactivación (en segundos) La expresión de estas diferentes corrientes contribuyen a la heterogeneidad en la morfología del potencial de acción (Xu *et al*, 1999)

Además la importancia de la  $I_{to}$  reside en que se ha reportado como blanco de enfermedades y arritmias cardiacas, Antzelevitch en el 2006, publica que cambios en la densidad de corriente pueden generar síndrome de Brugada y Guo *et al*, en el 2000, reporta que la eliminación de la corriente  $I_{to}$  aumenta la probabilidad de una post-despolarización temprana<sup>2</sup>.

La corriente  $I_{to}$  también ha sido reportada en el nodo seno auricular de conejo (Lei *et al*, 2000) y de ratón (Cho *et al*, 2003), sin embargo este trabajo solo se reporta la presencia de la corriente pero no hace una descripción de la cinética o las propiedades del canal.

Como ya se mencionaba, los canales y corrientes de potasio cardiacos son sustrato para el desarrollo de patologías cardiacas, en este sentido, el corazón es un órgano propenso a sufrir enfermedades, puesto que la organización mundial de la salud (2008) ha reportado que las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en todo el mundo. Esto incluye, cardiomiopatías, infartos, insuficiencia cardiaca y accidentes cerebrovasculares.

---

Post- despolarización temprana<sup>2</sup>: Son despolarizaciones secundarias u oscilaciones durante la meseta del potencial de acción o la fase de repolarización la cual está asociada con la generación de arritmias cardiacas (Zhao *et al*, 2012)

En el 2008, murieron 17.3 millones de personas en el mundo a causa de una enfermedad cardiovascular. Existen varios factores y patologías que predisponen a tener enfermedad cardiaca, como la mala alimentación, la falta de actividad física (sedentarismo), el tabaquismo y el alcohol. Una enfermedad que predispone a tener padecimientos del corazón es la diabetes mellitus.

### **1.5 Diabetes Mellitus (DM)**

La diabetes mellitus es una enfermedad crónica degenerativa que se caracteriza por hiperglucemia debido a alteraciones en el metabolismo de los carbohidratos, grasas y proteínas, resultado de una deficiencia en la secreción y/o actividad de la insulina (Islas-Andrade *et al*, 1999)

La prevalencia de diabetes en México paso de 4.6 % en 1993, a 22.8 % en 2006 (Arredondo & de Icaza, 2009). De acuerdo con la OMS en 2012, tan solo en el continente americano la diabetes produce 242 000 muertes anuales, de los cuales 110 000 son hombres y 132 000 mujeres, el 8 % de estas muertes ocurre en personas menores de 50 años.

La clasificación de diabetes contempla cuatro grupos (Asociación Americana de Diabetes, 2013):

- DM tipo 1: Se debe a la destrucción de células beta de páncreas, que usualmente lleva a una deficiencia absoluta de insulina.
- DM tipo 2.: Debido a un defecto progresivo en la secreción de insulina o resistencia a la insulina.
- DM gestacional (GDM): Diabetes que se diagnostica o se presenta durante el embarazo
- DM debido al consumo de fármacos que producen la muerte de células beta, por ejemplo el tratamiento para VIH o SIDA.

De acuerdo a la asociación americana de diabetes (2014) los pacientes que presentan alguno de los siguientes criterios se diagnostican con diabetes:

- A1C  $\geq$  6.5% (hemoglobina glucosilada)
- FPG  $\geq$  126 mg/dl (glucosa en sangre con ayuno de 8 horas)
- 2-h PG  $\geq$  200 mg/dl (curva de tolerancia a la glucosa).

Además de los síntomas que refieran los pacientes, como polidipsia, poliuria y polifagia, dolor de cabeza y cambios en su peso. Las complicaciones crónicas de la DM, se manifiestan en prácticamente todo el

organismo, pues se afecta el corazón, riñón, retina, sistema nervioso, tiroides, e inclusive la diabetes puede causar deficiencias cognitivas o demencia, (Asociación Americana de Diabetes, 2012)

### **1.6 Efectos de la diabetes mellitus en la actividad eléctrica del corazón**

Para el estudio de los efectos de la diabetes mellitus en el corazón, se han realizado estudios tanto en pacientes como en modelos animales.

En el trabajo de Kannel & Mc Gee en 1979, con el cohorte de Framingham, se demostró que existe dos veces más riesgo de presentar enfermedad cardiovascular, cuando los pacientes tenían diabetes mellitus, que cuando no presentan ninguna enfermedad cardiovascular, sin distinción de género.

En un trabajo posterior de Bauters & colaboradores (2003), los pacientes diabéticos tienen entre 15% y 20 % más probabilidad de desarrollar una arritmia, que las personas sanas; además de hipertensión, aterosclerosis y fibrosis miocárdica.

El electrocardiograma de pacientes diabéticos exhibe anormalidades en el intervalo QT, y la onda T; pues el intervalo QT se presenta más largo. Estos cambios son relacionados con la fase de repolarización en el potencial de acción, sugiriendo además que puede existir un desorden en el sistema de conducción (Casis *et al*, 2000)

Veglio y colaboradores concluyeron en 2004, que los cambios en el segmento QT de pacientes diabéticos, están asociados al padecimiento de muerte súbita o riesgo de una arritmia ventricular.

Shimoni & Rattner en 2001, hicieron un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en rata, a partir de la administración de estreptozotocina y probaron que existía una disminución en dos corrientes de potasio ( $I_{to}$  e  $I_{ss}$ ) en el ventrículo. Estas corrientes se recuperan cuando las células son incubadas con insulina.

Además Ponce Balbuena (2007), reportó, en un modelo de conejo con diabetes mellitus tipo 1, cambios en la actividad eléctrica espontánea, es decir, en la actividad eléctrica del nodo senoauricular. Estos datos muestran una disminución en la frecuencia de disparo, un aumento en la duración del potencial de acción (DPA), y hay además una disminución en la pendiente de la fase 4 del potencial de acción.

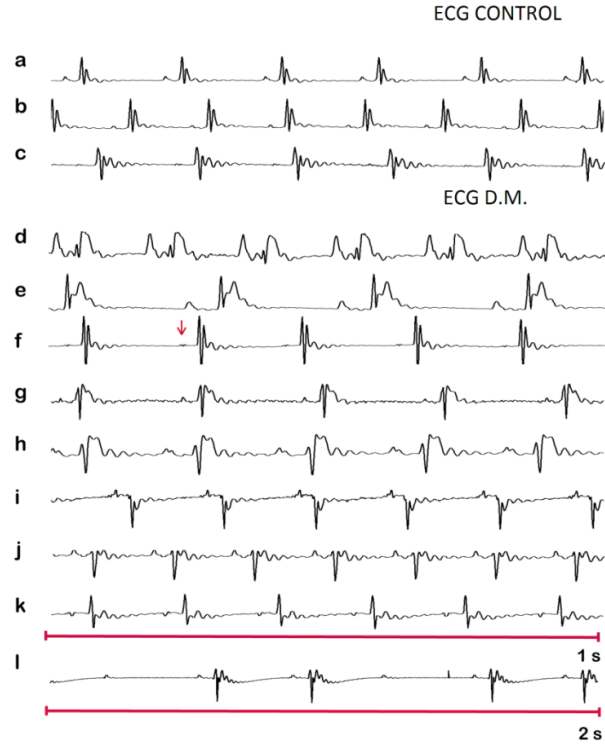
De manera similar pero en ventrículo, Zhang y colaboradores describieron en 2007, un aumento en el intervalo QT de ECG y por tanto un aumento en la duración del potencial al 20%, en conejo diabético tipo 1; pues en el estudio se halló una disminución en la densidad de corrientes de potasio como  $I_{to}$  e  $I_{kr}$ . El

cambio reportado en la densidad de corrientes, puede estar asociado a una disminución en la expresión de canales.

La disminución en la expresión de canales la reporto el trabajo realizado por Torres-Jácome *et al* en 2013, en conejo y ratón diabéticos, donde se midió la densidad de corrientes de potasio ( $K^+$ )  $I_{to\ fast}$ ,  $I_{to\ slow}$ ,  $I_{k\ slow}$ ,  $I_{ss}$  y  $I_{Kr}$  en miocitos ventriculares, encontrando una disminución de corriente y se corroboró una disminución en la expresión de canales al realizar experimentos con inmunofluorescencia.

El antecedente inmediato al presente trabajo, fue desarrollado por Arroyo Carmona y colaboradores (2012) en un modelo de ratón diabético tipo1 inducido con estreptozotocina. En dicho modelo se realizó el registro del electrocardiograma, encontrándose cambios en la frecuencia cardíaca de estos animales y una pérdida de ritmo, aunque no desapareció la onda P (Fig. 6). Estos datos obtenidos del registro electrocardiográfico, dieron pie a la hipótesis que el nodo senoauricular, (quien es el encargado de generar la actividad eléctrica y dar ritmo al corazón) sufría efectos por la diabetes mellitus.

Al realizar un registro del potencial de acción en el nodo completo de ratón con diabetes mellitus tipo1, se encontró que cambia en la fase de repolarización. Particularmente la fase de repolarización al 10 % correspondiente a la corriente  $I_{to}$  en células centrales disminuye y en células periféricas aumenta, además la amplitud del potencial de acción esta aumentada en ambos tipos de células (Fig. 6. Tabla 1)



**Figura 6. Electrocardiograma de ratón con DM tipo 1.** En esta figura es posible observar en la parte superior, el registro del electrocardiograma en ratón control (a, b y c) y diabético (d-l), nótese como se pierde el ritmo en el ratón diabético, el nodo seno auricular posiblemente sea el responsable de dicho cambio.

Tabla 1. Cambios en el potencial de acción de ratón diabético				
	Control		Diabético	
parámetro	Potencial de acción con pendiente	Potencial de acción sin pendiente	Potencial de acción con pendiente	Potencial de acción sin pendiente
Amplitud de potencial de acción. (mv)	71.7±6.4	93±1.1	83.4±9.4 *	99.8±1.5 *
Duración PA 10% (ms)	6.5 ± 0.8	2.4 ± 0.15	4.9 ± 0.6*	3.5 ± 0.2*
* p<0.05 T-Student				

## 1.7 Justificación

Diversos trabajos han reportado los efectos que produce la diabetes mellitus al corazón, ante la necesidad del conocimiento acerca de todo lo que puede producir la enfermedad. En general, en los modelos animales generados con la administración con estreptozotocina (o también aloxano) como inductor de diabetes, se ha reportado un aumento en la fase de repolarización del potencial de acción ventricular, de tal modo que las corrientes de potasio participantes en esta fase están disminuidas.

En el trabajo previo realizado en el laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, con un modelo de ratón diabético tipo 1 inducido con estreptozotocina, los datos obtenidos en el ECG, indican una pérdida de ritmo en el corazón, donde el nodo seno auricular probablemente comanda dicha arritmia. Al realizar el registro del potencial de acción en el nodo seno auricular disecado, se presenta una menor duración de la fase de repolarización, esto se contrapone con los resultados obtenidos en el nodo senoauricular de conejo diabético e inclusive a lo ya reportado en el ventrículo de otros modelos animales.

En este sentido, es necesario, saber cómo están las corrientes que participan en la fase de repolarización en el nodo senoauricular, en particular, al 10 % correspondiente a la  $I_{to}$ , de ratones control y diabéticos; que nos permita entender que está pasando con la morfología del potencial de acción y proponer cual puede ser el mecanismo de afección de la diabetes sobre el nodo senoauricular.

## 1.8 Hipótesis

La diabetes mellitus tipo 1 aumenta en el nodo seno auricular de ratón la densidad de corrientes repolarizantes.

### Objetivo general.

Estudiar la corriente repolarizante  $I_{to}$  en células aisladas del nodo seno auricular de ratones controles y tratados con stz

### Objetivos particulares:

- Obtener miocitos nodales mediante dispersión enzimática de ratones controles y diabéticos
- Registrar y caracterizar la corriente repolarizante  $I_{to}$  en ratón control
- Registrar y caracterizar la corriente repolarizante  $I_{to}$  en ratón diabético
- Analizar los cambios producidos por la DM en miocitos nodales de ratón.

## **2. Material y Métodos**

### **2.1 Inducción de diabetes mellitus tipo 1**

Se utilizaron ratones macho de la cepa CD1 de 2 meses de edad divididos en 2 grupos, el grupo control se administró con solución salina isotónica y el grupo experimental se administró con 120 mg/kg de estreptozotocina, ambas por vía intraperitoneal.

Al grupo experimental se le hizo un seguimiento y análisis correspondiente al modelo animal de diabetes mellitus tipo 1 hasta su sacrificio a las 10 semanas posteriores a la administración de estreptozotocina (Ver anexo).

### **2.2 Aislamiento de células de nodo seno auricular**

Al término de 10 semanas de tratamiento se sacrificó a los animales con pentobarbital sódico con 1 ml/ 2.5 kg y heparina 1ml/ 2.5 kg para evitar coágulos. Se sacó el corazón y se canuló por vía aorta para el lavado retrogrado mediante un sistema langendorff, con solución Tyrode.

Para realizar la dispersión enzimática se procedió como en otros reportes (Aréchiga-Figueroa *et al*, 2011; Albarado-Ibañez *et al*, 2013). Brevemente: después del lavado con Tyrode, se continuo la perfusión en el langendorff con Tyrode 0 Ca<sup>++</sup> durante 8 minutos; posterior a la perfusión con Tyrode 0 Calcio, se perfundio con una solución de Tyrode 0 calcio mas colagenasa, durante 8 minutos y se finalizó este baño en langendorff agregando proteasa durante 7 minutos más. Todo el procedimiento se realizó a 36 °C y burbujeado con carbógeno (95% O<sub>2</sub> y 5% CO<sub>2</sub>)

Al termino de toda la perfusión antes descrita, se realizó la disección de nodo seno auricular disecando exclusivamente el nodo, es decir, sin aurícula derecha y septum interauricular (Verheijck *et al* 2001), la preparación obtenida se colocó en un baño a 36 °C en una solución de colagenasa y elastasa, durante 5 y 10 minutos

Posterior a la dispersión enzimática, se hizo la dispersión mecánica, a través de la agitación del tejido en solución Krafft-Brühe (KB), y resuspensión con ayuda de pipetas Pasteur. Las células obtenidas se almacenaron en solución KB a 4 °C (Tabla 2).

### 2.3 Registro de corrientes iónicas en célula única (whole cell Patch Clamp)

Los experimentos de electrofisiología se realizaron mediante la técnica de fijación de corriente para el registro de potencial de acción, mientras que el registro de corriente mediante fijación de voltaje (Whole cell) (Hamill *et al*, 1981) usando un amplificador Axopatch-1-C (Molecular Devices) ambos con la técnica de parche perforado con anfotericina B (120 mM). En la adquisición de los datos y la generación de los pulsos se utilizó una computadora personal empleando un convertidor A/D y D/A (Digidata 1440A) y el programa pClamp 6.0.4 (ambos de Molecular Devices). Se usaron micropipetas de borosilicato elaboradas con un estirador con una resistencia de 1.5-3 M $\Omega$  al ser llenados con solución interna normal, la capacitancia y la resistencia en serie de la membrana celular se compensaron al menos en un 70%. Las células se montaron en una cámara, sobre un microscopio invertido Nikon

Para el registro del potencial de acción se perfundio a las células con solución externa normal y para el registro de corriente iónica se perfundio con solución externa Ca<sup>++</sup>Co<sup>++</sup> (para bloquear la corriente de calcio) a  $35.5 \pm 0.5$  ° C.

La capacitancia de las células fue determinada por la integración de la corriente generada en un pulso de -10 mv que fue aplicado durante 10 ms, partiendo de un potencial de mantenimiento de 0 mv, solo las células que exhibieron una sola exponencial fueron incluidas.

Para el registro de la corriente de potasio transitoria de salida I<sub>to</sub>, se realizo un protocolo que tiene un potencial de mantenimiento de -80 mv, con un pulso de -40 mv durante 40 ms para la inactivacion de la corriente de sodio y pulsos despolarizantes de 10 mv con una duracion de 500 ms cada uno, de -50mv hasta +50 mv.

La densidad de corriente se determino midiendo en cada trazo de corriente el valor máximo menos el valor minimo de esta, estos datos se dividieron entre la capacitancia celular. Con estos datos se construyo una curva de densidad de corriente (pA/pF) contra voltaje (mv).

### 2.4 Dependencia de Voltaje de I<sub>to</sub>

Para conocer la disponibilidad de canales para I<sub>to</sub> se realizaron protocolos para determinar la curva de activación y la curva de inactivación en estado estable. La curva de activación se construyó a partir de los

datos obtenidos previamente para la densidad de corriente y con la ecuación de conductancia o ecuación 1:

$$\text{Ecuación 1: } g = \frac{I}{(V - V_{eq})}$$

Posteriormente se ajustó a los datos una función de Boltzmann o ecuación 2:

$$\text{Ecuación 2: } y = A2 + (A1 - A2) / (1 + \exp((x - x0)/dx)).$$

Para la curva de inactivación en estado estable se realizó un protocolo de dos pulsos, uno condicionante de -80 mv hasta +60 con pasos de 10 mv duración de 500 ms y un segundo pulso o pulso de prueba a 50 mv con duración de 500 ms (correspondiente a la corriente de cola). Posteriormente se midió en la corriente de cola el pico de corriente menos el valor mínimo en cada trazo de corriente (como en la densidad de corriente) y los datos se ajustaron a una función de Boltzmann o ecuación 2.

Ambos protocolos de dependencia de voltaje dieron los datos de **Vm** o voltaje medio, que indican el voltaje al cual el 50 % de los canales están activos en el caso de activación y en el caso de la inactivación en estado estable expresa el voltaje al cual el 50 % de los canales están disponibles para ser activados. Además del factor pendiente.

## 2.5 Cinética de activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación

Para conocer las velocidades de transición de un estado a otro en los canales de Ito, se sacaron las taus de activación e inactivación ajustando cada uno de los pulsos de voltaje que generan la corriente a una ecuación de dos exponenciales o ecuación 3:

$$\text{Ecuación 3: } f(t) = \sum_{i=1}^n A_i (1 - e^{-\frac{t}{\tau_{ri}}}) (e^{-\frac{t}{\tau_{di}}})$$

Dónde: **Tri** es la tau de activación

**Tdi** es la tau de inactivación

Posterior al ajuste, con los datos obtenidos para Tri y Tdi correspondientes a la activación e inactivación respectivamente.

Por otra parte, la tau de desactivación se midió en la corriente de cola ajustando cada uno de los trazos de corriente generados por el pulso de voltaje a una exponencial de decaimiento o ecuación 4:

#### **Ecuación 4: $y = A1 * \exp (-x/t1)$**

Cabe mencionar que estos datos fueron obtenidos a un solo voltaje de -80 mv

Para seguir con la caracterización de la cinética de la corriente  $I_{to}$  se realizó un protocolo para recuperación de la inactivación, que consistió en dos pulsos, uno básico y otro de prueba. El pulso básico consistió en un potencial de mantenimiento de -80 mv llegando a +50 mv con duración de 500 ms y el segundo pulso o pulso de prueba tiene las mismas características pero es dado a los 20 ms después del pulso básico. Hay pulsos de prueba hasta 2500 ms, cada par de pulsos se aplicó cada 30 s.

Para la medición de la corriente generada en el este protocolo se midió la corriente en cada pulso de prueba ( $I_p$ ) y en cada pulso básico ( $I_b$ ) y se obtuvo un cociente dividiendo  $I_p/I_b$ . Después se realizó un gráfico  $I_p/I_b$  contra tiempo y se ajustó a una función exponencial o ecuación 5:

#### **Ecuación 5: $y = A1 * \exp (-x/t1)$**

Para obtener las velocidades de transición en cada uno de los estados de la cinética del canal determinadas con las letras  $\alpha$  (activación)  $\beta$  (desactivación)  $\gamma$  (inactivación) y  $\delta$  (recuperación de la inactivación) de  $I_{to}$  se utilizó el sistema de ecuaciones reportado por Hodgking & Huxley en 1952 o sistema de ecuaciones 6:

$$\text{Sistema de ecuaciones 6: } m^\infty = \frac{\alpha m}{\alpha m + \beta m}, Tm = 1/(\alpha m + \beta m)$$

$$h^\infty = \frac{\alpha h}{\alpha h + \beta h}, Th = 1/(\alpha h + \beta h)$$

Tomando los valores de las curvas de activación e inactivación (dependencia de voltaje) para  $m^\infty$  y  $h^\infty$  respectivamente, se despejan del sistema de ecuaciones  $\alpha$  y  $\beta$  y se hizo una sustitución con las Taus obtenidas en la ecuación 3. Se siguió el mismo procedimiento para la obtención de  $\gamma$  y de  $\delta$ . pero con las taus obtenidas con las ecuaciones 4 y 5 respectivamente.

## **2.6 Análisis de datos**

Todos los resultados están expresados como la media  $\pm$  EEM, los datos fueron analizados en Clampfit 10.2 y para el tratamiento estadístico se utilizó una t-Student para datos pareados y no pareados y con un valor de  $p < 0.05$  y se utilizó el software OriginPro 8.

## 2.7 Reactivos y soluciones utilizados

<b>Tabla 2</b>	
<b>Tyrode</b>	NaCl (118 mM); KCl (5.4 mM); MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (1.05 mM); NaHCO <sub>3</sub> (24 mM); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.42 mM); Dextrosa (11 mM); Taurina (20 mM). CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O (1.8 mM). Preparada con gas carbógeno (95% O y 5% CO <sub>2</sub> )
<b>Tyrode 0 calcio</b>	NaCl (118 mM); KCl (5.4 mM); MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O (1.05 mM); NaHCO <sub>3</sub> (24 mM); Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (0.42 mM); Dextrosa (11 mM); Taurina (20 mM). Preparada con gas carbógeno (95% O y 5% CO <sub>2</sub> )
<b>Solución Kraft-Brühe (KB)</b>	Taurina (20 mM); ácido glutámico (80 mM); creatina (0.5 mM); ácido succínico (1 mM); dextrosa (10 mM); KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM); MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O (5 mM); KCl (40 mM); HEPES (10 mM); EGTA (0.2 mM), se ajusta el pH a 7.4 con KOH.
<b>Solución interna normal</b>	Acido aspártico (80 mM), KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (10 mM), MgSO (4 mM), KCl (20 mM), HEPES (5 mM), GTP-Na (0.2 mM) y ATP-Na <sub>2</sub> (3 mM) se ajusta el pH a 7.25 con KOH.
<b>Solución externa normal</b>	NaCl (136 mM), KCl (4 mM), MgCl <sub>2</sub> 1 (mM), HEPES (10 mM), CaCl <sub>2</sub> (1.8 mM), y dextrosa (11 mM) se ajusta el pH 7.4 con NaOH.
<b>Solución Ca-Co</b>	NaCl (136 mM), KCl (4 mM), MgCl <sub>2</sub> 1 (mM), HEPES (10 mM), CaCl <sub>2</sub> (0.1 mM), CoCl <sub>2</sub> (0.5 mM) y dextrosa (11 mM) se ajusta el pH 7.4 con NaOH.
<b>Anfotericina B</b>	120 mM
<b>Enzimas</b>	Colagenasa tipo 1 0.5 mg/ml, proteasa 0.03 mg/ml, elastasa 0.4 mg/ ml
<b>Estreptozotocina</b>	120 mg /kg

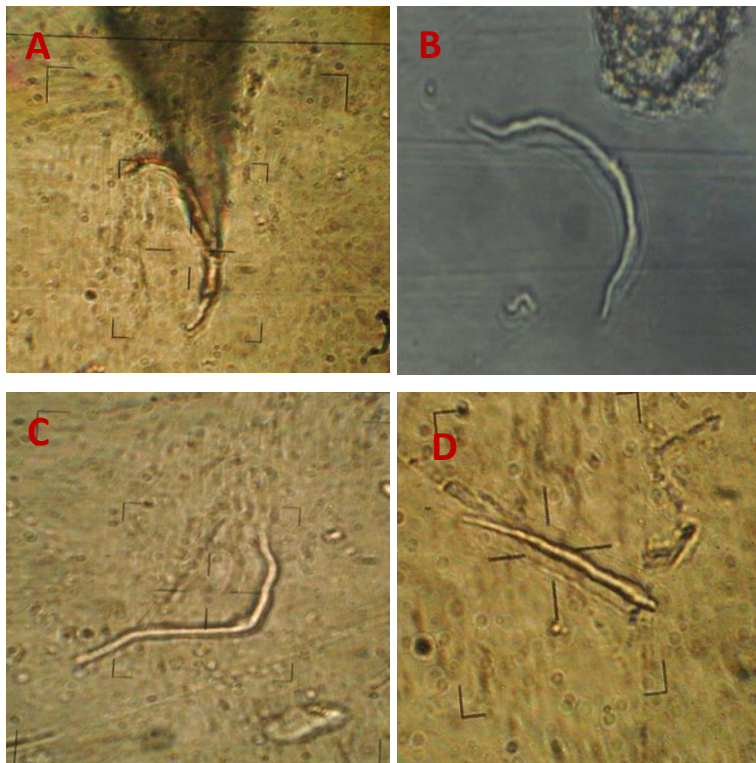
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Caracterización de animales con diabetes mellitus tipo 1

Los ratones utilizados para el presente trabajo pertenecen a un grupo de animales caracterizado con los siguientes parámetros: bioquímica clínica (glucosa, triglicéridos, colesterol total, insulina y electrolitos séricos: (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y Ca<sup>++</sup>) metabolismo (jaula metabólica) y peso. (Ver anexo)

#### 3.2 Obtención de células del nodo seno auricular de ratón.

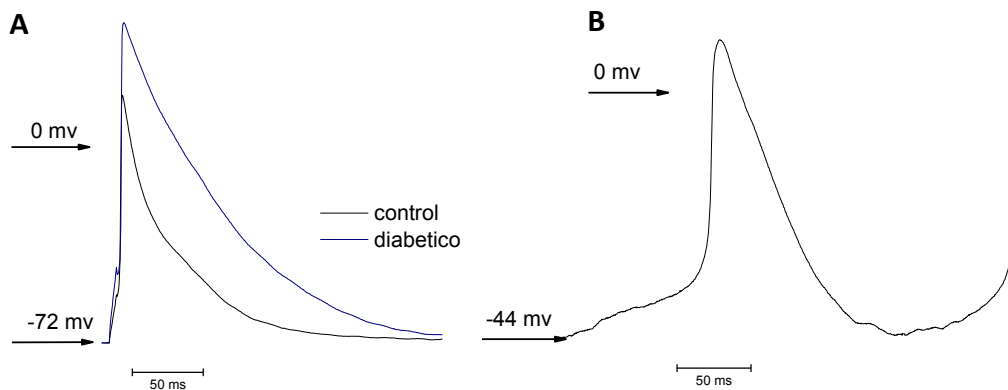
La dispersión enzimática y mecánica en el corazón de ratones control y con diabetes, así como la disección del nodo seno auricular permitió la obtención de células con morfología en forma de huso y de araña. La capacitancia celular en animales control fue de  $52.5 \pm 3.08$  pF (n=14) y en los ratones diabéticos  $50.8 \pm 5.43$  pF (n= 10), sin presentarse diferencia significativa entre los grupos de experimentación (fig.7)



**Figura 7. Células del nodo seno auricular de ratón.** Células obtenidas del nodo seno auricular después de la dispersión enzimática, en **A y B** se ven células obtenidas de ratón control. **C y D** son células de ratón diabético. Nótese que presentan la morfología de huso ya reportada para varias especies de mamíferos.

### 3.3 Registro del potencial de acción

Dada la proporción de células centrales contra las células periféricas reportadas en el registro previo de potencial de acción en nodo senoauricular completo (15% de células centrales y 85% de células periféricas) solo se encontraron células periféricas que exhibieron un potencial de acción periférico o sin pendiente en la fase 4. Este potencial de acción presento un aumento en la amplitud y en la fase de repolarización. Solo una célula exhibió un potencial de acción con pendiente en la fase 4 o correspondiente a célula central, sin embargo, no fue posible registrar la corriente de esta célula. (Fig. 8)

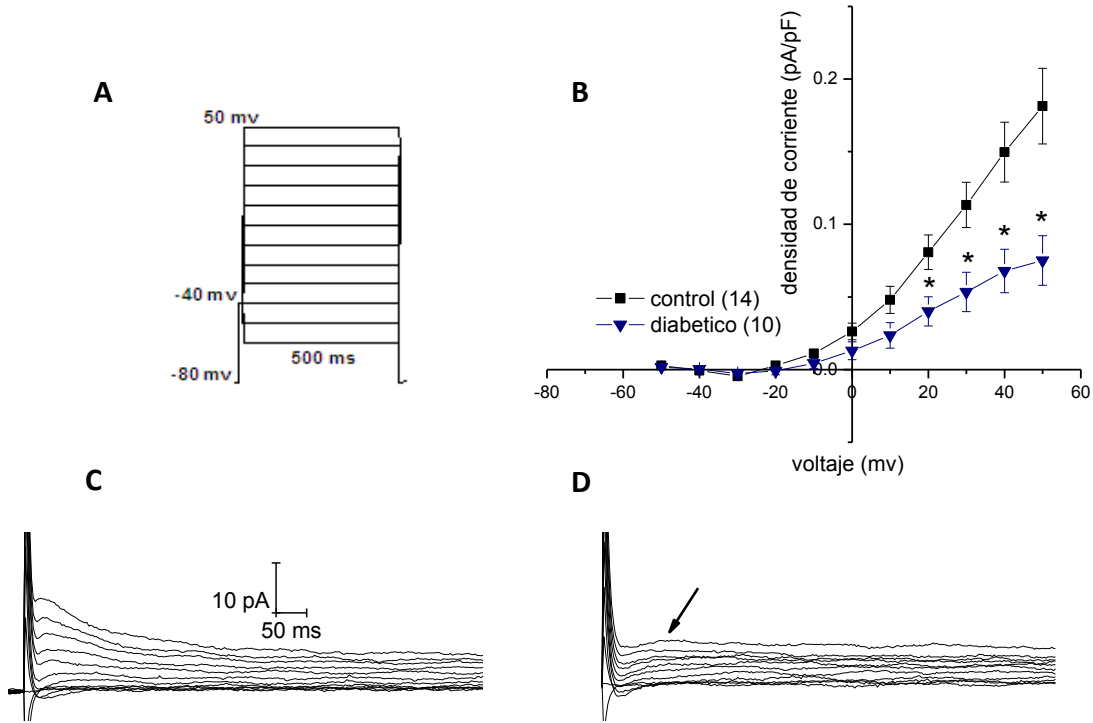


**Figura 8. Potencial de acción en célula aislada de nodo seno auricular de ratón.** A. En esta figura se ve en negro el potencial de acción de ratón control y en azul el potencial de acción de ratón diabético nótese como en el diabético esta aumentada la fase de repolarización. B. Potencial de acción que presenta pendiente en la fase 4. Cabe mencionar que los potenciales de acción fueron obtenidos de células que presentaban forma de huso.

### 3.4 Registro de la corriente de potasio transitoria de salida “ $I_{to}$ ”.

Para el estudio de la corriente de potasio transitoria de salida en células del nodo seno auricular de ratón, se registró la corriente con un protocolo de fijación de voltaje de pulsos despolarizantes descrito en material y métodos.

Los resultados obtenidos indican que hay una disminución en la densidad de corriente de los animales diabéticos. De acuerdo con la curva densidad de corriente vs voltaje, en la condición de diabético, hay una disminución en la densidad de corriente, por ejemplo; a 20 mV decrece un 50 %, puesto que en condiciones control hay  $0.080 \pm 0.011$  pA/pF mientras que en condiciones de diabetes hay  $0.040 \pm 0.010$  pA/pF. (Fig. 9; Tabla 3)



**Figura 9. Corriente  $I_{to}$  en celulas del nodo senoauricular.** A. Protocolo realizado que permite el registro de la  $I_{to}$ . B. La curva I-V de la  $I_{to}$  nos indica que apartir de 20 mv hay una disminucion en la densidad de corriente. C. Registro de la  $I_{to}$  en animal control. D. Registro de la  $I_{to}$  en animal diabetico donde es posible ver (flecha negra) una disminucion en la densidad de corriente comparado con el raton control. Media  $\pm$  EEM \* $p < 0.05$  T-Student.

Tabla 2. Densidad de corriente $I_{to}$ (pA/pF)			
voltaje	Control (14)	Diabético (10)	Disminución %
-10	0.011 $\pm$ 0.002	0.004 $\pm$ 0.003	36%
0	0.026 $\pm$ 0.005	0.012 $\pm$ 0.006	35%
10	0.047 $\pm$ 0.009	0.023 $\pm$ 0.008*	52%
20	0.080 $\pm$ 0.011	0.040 $\pm$ 0.010 *	50%
30	0.113 $\pm$ 0.015	0.053 $\pm$ 0.013 *	53%
40	0.149 $\pm$ 0.020	0.067 $\pm$ 0.014 *	55.1%
50	0.181 $\pm$ 0.025	0.075 $\pm$ 0.017 *	58.6%
Media $\pm$ EEM * $p < 0.05$			

### **3.5 Cinética de la corriente Ito y efectos por la diabetes mellitus**

#### **3.5.1 Curva de activación**

Para conocer las propiedades del canal responsable de Ito y poder determinar si los efectos en la densidad de corriente son debidos a cambios en la dependencia de voltaje de esta corriente.

Con los ajustes correspondientes se obtuvo en condiciones control el voltaje medio de  $17.46 \pm 3.16$  mv contra  $15.23 \pm 7.05$  mv en diabético, con una pendiente de  $9.99 \pm 1.54$  mv en control y  $11.87 \pm 3.58$  mv, sin presentar diferencia significativa entre grupos de experimentación (Fig.10)

#### **3.5.2 Curva de Inactivación en estado estable**

Otra parte de la dependencia de voltaje que pudiera ser responsable de la disminución en la densidad de corriente a causa de la diabetes es la disponibilidad de canales, y para ello se realizó un protocolo de inactivación o registro de corriente de cola.

En la curva de inactivación en estado estable, en ratones control el voltaje medio es  $-34.10 \pm 1.48$  mv contra  $-35.88 \pm 0.99$  mv en ratones diabéticos con una pendiente de  $10.75 \pm 0.070$  mv en control y  $10.88 \pm 0.42$  mv en diabético. Los datos obtenidos indican que la condición de diabético no cambia la dependencia de voltaje de la corriente Ito. (Fig. 10)

### **3.6 Cinética de activación, inactivación, recuperación de la inactivación y desactivación y efectos por la diabetes mellitus**

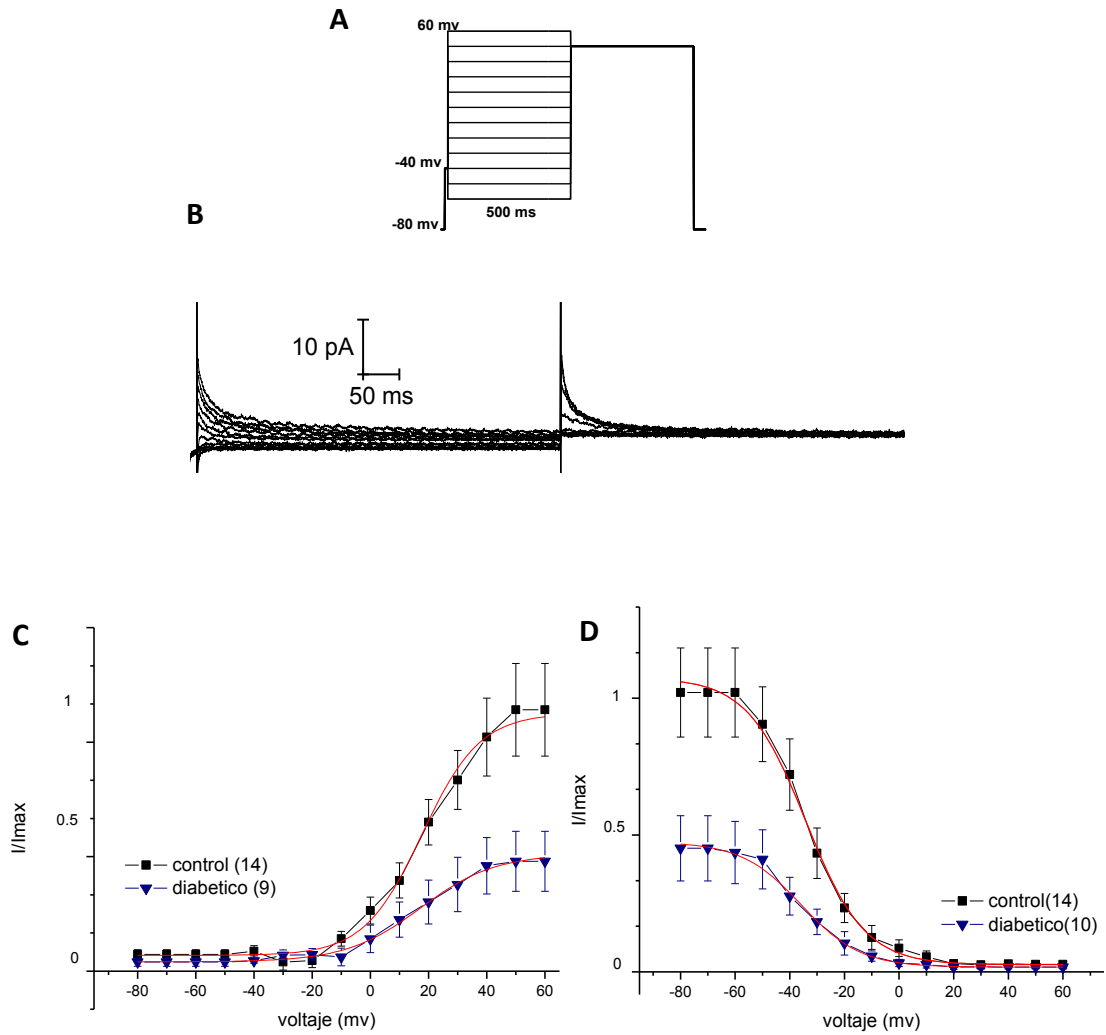
La Tau de activación e inactivación o la velocidad en la que los canales responsables de la corriente Ito pasan del estado cerrado al activo (abierto) y del estado activo al inactivo (no conductor) respectivamente, son propiedades de los canales iónicos que también pueden ser responsables de una disminución en la densidad de corriente.

Los resultados obtenidos después del ajuste realizado a la corriente registrada, indican que no existen diferencias significativas entre el grupo de animales control y el grupo diabético en cuanto a las velocidades de activación e inactivación, esto significa que no hay cambios en las velocidades del paso de un estado a otro en el canal Ito y por tanto no hay cambios en la corriente asociados a las propiedades cinéticas del canal.

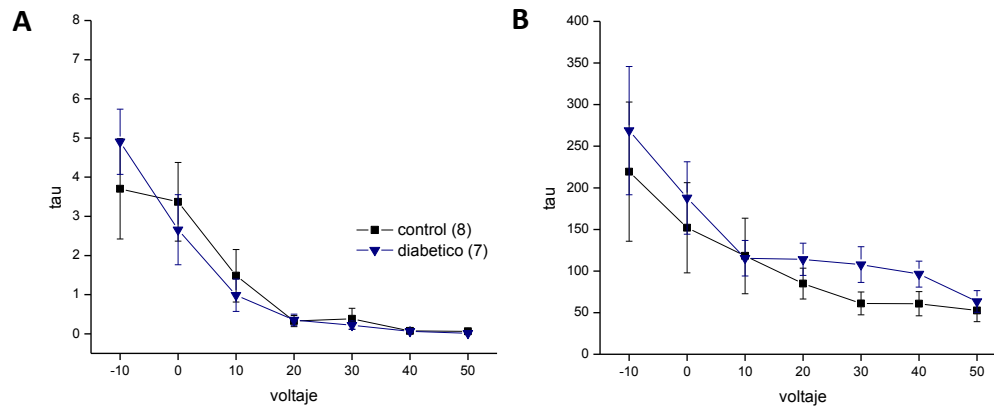
Por otra parte, para en la velocidad de desactivación la prueba estadística indico que no existen cambios en la transición del estado abierto al cerrado del canal de la corriente Ito. Vease la tabla 3 para el resumen de los datos.

La densidad de corriente Ito puede estar afectada además por algún cambio en el curso temporal de la recuperación de la inactivación. Para ello se hizo el registro de corriente con un protocolo de doble pulso, pulso básico y pulso de prueba.

Las Taus obtenidas indican que para el grupo control es de  $0.060 \pm 0.004$  ms. y para el grupo diabético  $0.035 \pm 0.005$  ms. además no hay diferencias significativas entre los grupos (Fig. 12).

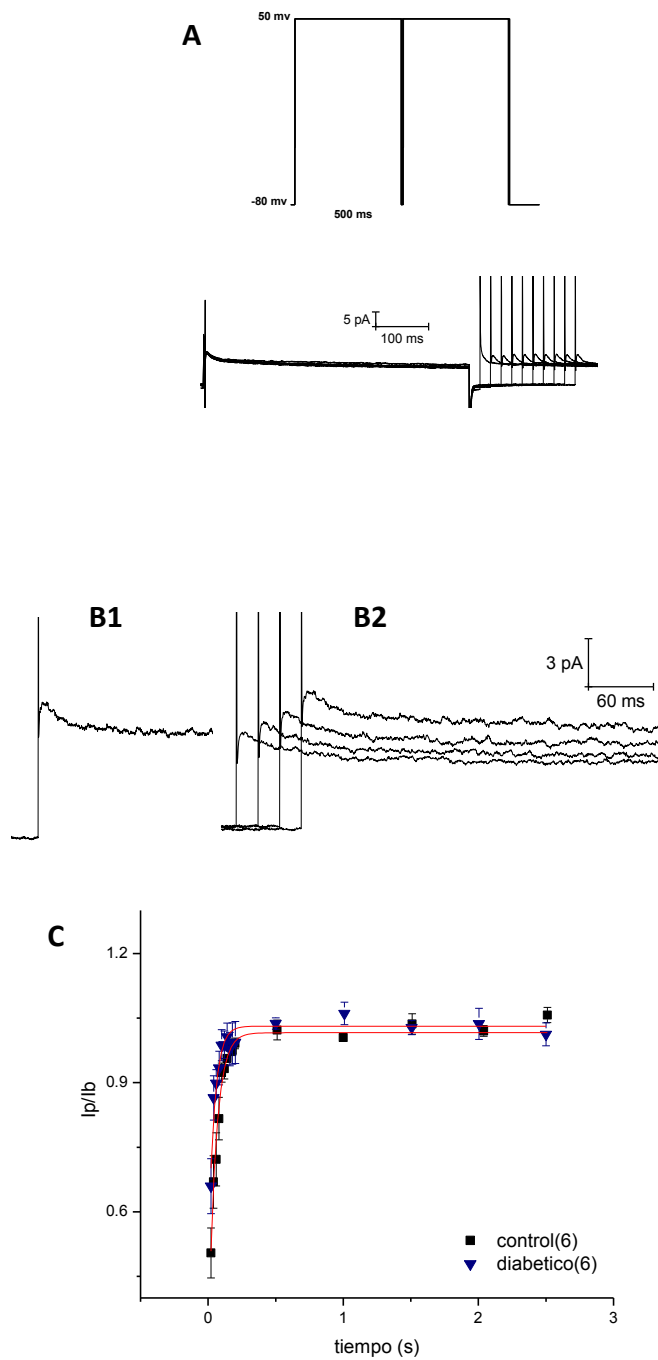


**Figura 10. Dependencia de voltaje de Ito en el nodo de ratón.** A. Protocolo de corriente de cola realizado para el registro de corriente. B. Curva de activación que indica que el voltaje medio activación de canales no cambia con el tratamiento de estreptozotocina C. Curva de Inactivación que indica que la disponibilidad de canales no cambia entre el grupo control y diabético. En la figura se indica con cuadros negros para grupo control, triángulos azules para diabético y línea continua roja para el ajuste de Boltzmann.



**Figura 11. Taus de activación e inactivación de la Ito.** **A.** En la figura se observa las taus de activación obtenidas tanto en ratones control como en diabético. **B.** En el grafico se ven las taus de inactivación de ratones control y diabético En la tabla 4 se puede ver un resumen de los datos.

Tabla 4. Tau de activación e inactivación I <sub>to</sub>						
voltaje	Activación (ms)		inactivación (ms)		Desactivación (ms)	
	control (n=8)	diabético (n=7)	control	diabético	Control (n=8)	diabético (n=8)
-10	3.701±1.281	4.9 ±0.83187	219.39 ± 83.60	268.82 ± 77.08	0.05±0.02	0.00437±0.001
0	3.37±1.00	2.65± 0.89	152.02 ± 54.27	187.85 ± 43.51	0.053±0.02	0.00477± 0.0008
10	1.48± 0.67	0.98±0.41	118.12 ± 45.32	115.50 ± 21.33	0.005±0.001	0.0043±0.0006
20	0.32±0.14	0.35± 0.14	84.94 ± 18.51	114.08 ± 19.30	0.010±0.002	0.00551±0.001
30	0.38±0.26	0.21±0.10	61.04 ± 13.75	107.73 ± 21.51	0.010±0.002	0.00886±0.001
40	0.07± 0.02	0.06± 0.02	60.71 ± 14.52	96.36 ± 15.65	0.018±0.004	0.0072±0.001
50	0.06±0.02	0.01±0.001	52.55± 13.41	63.44 ± 13.00	0.019±0.004	0.008±0.002
Media ± ESM						



**Figura 12. Recuperación de la Inactivación de la  $I_{to}$ .** **A.** Protocolo utilizado para registrar la recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$  que consta de doble pulso. **B.** Registro característico de la recuperación de la corriente. **B1:** pulso básico y **B2:** pulso de prueba **C.** Curva de la constante de recuperación de la corriente, en cuadros negros se indican los animales control, en triángulos azules los animales diabéticos y en la línea roja continua el ajuste exponencial.

Las velocidades de transición fueron determinadas con la ecuación 6 descrita en material y métodos. Los datos obtenidos están en la Tabla 5, no hubo diferencias significativas en ninguna de estas velocidades.

<b>Tabla 5. Velocidades de transición en el canal <math>I_{to}</math> (ms)</b>								
	activación ( $\alpha$ ) (n=8)		desactivación ( $\beta$ ) (n=8)		inactivación ( $\gamma$ ) (n=7)		recuperación de la inactivación ( $\delta$ ) (n=6)	
<b>voltaje</b>	control	diabético	control	diabético	control	diabético	control	diabético
<b>-10</b>	0.00229	7.53E-04	-0.0293	-0.02114	-0.00229	0.00116		
<b>0</b>	--	--	--	--	--	--		
<b>10</b>	0.01603	0.01367	0.05145	0.08773	0.00291	0.00593		
<b>20</b>	0.11929	0.05106	0.03362	0.09006	0.00758	0.00692		
<b>30</b>	0.13065	0.10326	0.04369	0.04847	0.01137	0.00731		
<b>40</b>	0.86246	0.45335	0.05106	0.04268	0.01073	0.00823		
<b>50</b>	1.0857	2.46288	0.07687	0.07493	0.01277	0.01245	0.93854	0.77568

#### 4. DISCUSIÓN

Rossini *et al*, (1977) fue uno de los primeros investigadores en reportar un modelo animal de diabetes mellitus inducido con estreptozotocina y desde entonces se han reportado otros trabajos en varias especies y de tipo agudo y crónico, sin embargo es importante mencionar que de acuerdo con Chatzigeorgiou *et al*, (2009) un modelo animal para investigación biomédica es aquel en el cual una patología inducida o espontánea puede ser estudiada en uno o varios aspectos como en el humano u otras especies animales, por lo que, los modelos experimentales son herramientas esenciales para el entendimiento de las bases moleculares, la patogénesis y la utilidad de agentes terapéuticos en una enfermedad multifactorial como la diabetes mellitus.

En este sentido, en el presente trabajo se utilizó un modelo animal que ha sido caracterizado con varios parámetros típicos de la diabetes mellitus en humanos como se menciona en la Asociación Americana de Diabetes (2013), como la bioquímica clínica que involucra un perfil lipídico, además de la cuantificación de signos como la polidipsia, poliuria y polifagia. Adicionalmente, en el modelo aquí utilizado fueron cuantificados los electrolitos séricos, esta prueba descartó la posibilidad de que cambios electrofisiológicos en el corazón puedan ser debidos a alteraciones en los electrolitos.

Por otra parte, el modelo utilizado tiene una 80 % de supervivencia al final de las 10 semanas de tratamiento, lo que permite que pueda ser útil para otros estudios.

##### 4.1 Células aisladas del nodo senoauricular de ratón y registro del potencial de acción

Las células del nodo seno auricular de ratón que se aislaron para el presente trabajo presentan la morfología de huso y araña reportada para el nodo seno auricular de varias especies mamíferas como el conejo (Lei *et al*, 2000) ratón (Mangoni & Nargeout, 2001) (Cho *et al*, 2003) rata (Albarado-Ibañez *et al*, 2013) y gato (Arechiga-Figueroa *et al*, 2011).

El registro del potencial de acción en el nodo seno auricular del ratón, previo a este trabajo dio como resultado dos grupos de potencial de acción centrales y periféricos en función de la presencia de la pendiente de la fase cuatro o ausencia de la misma, respectivamente. Estos datos son congruentes con el trabajo de Verheijck *et al*, 2001 que describió los mismos grupos celulares y que además da la ubicación espacial de estas células centrales, diciendo que se encuentran en la esquina superior entre la desembocadura de la vena cava superior y la crista terminalis y que tiene un área de 0.02 mm<sup>2</sup>. Los datos

hallados por este grupo de investigadores puede ser consistente con la proporción de células centrales registrada por Arroyo-Carmona *et al*, 2012 que corresponden al 15% de un total de 118 células registradas. Es importante mencionar en este trabajo antecedente al presente estudio también se localizó la misma zona de células centrales dentro del tejido completo reportada por Verheijck.

Adicionalmente Mangoni & Nargeout, en 2001 publicaron un trabajo en el nodo de ratón donde reportan que hay un 30% de células con forma de huso y araña que tenían actividad automática y un 70% de células periféricas, este trabajo también es congruente con la baja proporción de células centrales encontradas en otros trabajos.

En este sentido existió una baja probabilidad de hallar células centrales, por el contrario las células registradas en Patch Clamp pueden ser periféricas por la morfología del potencial de acción que exhibieron.

#### **4.2 Corriente de potasio transitoria de salida en miocitos de ratón control.**

La corriente de potasio transitoria de salida fue descrita en cardiomiocitos de las fibras de Purkinje en los años setenta y desde entonces ha sido de gran interés, debido a ser la corriente que justifica la fase de repolarización rápida o fase 1 e influye en la fase de meseta del potencial de acción y por tanto es un blanco para la generación de arritmias (Nerbonne & Guo, 2002; Xu *et al*, 1999) debido a que cambios en la densidad o cinética de la corriente que cambie la duración del potencial de acción puede producir post-despolarizaciones tempranas, síndrome de Brugada o muerte súbita (Zhao *et al*, 2012; Antzelevitch 2006).

La corriente  $I_{to}$  ha sido descrita en cardiomiocitos de trabajo, como el ventrículo de rata (Josephson *et al*, 1984) y la aurícula (Boyle *et al*, 1994), en el nodo seno auricular fue descrita por Lei *et al*, en el año 2000 en el conejo. La corriente se caracteriza por la rápida activación e inactivación, responde a despolarización positiva y se la activación se hace más rápida a voltajes positivos

Cho *et al*, 2003 reporto en células aisladas del nodo de ratón la presencia de la corriente de potasio transitoria de salida, sin embargo en este trabajo no se describe la cinética de la corriente, en este trabajo se está reportando por primera vez, que la cinética de la corriente aportando datos de dependencia de voltaje y cinética de activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación. Cabe mencionar que la cinética de desactivación y la recuperación de la inactivación fueron realizadas a un solo voltaje de -80 mv. En cuanto a la cinética de recuperación de la inactivación Xu *et*

*al*, (1999) reportó la existencia de 2 tipos de corriente  $I_{to}$  en el ventrículo de ratón, es decir,  $I_{tos}$  (lenta) e  $I_{tof}$  (rápida) con respecto a su cinética de recuperación de la inactivación puesto que  $I_{to}$  lenta se recupera en orden de segundos e  $I_{to}$  rápida en orden de milisegundos.

Los datos obtenidos para este estudio son consistentes con el tipo de  $I_{to}$  (rápida) reportada en el ventrículo de ratón (*Xu et al*, 1999) (*Torres-Jácome et al*, 2013) puesto que la corriente se recupera en un promedio de 60 ms. Al respecto se puede mencionar que el canal que se presenta en el nodo seno auricular de ratón puede ser correspondiente al correlato molecular KV4.3 o KV4.2 que se acompaña de la subunidad accesoria KChiP2 (*Guo et al*, 2002).

Adicionalmente, usando las velocidades de transición entre los estados del canal de  $I_{to}$  a 50 mv obtenidos en este trabajo se reprodujo el curso temporal experimental en un modelo de canales iónicos elaborado por Montiel-Jaen en 2012. Con esto corroboramos que los datos del modelo y los datos experimentales son congruentes. (ANEXO)

#### **4.3 Corriente de potasio transitoria de salida $I_{to}$ en miocitos de ratón diabético**

La hipótesis planteada para el desarrollo de este trabajo que contempla el registro y caracterización de la  $I_{to}$ , es falsa puesto que se obtuvo una menor densidad de corriente, sin embargo, bajo el supuesto de que no fueron halladas las células centrales (por el momento) la disminución en la densidad de corriente es congruente con la morfología encontrada en los potenciales periféricos en célula aislada y también en los registros de potencial en tejido completo del nodo seno auricular, donde se observó, que hay una disminución en la duración del potencial de acción al 10 %.

Con respecto a los datos obtenidos de la dependencia de voltaje y la cinética del canal (activación, inactivación, desactivación y recuperación de la inactivación) se observa que no hay cambios en el ratón diabético tipo 1 con respecto a los datos del ratón control. Aunque los datos de la desactivación y recuperación de la inactivación son a un solo voltaje (-80 mv) no presentan diferencia significativa con respecto al grupo control lo que hace suponer que no hay cambios a otros voltajes. Por lo que la disminución en la densidad de corriente encontrada no es efecto de cambios en la cinética del canal.

De tal manera que la disminución en la densidad de corriente está relacionada con la deficiencia de insulina que se presenta en el modelo de ratón diabético utilizado en este estudio. Puesto que la insulina al unirse a su receptor de tirosin-cinasa (pertenece a la familia de receptores para factores de crecimiento con actividad intrínseca de cinasas de Tirosina) desencadena una compleja cascada de

señalización que lleva a una amplia gama de acciones celulares que no solo está encargada de la homeostasis de la glucosa, sino que incluye la señalización para la regulación de síntesis de proteínas. (Olivares-Reyes & Arellano-Plancarte, 2008; Shimoni *et al*, 1998) Al respecto, la insulina participa en la regulación de la transcripción de genes que codifican para proteínas formadoras de canales iónicos; si se produce una deficiencia en la insulina, puede haber una disminución en la expresión de los canales (Shimoni *et al*, 1998; O'Brien & Granner, 1996).

Existen autores que ya han reportado una recuperación de la densidad de corriente, al poner miocitos procedentes de animales con diabetes, en incubación con insulina. Shimoni & Rattner (2001) incubaron miocitos ventriculares de rata diabética con insulina y observaron que había un restablecimiento de la corriente  $I_{to}$  en un periodo de 5 a 9 horas de incubación. Del mismo modo, Torres-Jácome *et al*, 2013, hace una incubación con insulina en miocitos ventriculares de ratón diabético y también obtiene una recuperación de la corriente  $I_{K^+}$  después de 6 horas.

Al respecto, se ha propuesto que la recuperación de la densidad de corrientes puede deberse a un mejoramiento en el metabolismo celular, o a la actividad de la insulina como factor para la síntesis de proteínas, Por una parte la incubación con piruvato también conduce al restablecimiento de corriente (Torres-Jácome *et al*, 2013). Y por otro lado, la incubación con un bloqueador de la actividad de las cinasas dependientes de AMPc conduce a una reducción de la densidad de corriente semejante a la que se presenta en animales diabéticos, en adición a este reporte, la incubación con un inhibidor de IP3 no produce cambios en el restablecimiento de corriente. Este estudio implica, que la síntesis de canales está dada por la vía de MAP-cinasas (Shimoni *et al*, 1998).

Es posible, además agregar que se ha demostrado que la red del citoesqueleto de los miocitos que participa en el trafico intracelular de proteínas (incluidas las proteínas de canal) también es afectado por el déficit de insulina que presentan los modelos animales de diabetes tipo1, puesto que experimentos de inmunohistoquímica han detectado una menor cantidad de tubulina, provocando una reducción en las funciones del citoesqueleto en el trafico celular (Shimoni & Rattner, 2001).

El presente trabajo aporta datos acerca de la presencia de la corriente  $I_{to}$  en el nodo senoauricular de ratón y además de la cinética del canal responsable de esta corriente, tanto en ratones control como en ratones diabéticos, al respecto, la densidad de corriente se encontró disminuida, dado que no existen cambios con diferencia significativa en la cinética del canal podemos inferir que existe una disminución en la expresión de los canales iónicos producto del déficit de insulina que presentan los animales

diabéticos utilizados para este estudio. Sin embargo, aún falta mucho por describir en cuanto al fenómeno del potencial de acción en células del nodo senoauricular de ratón con diabetes tipo 1, en este sentido es necesario el registro de las corrientes iónicas en células centrales, tanto corrientes despolarizantes como repolarizantes, además de considerar otros mecanismos presentes en estas en este tejido y que son importantes para la comprensión del potencial de acción; por ejemplo el reloj de calcio que es un tema desarrollado en los últimos años.

## 5. CONCLUSIONES

- El nodo seno auricular de ratón presenta la corriente de potasio transitoria de salida en condiciones control y de diabético.
- El nodo de ratón presenta la corriente Ito tipo "f" o Ito rápida
- El tratamiento para la generación de diabetes en ratón, no afecta la cinética de canal, por lo que es posible asociar la disminución en la densidad de corriente a cambios en la expresión del canal.
- La corriente Ito registrada fue de células periféricas del nodo seno auricular de ratón.

## Bibliografía

- Albarado-Ibañez, A., Avelino-Cruz J.E., Velasco, M., Torres-Jácome, J., Hiriart M. (2013). **Metabolic Syndrome remodels electrical activity of the sinoatrial node and produces arrhythmias in rats.** *PLoS ONE*, 8:1-8
- Antzelevitch, C. (2006) **Brugada Syndrome.** *PACE* 29: 1130-1159
- Arechiga-Figueroa, I., Rodriguez-Martinez, M., Sanchez-Chapula, J.A. (2011) **Voltage-dependent potassium currents in feline sino-atrial node myocytes.** *Pflugers Arch-Eur JPhysiol.*462:3 385-96.
- Arredondo, A., De Icaza, E. (2009). **Financial requirements for the treatment of diabetes in Latin America: implications for the health system and for patients in Mexico.** *Diabetologia*, 52:1693–1695.
- Arroyo-Carmona R.E., López-Serrano A.L., Vázquez-Pérez E., Albarado-Ibañez A., Mendoza-Lucero F.M., Avelino-Cruz E., López-Mayorga R.M., Torres-Jácome J. (2012). **Alteración de la actividad eléctrica del nodo senoauricular inducida por la Diabetes mellitus tipo 1 experimental en ratón.** *Congreso Internacional de Ciencia e Innovación en Diabetes Mellitus, Cd de México septiembre 2012.*
- Ashcroft. M. (2000) **Ion Channels and Disease.** *Academic Press* 21-38
- Bauters, C., Lamblin, N., Mc Fadden, E., Van Belle, E., Millaire, A., Groote, P. (2003). **Influence of diabetes mellitus on heart failure risk and outcome.** *Cardiovascular Diabetology* , 2:1-16
- Boyett, M.R. (2009) **“And the beat goes on” the cardiac conduction system: the wiring system of the heart.** *Exp Physiol* 94:1035-1049
- Boyett, M.R., Honjo H., Kodama I., (2000). **The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure,** *Cardiovascular Research*, 47. 658–687.
- Boyett, M.R., Honjo, H., Yamamoto, M., Nikmaram, R., Kodama I. (1998). **Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 275:H1158-H1168.

- Boyle, WA., Nerbonne, JM. (1992). **Two functionally distinct 4-aminopyridine-sensitive outward K<sup>+</sup> currents in rat atrial myocytes.** *J Gen Physiol* 100: 1041-67
- Bleeker, W.K., Mackaay, A.J., Masson-Pevet, M., Bouman, LN., Becker, A.E. (1980) **Functional and morphological organization of the rabbit sinus node.** *Circ Res* 4: 11-22
- Casis, O., Gallego, M., Iriarte, M., Sánchez-Chapula, J.A. (2000). **Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle.** *Diabetologia*, 43: 101-109.
- Cheng, Y. M., Claydon, T. W. (2012). **Voltage-dependent gating of hERG potassium channels.** *Fphar* 3:1-17
- Cho, H.S., Takano, N., Noma, (2003). **The electrophysiological properties of spontaneously beating pacemaker cells isolated from mouse sinoatrial node.** *J Physiol*, 550.1: 169–180.
- Fozzard, H.A., Hiraoka, M. (1973) **The positive dynamic current and its inactivation properties in cardiac purkinje fibres .** *J Physiol.* 234: 569-86
- Chatzigeorgiou, A., Halapas, A., Kalafatakis, K., Kamper, E. (2009) **The use of animal models in the study of diabetes mellitus.** *In vivo* 23: 245-258
- Guo, W., Li, H., Aimond, F., Johns, D., Rhodes, K., Trimmer, J., Nerbonne, J. (2002) **Role of heteromultimers in the generation of myocardial transient outward K<sup>+</sup> Currents.** *Circ Res.* 90: 586-593.
- Grant, A. O. (2009) **Cardiac Ion channels.** *Circ Arrhythm Electrophysiol*, 185-194
- Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B., Sigworth, F.J. (1981). **Improved Patch-Clamp Techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches.** *Pflügers Arch* 391, pp. 85-100
- Hodgking, A. L., Huxley, A.F. (1952). **A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve.** *J.Physiol.* 117:500-544.
- Islas Andrade, S., Lifshitz Guinzberg A. (2002). **Diabetes Mellitus, Segunda Edicion, Mc Graw Hill Interamericana**, pp. 175-190.

- Josephson, I.R., Sanchez-Chapula, J., Brown, AM. (1984). **Early outward current in rat single ventricular cells.** *Circ Res.* 54:157-162
- Kaese, S., Verheude, S. (2012). **Cardiac electrophysiology in mice: a matter of size.** *Frontiers in physiology* 3, pp. 1-19
- Kennel, W. B., Mc Gee, D. L. (1979). **Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study.** *Circulation* 59: 8-13.
- Koeppen y Staton. (2009). **Berne y Levy Fisiologia.** Sexta edición. Elsevier.pp 293-307
- Lei, M., Honjo, H., Kodama, I., Boyett, MR. (2000). **Characterization of the transient outward K+ current in rabbit sinoatrial node cells.** *Cardiovascular Research* 46:433-441.
- López Serrano, AL. Marquez-Santiago, AY. Arroyo-Carmona, RE. López-Mayorga, RM. Avelino-Cruz, JE. Torres-Jácome, J. (2012) **Validación de un modelo de diabetes mellitus tipo 1 en raton macho inducido con estreptozotocina.** *Congreso Internacional de Ciencia e Innovación en Diabetes Mellitus, Cd de México septiembre 2012.*
- Mangoni, M., & Nargeot, J. (2001) **Properties of the hypopolarization-activated current (if) in isolated mouse sino-atrial cells.** *Cardiovascular Research* 52: 51-64.
- Mohrman, D., Heller, L. (2007) **Fisiologia Cardiovascular.** *Mc.Graw Hill Interamericana, sexta edicion.*
- Montiel Jaen, M. G. (2012) **Modelo de la cinética de canales dependientes de voltaje.** *Tesis de licenciatura.*
- Nerbonne, J., Guo, W. (2002) **Heterogeneous Expression of voltage-Gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias.** *J Cardiovasc Electrophysiol.* 13:406-409
- Nerbonne, J.M., Kass, R. (2005). **Molecular Physiology of Cardiac Repolarization.** *Physiol Rev* 85: 1205–1253.
- Niwa, N., Nerbonne, J. (2010). **Molecular determinants of cardiac transient outward potassium current (Ito) expression and regulation.** *Journal of molecular and cellular cardiology.* 48:12-25.
- Olivares-Reyes, JA., Arellano-Placarte, A. (2008) **Bases moleculares de las acciones de la insulina.** *REB* 27: 9-18

- Organización Mundial de la Salud (2012). Consultada en <http://www.who.int/es/>
- Sands. Z., Grottesi. A., Samson. M. (2005) **Voltage-gated ion channels**. *Current Biology*.15:2
- Satoh, H. (2003). **Sino-Atrial Nodal Cells of Mammalian Hearts: Ionic Currents and Gene Expression of Pacemaker Ionic Channels**, *J. Smooth Muscle Res* 39 (5): 175–193.
- Shimoni, Y., Rattner, J. B. (2001). **Type 1 diabetes leads to cytoskeleton changes that are reflected in insulin action on rat cardiac K1 currents**. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 281:E575-E585.
- Standards of medical Care in Diabetes, (2012), American Diabetes Association, 1:1
- Standards of medical Care in Diabetes, (2013), American Diabetes Association, 1:1
- Terlau, H., Stühmer, W. (1998). **Structure and function of voltage-gated ion channels**. *Naturwissenschaften* 85: 437-444.
- Torres- Jácome, J., Gallego, M., Rodríguez Robledo, J.M., Sánchez Chapula, J. A., Casis, O. (2013). **Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes**. *Acta Physiol* , 207, 447–459.
- Veglio, M., Chinaglia, A., Cavallo-Perin, P. (2004). **QT interval, cardiovascular risk factors and risk of death in diabetes**. *J Endocrinol Invest* 27:175-181.
- Verheijck, E. E., Van Kempen, J.A., Veereschild, M., Lurvink, J., Jongasma, H., J. Bouman, L. N. (2001). **Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution**. *Cardiovascular Research*, 52, 40–50.
- Xu, H., Guo, W., Nerbonne, J.M. (1999), **Four Kinetically distinct depolarization-activated K+ currents in adult mouse ventricular myocytes**, *J.Gen. Physiol* 113: 661-677.
- Xu. H., Li. H., Nerbonne. J.M. (1999) **Elimination of the transient outward current and action potential prolongation in mouse atrial myocytes expressing a dominant negative Kv4 $\alpha$  subunit**. *J Physiol*. 519:11-21
- Zhao, Z., Xie, Y., Wen, H., Dandan, X., Allen, C., Fefelova, N., Dun, W., Boyden, P., Qu, Z., Xie, L. (2012) **Role of the transient outward potassium current in the génesis of early afterdepolarizations in cardiac cells**. *Cardiovascular Research* 95: 308-316.

- Zhang, Y., Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Wang, H., Bai, Y., Wang, J., Zhang, H., Yang, B., Wang, Z. (2007). **Ionic Mechanisms Underlying Abnormal QT Prolongation and the Associated Arrhythmias in Diabetic Rabbits: A Role of Rapid Delayed Rectifier K<sup>+</sup> Current.** *Cell Physiol Biochem*, 19:225-238.

## **Anexo**

### **1. Modelo de diabetes mellitus tipo 1 en ratón macho CD1**

Todos los animales utilizados para el presente trabajo tuvieron un seguimiento correspondiente al modelo animal de diabetes caracterizado en el laboratorio de fisiopatología cardiovascular. La duración del tratamiento fue de 10 semanas

Se utilizaron ratones machos de la cepa CD1 de dos meses de edad que fueron separados en 2 grupos control y tratado con estreptozotocina que fueron administrados con solución salina isotónica y 120 mg/kg de estreptozotocina respectivamente, ambos por vía intraperitoneal.

Dos días después de la administración se les practicó a los animales una tira reactiva de orina con la finalidad de conocer si se presenta glucosuria, este procedimiento no invasivo permite conocer de modo indirecto si los animales presentan hiperglucemia. El 75% de los animales administrados presentan glucosuria a los 2 días, este parámetro permitió descartar animales en los que no fue exitosa la administración de estreptozotocina.

Los animales fueron caracterizados con los siguientes parámetros: peso, presencia de polidipsia, poliuria y polifagia, bioquímica clínica que incluye perfil lipídico y electrolitos séricos.

#### **1.1 Peso de los animales**

El peso de los animales se registró semanalmente y durante las 10 semanas correspondientes al tratamiento. Los animales diabéticos disminuyen de peso significativamente con respecto al control desde la semana 3 y con respecto al inicio del tratamiento desde la semana (Figura An1)

#### **1.2 Polidipsia, poliuria y polifagia**

Para conocer si los animales diabéticos presentan polidipsia, poliuria y polifagia, se realizó una jaula metabólica a los animales en la última semana de tratamiento, dicho análisis permito la medición del consumo de alimento y cuanto se excreta y defeca. Como resultado se obtuvo que los animales diabéticos beben más agua y consumen más alimento, y por tanto excretan más a comparación del grupo control (Tabla An1).

### 1.3 Bioquímica Clínica

Para realizar los análisis clínicos en sangre a los animales, se tomó una muestra de sangre antes del sacrificio, se cuantificó la concentración de glucosa, insulina, colesterol total, colesterol HDL y triglicéridos. Los resultados de estas mediciones fueron diferentes a significativamente en todos los parámetros de los animales diabéticos con respecto a los controles: la glucosa, colesterol total y triglicéridos se presentan elevados y la insulina y el colesterol HDL disminuidos (Tabla An2).

En adición, se cuantificó la concentración de electrolitos en suero, y los datos obtenidos en este análisis indican que no hay diferencias significativas entre los grupos de animales (Tabla An1).

Para el análisis de los datos de la concentración de glucosa en sangre, se realizó un histograma de frecuencias con los datos obtenidos de la concentración de glucosa en sangre de todos los animales (controles y administrados con estreptozotocina) y mediante un ajuste de Gauss, se encontraron dos poblaciones estadísticamente diferentes. La población control tuvo un promedio de  $183.4 \pm 13$  mg/dL en sangre y la población de animales tratados con estreptozotocina tuvo un promedio de  $768.9 \pm 60$  mg/dL. Este tratamiento a los datos, permitió discriminar a los animales como diabéticos con una glucosa mayor a 400 mg/dL, además de evitar falsos positivos (Fig. An1)

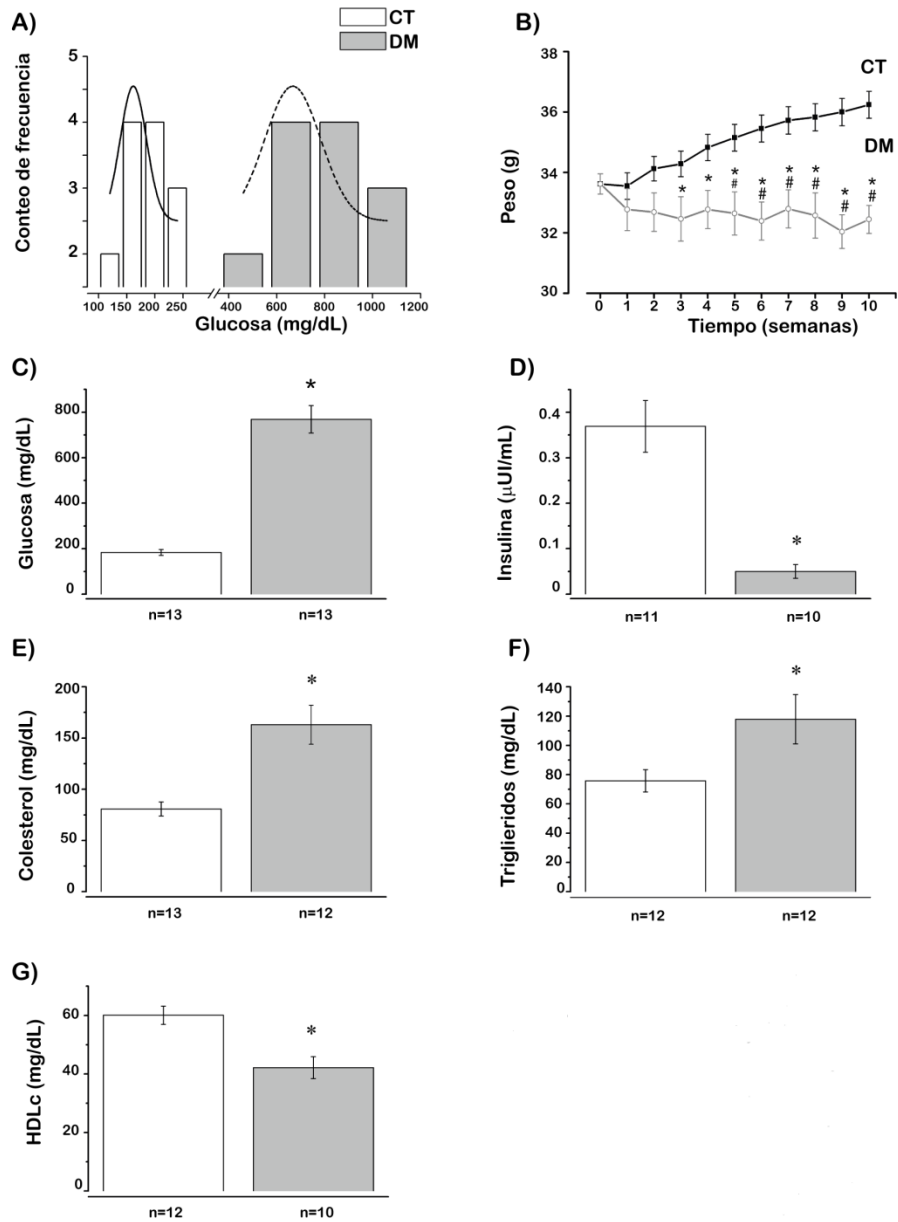
La metodología utilizada para la cuantificación de glucosa, triglicéridos y colesterol, es mediante colorimetría, los reactivos utilizados son los siguientes:

- Glucosa: glucosa oxidasa
- Colesterol total: colesterol esterasa
- Triglicéridos: fosfotungstato
- Colesterol HDL: lipoproteína lipasa

Para la determinación de la concentración de insulina de ratones controles y diabéticos, se utiliza la técnica de quimioluminiscencia, que consiste en un ensayo de Elisa.

<b>Tabla An1. Jaula Metabólica</b>		
	Control (n=33)	Diabético (n=21)
<b>Agua consumida (ml)</b>	6 ± 0.4	60 ± 7 *
<b>Alimento consumido (g)</b>	5 ± 0.2	8 ± 0.7 *
<b>Heces excretadas (g)</b>	1.8 ± 0.2	5 ± 0.5 *
<b>Orina Excretada (ml)</b>	0.4 ± 0.1	40 ± 6 *
<b>Electrolitos séricos</b>		
	Control (n=5)	Diabético (n=6)
<b>Sodio (mmol /l)</b>	149 ±1	154 ± 4
<b>Potasio (mmol/l)</b>	9 ±0.5	15 ±4
<b>Cloro (mmol/l)</b>	115 ± 2	115 ±4
<b>Calcio (mg/dl)</b>	9.4 ± 0.2	9.5±0.6
<b>Media ± EEM * T-Student p&lt;0.05</b>		

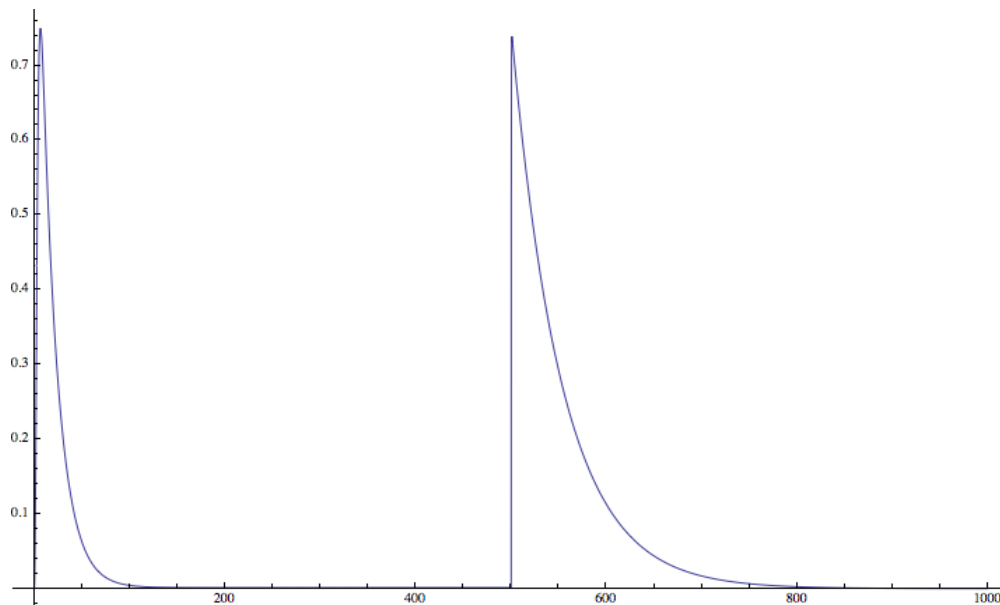
<b>Tabla An2. Bioquímica clínica de ratón control y diabético.</b>		
<b>Parámetro</b>	<b>Ratón control</b>	<b>Ratón diabético</b>
<b>Glucosa (mg/dl)</b>	183.4±13.04 (13)	768.9±60 (13) *
<b>Insulina (µUI)</b>	0.36±0.05 (11)	0.05±0.01 (10) *
<b>Triglicéridos (mg/dl)</b>	87.41 ± 13.53 (12)	104±16.8 (12) *
<b>Colesterol (mg/dl)</b>	80.75 ± 6.81 (13)	163±19 (12)*
<b>HDL (mg/dl)</b>	60 ± 3.11 (12)	50.53 ± 5.2 (10)*
<b>Media ± ESM *p&lt; 0.05 T-Student</b>		



**Figura An1. Caracterización del modelo animal de diabetes tipo 1 en ratón. A.** Histograma de frecuencias y ajuste de Gauss para los datos de glucosa en sangre de los animales. **B.** Peso registrado en los animales a través de 10 semanas, notándose una disminución significativa desde la quinta semana. **C.** Glucosa aumentada en ratones tratados con estreptozotocina. **D.** Insulina disminuida en ratón diabético. **E.** Colesterol total y **F.** Triglicéridos están elevados en ratones diabéticos. **G.** Colesterol HDLc está disminuido en diabetes. **Media  $\pm$  ESM \* T-Student  $p < 0.05$**

## 2. Modelo de la cinética de canales

Se utilizaron los datos obtenidos de la velocidad de transición en los estados del canal de  $I_{to}$  y se graficaron en el programa Mathematica en un modelo generado en el trabajo de Montiel Jaen G. (2012). Los valores utilizados corresponden a la velocidad de transición a 50 mV, y se obtuvo un gráfico que reproduce los datos experimentales obtenidos en el presente trabajo (Fi. An2).



**Figura An2. Modelo de la corriente  $I_{to}$ .** En el gráfico podemos ver como se reproducen los datos obtenidos experimentalmente a 50 mV de la corriente  $I_{to}$ ,