



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

**“REMODELACIÓN ELÉCTRICA DEL NODO SENO AURICULAR OCASIONADA
POR LA DIABETES MELLITUS”**

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE
LICENCIATURA EN FARMACIA**

PRESENTA

DAVID MEDEL CAJICA

ASESORES DE TESIS

cDRA. ROSA ELENA ARROYO CARMONA

DR. JULIAN TORRES JÁCOME

DICIEMBRE 2015

DEDICATORIA

Para mi familia, amigos y personas importantes en mi vida, quisiera dedicar mi tesis a ustedes que me apoyaron, valoraron y confiaron. Todo este trabajo tan importante es gracias a ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Primero quisiera agradecer a mi director de tesis el Dr. Julián Torres Jácome por brindarme todo su apoyo y dedicación en la realización de este proyecto, además de haberme permitido ser parte de su equipo de trabajo, que para mi ha sido una gran experiencia no solo educativa, si no de vida.

Asimismo, agradezco a mi directora de tesis la Dra. Rosa Elena Arroyo Carmona, la Dra. Alondra Albarado Ibañez y a la M.C. Ana Laura López Serrano por su apoyo laboral, personal y humano, recordándome que todo lo que uno se proponga puede lograrse con esfuerzo y dedicación, además de aprender a no darme por vencido.

A la vicerrectoría de investigación y estudios de posgrado de la benemérita universidad autónoma de Puebla por la beca otorgada para la realización de esta tesis.

Gracias a mis revisores de tesis la Dra. María Isabel Martínez García, el M.C. Félix Luna Morales y al Dr. I. Daniel Limón Pérez de León por las aportaciones dadas a este trabajo.

Pero este trabajo es resultado también de personas que me estiman y me apoyan, que sin ellos no hubiera podido terminar.

Gracias a mis padres el Sr. Alejandro Medel y la Sra. Juliana Cajica, mis hermanos Alex, Adriana, Pili, Judith y Alberto y a toda mi familia, porque ellos son la razón de este trabajo, los que me motivan y quiero mucho.

También agradezco a Gisela y Brenda que no solo fueron amigas en la carrera, si no también compañeras en el laboratorio, que estuvieron en los momentos buenos y malos, haciéndonos compañía y motivándonos a ser mejores y sobresalir, gracias por acompañarme en esta etapa de mi vida.

A mis amigos de la carrera Lili, Fermín, Chucho, Cristina, Laurita y Citlali, por los buenos momentos que vivimos y que espero sigamos teniendo.

Y por ultimo, a mis amigos de hace mucho tiempo y que siempre han estado cuando se necesita German, Miriam, Carlos, Beto, Luisa, Johana y Aldo.

A Todos Ustedes, Muchas Gracias.

Abreviaturas

- AD – Aurícula derecha
- ADN – Acido Desoxiribonucleico
- AI – Aurícula izquierda
- ATP – Adenosin Trifosfato
- CaCl – Cloruro de calcio
- CO₂ – Dióxido de carbono
- CT- *Crista terminalis*
- Cx – Conexina
- DM – Diabetes mellitus
- DPA – Duración del potencial de acción
- ECG – Electrocardiograma
- ECV – Enfermedades cardiovasculares
- EEM – Error estándar de la media
- TGF-Beta - Factor de crecimiento transformante beta
- GAD – Descarboxilasa de acido glutámico
- GLUT 2 – Transportador de glucosa 2
- HLA - Antígenos leucocitarios humanos
- I_f – Corriente Marcapaso
- I_{Ca-L} – Corriente de calcio tipo L
- I_{Ca-T} – Corriente de calcio tipo T
- I_K – Corriente de potasio
- I_{Kr} - Corriente rectificadora tardía
- I_{Kslow} – Corriente de potasio lenta
- I_{Na-Ca} - Corriente del intercambiador Sodio-Calcio
- I_{to, fast} – Corriente transitoria de salida de potasio rápida
- I_{to, slow} - Corriente transitoria de salida de potasio lenta
- ICV – Vena cava inferior
- KCl – Cloruro de potasio
- MgCl – Cloruro de magnesio
- NaCl – Cloruro de sodio
- NAD⁺ · Nicotinamida adenina dinucleótido
- NaHCO₃ – Bicarbonato de sodio
- Na₂HPO₄ – Fosfato acido disódico
- NAV – Nodo Auriculoventricular
- NF-kB - Factor de transcripción nuclear kappa B
- NSA – Nodo Senoauricular
- O₂ – Oxígeno

- PA - Potencial de acción
- R_i – Resistencia interna
- R_m – Resistencia de la membrana
- R_{total} – Resistencia total
- SC – Seno coronario
- SCV – Vena cava superior
- STZ – Estreptozotocina
- VCI – Vena cava inferior
- VCS – Vena cava superior
- VD – Ventrículo derecho
- VI – Ventrículo izquierdo

Índice

- 1. Resumen**
- 2. introducción**
 - 2.1. Sistema cardiovascular**
 - 2.2. Sistema de conducción cardiaco**
 - 2.3. Electrocardiograma**
 - 2.4. Velocidad de conducción**
 - 2.5. Propiedades eléctricas pasivas de la membrana**
 - 2.6. Propiedades eléctricas activas de la membrana**
 - 2.7. Remodelación cardiaca**
- 3. Diabetes mellitus**
 - 3.1 Definición y clasificación**
 - 3.2 Diabetes mellitus tipo 1**
 - 3.3 Diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares**
- 4. Nodo senoauricular de ratón**
- 5. Antecedentes**
- 6. Justificación**
- 7. Hipótesis**
- 8. Objetivo general**
 - 8.1. Objetivos Particulares**
- 9. Esquema de trabajo**
 - 9.1. Análisis de datos**
- 10. Material y métodos**
 - 10.1. Modelo animal**
 - 10.2. Preparación de ambos nodos**
 - 10.3. Registro electrofisiológico**
 - 10.4. Registro de velocidad de conducción**
 - 10.4.1 Análisis de datos de velocidad de conducción**
 - 10.5. Registro de resistencia de entrada**
 - 10.5.1. Análisis de datos de resistencia de entrada**
 - 10.6. Excitabilidad de la célula**

10.7. Constante de tiempo

11.Resultados

10.1 Modelo de diabetes mellitus

10.2 Velocidad de conducción

10.3 Resistencia de entrada

10.4 Excitabilidad de las células cardiacas

10.5 Constante de tiempo

12.Discusión de Resultados

13.Conclusión

14.Bibliografía

1. Resumen

La diabetes mellitus es una enfermedad que provoca arritmias cardiacas como resultado de una remodelación cardiaca tanto estructural como eléctrica. Esta remodelación puede ser debida a cambios en las propiedades pasivas de la membrana celular, por ejemplo al cambiar la resistencia de entrada se altera la velocidad de conducción del potencial de acción. En el laboratorio de fisiopatología cardiovascular se ha desarrollado un modelo de ratón diabético tipo1 inducido con estreptozotocina (STZ) en el cual se ha reportado una disminución en la frecuencia cardiaca, mientras que al registrar el NSA aislado se reportó un aumento en la frecuencia de disparo en animales diabéticos. Estos resultados parecieran contradictorios ya que al disminuir la frecuencia cardiaca se esperaría que la frecuencia de disparo del marcapasos principal del corazón, el nodo seno auricular también estuviera disminuida. Sin embargo, con este trabajo esta contradicción pudo ser explicada midiendo la velocidad de conducción del NSA al NAV y la excitabilidad de las células cardiacas. Al medir la excitabilidad de las células del NSA se encontró que en los animales diabéticos la velocidad de conducción disminuyó por la diabetes mellitus tipo 1 (178 cm/s en los diabéticos vs 500 cm/s en controles). Para la evaluar la excitabilidad de la célula se construyó una curva corriente umbral vs resistencia de entrada donde se pudo observar que la excitabilidad de las células cardiacas del NSA de los animales diabéticos necesitan menos corriente para generar un potencial de acción en comparación con los animales control. Así, al aumentar la frecuencia de disparo del NSA y disminuir la velocidad a la que se propagan los potenciales de acción, no se aumenta la frecuencia cardiaca.

2. Introducción

2.1. Sistema cardiovascular

El sistema cardiovascular transporta y distribuye sustancias esenciales a los tejidos, además de participar en la eliminación de productos de desecho metabólico usando el flujo sanguíneo. Participa en la regulación de la temperatura corporal, mantenimiento del equilibrio de líquidos y en el aporte de oxígeno y nutrientes (Koeppen y Stanton, 2008). El sistema cardiovascular está constituido por los vasos sanguíneos y una bomba que es el corazón (Hall y Guyton, 2011).

El corazón envía la sangre que contiene nutrientes y oxígeno (al 98%) a todos los órganos por la aorta. La sangre no oxigenada (con CO₂) regresa al corazón por medio de la vena cava superior e inferior, esta circulación persiste en un ciclo. El bombeo es eficiente cuando las células musculares cardíacas se contraen de manera sincrónica (Mohrman y Heller, 2006). La sincronía comienza con la contracción de las aurículas llenas de sangre, inmediatamente la sangre llena los ventrículos que se contraen del ápex a la base (Sengupta y Khandheria, 2006).

La contracción de las células cardíacas inicia con un estímulo eléctrico que se propaga a través de la membrana celular, y permite la entrada de iones de calcio por los canales tipo L al interior de la célula. El calcio que entra a la célula, activa a los receptores de rianodina, que se localizan en el retículo sarcoplásmico, generando la liberación de calcio. Al aumentar la concentración de calcio intracelular se inicia el acople excitación-contracción (Koeppen y Stanton, 2008). Por lo antes dicho, la generación y propagación del estímulo sincroniza la contracción del corazón. En el corazón, el estímulo eléctrico o potencial de acción, se genera y propaga en un sistema especializado llamado sistema de conducción cardíaco.

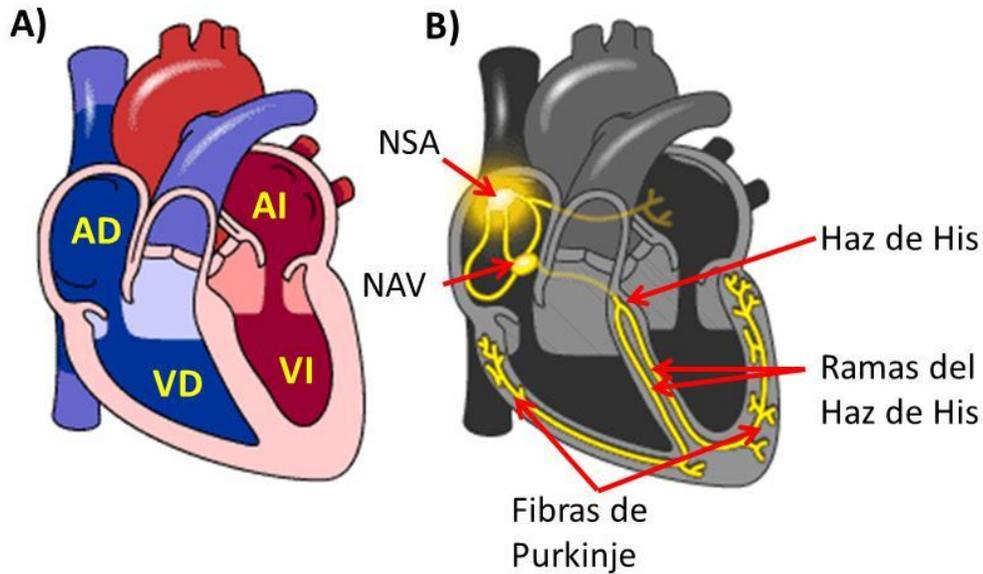


Figura 1. Función de bomba y sistema de conducción en el corazón. A) Muestra el llenado y vaciamiento de sangre en las cavidades del corazón (AD-aurícula derecha, AI-aurícula izquierda, VD-ventrículo derecho y VI-ventrículo izquierdo). **B)** El sistema de conducción cardíaco genera y propaga el potencial de acción que es necesario para el acople Excitación-contracción y que el corazón actúe como una bomba.

2.2. Sistema de conducción cardíaco

El potencial de acción se origina en el nodo senoauricular (NSA) también conocido como el marcapasos principal del corazón, este tejido tiene la propiedad de generar su propio estímulo (automatismo) y su frecuencia de disparo es casi constante. En el humano, el NSA mide aproximadamente 8 mm de diámetro y 2 mm de grosor (Koeppen y Stanton, 2008).

En el NSA, el potencial de acción se propaga de la zona central a la zona periférica y pared auricular, de manera uniforme. La conducción del potencial de acción del NSA al nodo auriculoventricular (NAV) se da a través de los haces interauriculares. El haz anterior (haz de Backman) que rodea la parte superior de la aurícula derecha e izquierda, el haz medio (haz de Wenckebach) se difunde por la parte de atrás de la vena cava superior y el haz posterior (haz de Thorel) que se dirige hacia la *crista terminalis*. El NAV presenta un retraso en la propagación del

potencial de acción, continuándose hacia el haz de His que se expande por el septum interventricular dividiéndose en ramas izquierda y derecha (Iturralde, 1997). Las ramas (derecha e izquierda) del Haz de His, por último se dividen en una red de fibras llamadas fibras de Purkinje (Berne y Levy, 1977), que se extenderán a todo el endocardio, mediomiocardio y epicardio (Yan y Antzelevitch, 1998).

2.3. Electrocardiograma

La actividad eléctrica del corazón puede ser evaluada mediante un registro de electrocardiograma (ECG) que es un registro de los cambios de voltaje con respecto al tiempo, que se miden en la superficie del cuerpo, producto de la propagación del potencial de acción a través del corazón durante un ciclo cardiaco (Mohrman y Heller, 2006).

El registro de ECG está formado por ondas, intervalos y segmentos (ver Figura 2). La onda P representa la despolarización auricular, el complejo QRS se asocia a la despolarización ventricular y la onda T con la repolarización ventricular (Koeppen y Stanton, 2008).

El intervalo PR se mide desde el inicio de la onda P hasta el inicio de la onda Q indicando la activación auricular y del NAV. El intervalo QRS representa la duración de la despolarización de la primera a la última porción ventricular, que se mide desde el inicio de la onda Q hasta el fin de la onda S. El intervalo QT inicia en la onda Q hasta el fin de la onda T e indica la despolarización y repolarización ventricular (Koeppen y Stanton, 2008).

El segmento PR se ubica en el término de la onda P y el inicio de la onda Q, que indica la conducción hacia el NAV (Luthra, 2012). Por último, el segmento ST se encuentra entre el final de la onda S y el inicio de la onda T, representando la despolarización del miocardio ventricular (Kusumoto y Bernath, 2012).

El cambio en la duración o morfología de las ondas, segmentos e intervalos del ECG, se puede interpretar como cambios en la morfología, conducción y propagación del potencial de acción.

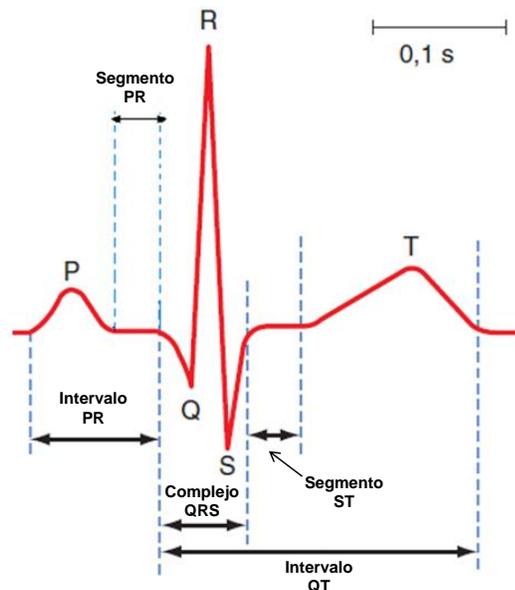


Figura 2. ECG de humano. Muestra las diferentes ondas (P, T y complejo QRS), segmentos (PR y ST) e intervalos (PR y QT) que componen un ECG (modificado de Koepfen y Stanton, 2008).

2.4. Velocidad de conducción

La distancia que recorre un potencial de acción entre el tiempo que tarda en recorrerla se le llama velocidad de conducción o de propagación (Mohrman y Heller, 2006).

La velocidad de conducción depende directamente del tipo de tejido o células, de la máxima velocidad de despolarización (cambio de voltaje en el tiempo) y de las propiedades pasivas de la membrana. En el NSA se observa que la velocidad de conducción es menor comparándola con fibra de Purkinje, debido a la diferencia de diámetro de sus células (Blaustein y cols., 2012; Mohrman y Heller, 2006).

En el corazón de humano la mayor velocidad de propagación se presenta en el sistema His-Purkinje con un valor de 150 a 400 cm/s, seguida del NSA que

su velocidad de conducción es de 100 cm/s y por último el NAV con una velocidad de 5 cm/s (Iturralde, 1997).

2.5. Propiedades eléctricas pasivas de la membrana

Se conocen como propiedades eléctricas pasivas de la membrana aquellas que no cambian cuando las células se mantienen cerca del potencial de membrana en reposo (Blaustein y cols., 2004) y estas son: la resistencia de entrada de la membrana (R_m) que determina el cambio de voltaje de la membrana cuando se aplica un pulso de corriente (Sanes y cols., 2012), resistencia interna (R_i) o del citoplasma y la capacitancia de la membrana (C_m) (Blaustein y cols., 2004). Cuando se aplica una corriente subumbral a las células, el cambio de voltaje y su propagación en la membrana está determinada por las propiedades pasivas, es decir, la forma como se propaga el voltaje en la célula lo establecen la resistencia de entrada, C_m y la R_i . A la propagación de este voltaje se le llama potencial electrotónico o electrotono y está determinado por: la constante de tiempo de la membrana que se obtiene con la Fórmula 1, es el tiempo necesario para alcanzar el 63% de voltaje después de aplicar un pulso de corriente en la célula (Blaustein y cols., 2004) e indica la rapidez con que producirá el cambio de voltaje (Sanes y cols., 2012) y la constante de espacio que puede ser calculada con la Fórmula 2 e indica la distancia que alcanza el cambio de voltaje a lo largo de la membrana (Blaustein y cols., 2012).

$$(\tau = R_m C_m)$$

Fórmula 1. Donde τ es la constante de tiempo, R_m es la resistencia de la membrana y C_m es la capacitancia de la membrana

$$\left(\lambda = \sqrt{\frac{R_m}{R_i + R_o}} \right)$$

Fórmula 2. Donde λ es la constante de tiempo, R_m es la resistencia de entrada de la membrana, R_i es la resistencia interna y R_o es la resistencia externa.

El sistema de conducción cardiaco se puede considerar como un cable eléctrico, este cable es representado por las células conectadas entre sí por uniones comunicantes (gap junctions) de baja resistencia por donde viaja el potencial de acción, además de iones y proteínas (Kelley, 1992).

El corazón se caracteriza por tener propiedades eléctricas pasivas que regulan la propagación del estímulo como son la resistencia de entrada de la membrana, R_i y resistencia que se genera entre las uniones comunicantes (Bayés y cols., 2003).

La resistencia de entrada de la membrana dependerá del funcionamiento de las conexinas (Cx), de la estructura anatómica de la célula y la unión que muestren entre miocitos y fibroblastos además de los componentes de la matriz extracelular como elastina y colágeno (Latorre y cols., 1996; Gaudesius y cols., 2003). De la definición de constante de tiempo se puede observar que este parámetro cambia si la resistencia de entrada se altera. Durante la generación y duración del potencial de acción, la constante de tiempo va a cambiar.

2.6. Propiedades eléctricas activas de la membrana

Las propiedades activas de la membrana son las que cambian antes o durante la generación de un potencial de acción y afectan la velocidad de conducción (Cardinali, 2007). El parámetro que determina cambios en la velocidad de conducción es la velocidad máxima de despolarización, que se asocia con la máxima corriente que contribuye en la fase 0 (Ayache y cols., 2009). En el NSA la velocidad máxima de despolarización es menor que en fibras de Purkinje (Mohrman y Heller, 2006) ya que la corriente que participa en la fase 0 del potencial de acción (corriente de sodio) es menor su densidad en NSA que en fibras de Purkinje (Bartos y cols., 2015).

2.7. Remodelación cardiaca

Los cambios generados en las propiedades eléctricas pasivas y activas de la membrana celular producen una remodelación cardiaca ocasionada por cambios

estructurales y eléctricos, es dividida en remodelación primaria y secundaria (Cutler y cols., 2011).

La remodelación cardíaca primaria es aquella que es ocasionada por cambios en las propiedades electrofisiológicas del corazón en respuesta a un cambio en la secuencia de activación eléctrica, mientras que la remodelación secundaria es aquella que es ocasionada por una alteración estructural en el corazón (Cutler y cols., 2011).

En la diabetes mellitus puede desarrollarse remodelación eléctrica primaria y secundaria, ocasionada por la sobre expresión del factor de crecimiento transformante beta (TGF-beta) que es una proteína que controla el crecimiento celular, así incrementando los niveles de colágeno y matriz celular. En un estudio realizado en aurícula izquierda de rata diabética se determinó que las remodelaciones estructurales que se presentan son: fibrosis auricular, conducción anormal además de cambios en la expresión y distribución de Cx 43 (Zhang y cols., 2014).

Así, los diversos factores que afectan la velocidad de conducción cardíaca en la diabetes mellitus, originan arritmias que son provocadas por desórdenes en la actividad eléctrica del corazón (Mohrman y Heller, 2006).

3. Diabetes mellitus

3.1. Definición y clasificación

La diabetes mellitus es un grupo de enfermedades metabólicas caracterizadas por hiperglucemia a causa de la deficiencia en la secreción de insulina, acción de la insulina o ambas (American Diabetes Association, 2014). La hiperglucemia crónica en la diabetes mellitus deteriora varios órganos como los ojos, riñones, corazón, vasos sanguíneos y nervios. Las alteraciones en el metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas en la diabetes mellitus son provocadas por una ineficaz acción de la insulina en los órganos diana, mientras que los altos niveles de glucosa en

sangre ocasionan poliuria, polidipsia, polifagia, pérdida de peso y visión borrosa (American Diabetes Association, 2014).

La diabetes mellitus se puede clasificar en cuatro tipos:

- ▶ Diabetes mellitus tipo 1, dada por la destrucción de las células beta del páncreas, donde hay ausencia de insulina.
- ▶ Diabetes mellitus tipo 2, donde se presenta una disminución progresiva de secreción de insulina o una resistencia a esta.
- ▶ Diabetes mellitus gestacional, este tipo de diabetes se presenta en la etapa de embarazo.
- ▶ Diabetes mellitus con causas diferentes como, alteraciones genéticas en las células beta, en la acción de la insulina, enfermedades del páncreas y provocada por agentes externos como fármacos u otras sustancias (American Diabetes Association, 2014).

3.2. Diabetes mellitus tipo 1

Este tipo de diabetes mellitus es causada por una deficiencia absoluta de insulina, causada por la destrucción de las células beta pancreáticas por autoanticuerpos a las células de los islotes de Langerhans, a la insulina, a la descarboxilasa de ácido glutámico (GAD) y la tirosina fosfatasa. Esta enfermedad se relaciona con alteraciones en los antígenos leucocitarios humanos (HLA) que definen lo propio de lo ajeno (American Diabetes Association, 2014).

La diabetes tipo 1 abarca del 5 al 10% del total de población con diabetes mellitus, la tasa de destrucción de células beta pancreáticas es lenta en adultos mientras que en niños y adolescentes es rápida (American Diabetes Association, 2014).

Los síntomas clínicos que caracterizan a la diabetes mellitus tipo 1 se presentan cuando las células beta han sido destruidas del 80 al 90%, lo que significa una disminución en la secreción de insulina menor al 10% (Manell, 2013).

En algunos casos de diabetes mellitus tipo 1, su origen no es conocido, y los pacientes presentan insulinoopenia, cetoacidosis pero no hay autoinmunidad hacia las células beta pancreáticas ni está relacionado con alteraciones en HLA. Este tipo de diabetes es heredada y se presenta en individuos con descendencia africana y asiática (American Diabetes Association, 2014).

3.3. Diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares

La diabetes mellitus es uno de los principales factores de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares (ECV). En el estudio Framingham, realizado por el Instituto Nacional de Salud en Estados Unidos, desde 1950 se reportó que la incidencia de muertes por ECV en pacientes masculinos fue 2 veces mayor en pacientes con diabetes mellitus que pacientes no diabéticos que ya habían sido hospitalizados por problemas cardiovasculares. En mujeres, la incidencia fue de casi 3 veces más en pacientes con diabetes mellitus (Kannel y McGee, 1979).

4. Nodo senoauricular de ratón

El NSA de ratón se ubica en el endocardio, entre la vena cava superior e inferior junto a la aurícula derecha. Existen células especializadas en este tejido que se nombran células nodales o marcapasos primario y que son capaces de generar su propio estímulo eléctrico. Las corrientes iónicas que participan en la generación del potencial de acción marcapasos son: corriente de calcio ($I_{Ca,T}$ e $I_{Ca,L}$), corriente de potasio (I_{K1} e I_{KCh}), corriente del intercambiador Sodio-Calcio (I_{Na-Ca}) y la corriente marcapasos (I_f). El NAV al igual que el NSA puede generar también su propio estímulo en caso de que el NSA fallara, la diferencia entre los 2 nodos es que la densidad de la I_f es menor en un 52% que en el NSA, mientras que en la corriente rectificadora tardía (I_{Kr}) es mayor en un 53% con respecto al NSA (Marger y cols., 2011). En el ratón las células marcapasos miden 300X150

μm y una altura de $50 \mu\text{m}$, obteniendo un volumen de $2.2 \times 10^6 \mu\text{m}^3$ (Verheijck y cols., 2001).

La propagación del potencial de acción en el NSA se da en forma craneal desde la zona del marcapasos primario hacia la zona transicional, dirigiéndose a la *crista terminalis* y *septum* interauricular (Lei y cols., 2005), luego el potencial de acción se conduce hacia el NAV por los tres haces nodales (Iturralde, 1997). Verheijck y cols., determinaron la velocidad de conducción del potencial de acción dentro del NSA, reportaron que la velocidad de propagación depende de la zona de registro, es decir que conforme se aleja del sitio marcapasos primario, la velocidad de conducción aumenta.

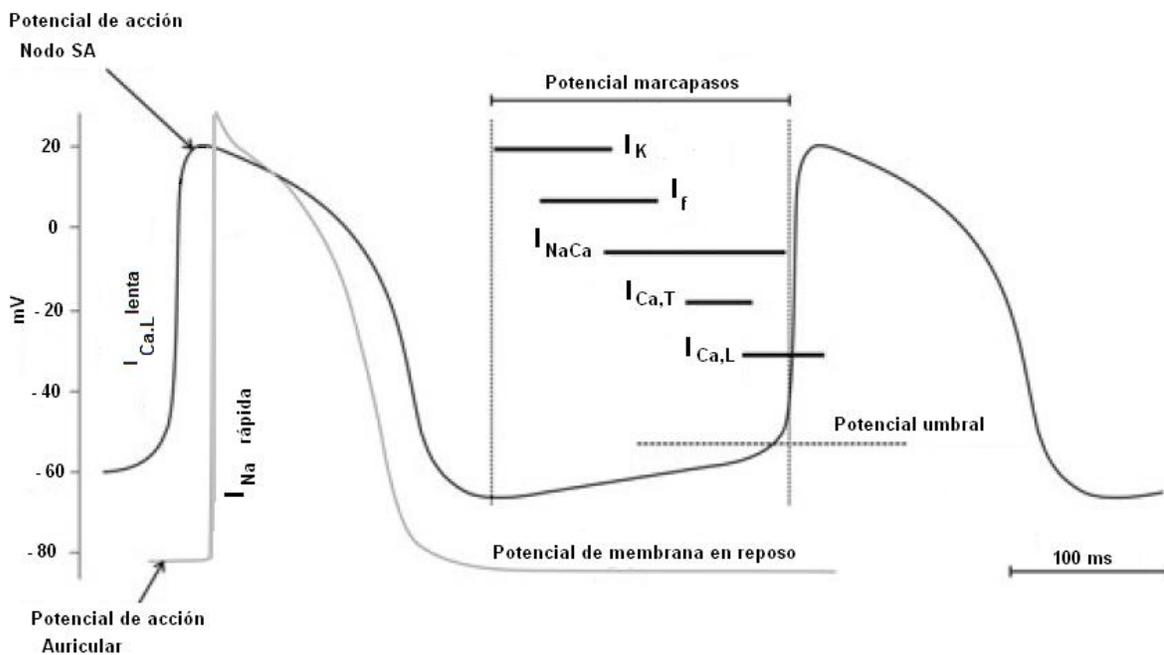


Figura 2. Potencial de acción marcapasos vs potencial de acción auricular. En el potencial de acción de una célula marcapasos del nodo SA de ratón la despolarización diastólica lenta (potencial marcapasos) es generada por un balance entre la activación de las corrientes de entrada (I_f , $I_{Ca,T}$, $I_{Ca,L}$, I_{st}) y la inactivación de las corrientes de salida (I_{kr} e I_{kslow}) [Cho,2003; imagen modificada de Monfredi, 2010].

En el sitio marcapasos del NSA de ratón se encontró una velocidad de conducción cerca de 5-6.5 cm/s y en la zona periférica, la velocidad de conducción incrementa a 8-9 cm/s en ratón (Verheijck y cols., 2001).

Otro factor que afecta la conducción son cambios en las Cxs, en el ratón se reportó que la Cx 40 y 45 se expresa en NSA y NAV de ratón, en su extensión posterior. Específicamente para ratones se determinó que la Cx 30.2 es restringida solo para sistema de conducción cardíaco, que se expresa en NSA, NAV y en el inicio de la aurícula, además hubo un solapamiento en la expresión de Cx 30.2 y 40 en el NAV, haz de His y sus ramas (Kreuzberg y cols., 2006). En otro estudio, la expresión de Cx 45 se presentó en el área marcapasos del NSA, también en filamentos de las células cardíacas además de Cx 40 y 43 (Verheijck y cols., 2001).

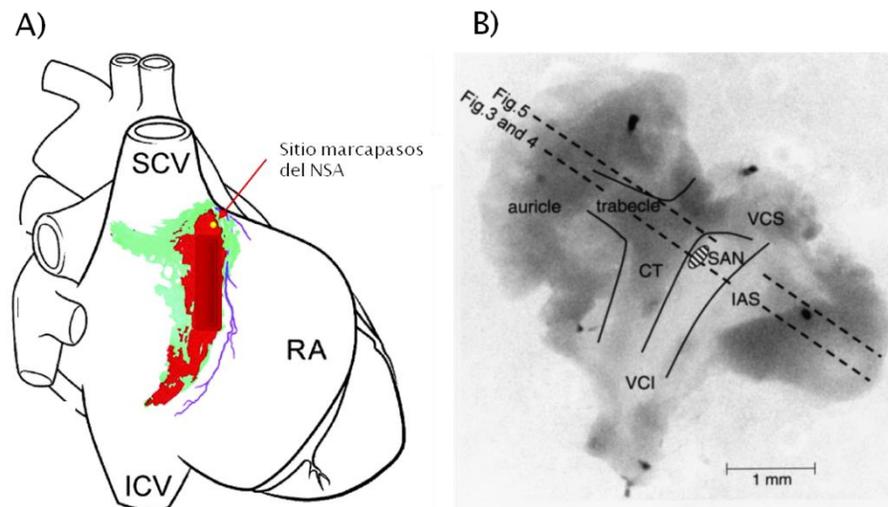


Figura 3. Ubicación y disección del nodo senoauricular. A) Localización del NSA en el corazón, se encuentra entre la vena cava superior (SCV) y vena cava inferior (ICV) (modificado de Dobrzynski, 2007) **B)** Disección del nodo senoauricular (SAN) de ratón basándose en su localización propuesta por Verheijck en el 2001.

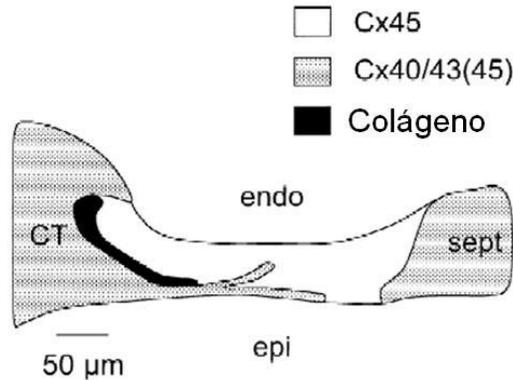


Figura 4. Distribución de los diferentes tipos de Cx en el NSA. Como se observa, la Cx 45 se encuentra en mayor proporción en el NSA, mientras que la Cx 40 y 43 se encuentran en mayor proporción en la *crista terminalis* (CT) y el *septum* (sept) (Verheijck y cols. 2001).

Con respecto a la velocidad máxima de despolarización, en el NSA de ratón se reportó un valor de 6.2 V/s, este valor es lento comparado con NSA de conejo que tiene una velocidad máxima de despolarización de 10 V/s y en fibras de Purkinje de perro un valor de 500 V/s (Aronson y Cranefield, 1973; Boyett y cols., 2000; Verheijck y cols., 2001). Estos valores nos dan una idea de cómo es la propagación del potencial de acción en estos tejidos, a mayor velocidad máxima de despolarización mayor es la velocidad de conducción.

5. Diabetes experimental

Para estudiar los efectos de la diabetes mellitus sobre el sistema cardiovascular, específicamente en corazón, se han diseñado modelos animales, como el modelo de diabetes mellitus en ratón inducido por STZ.

La STZ producida por *Streptomyces achromogenes* y utilizado como un agente anticancerígeno a nivel de los islotes pancreáticos y otros tumores malignos, se descubrió que actuaba como un agente diabetogénico reportado por Rakietyen y cols., en 1963, así fue como se empezó a utilizar para la inducción de diabetes mellitus en varias especies animales (Eleazu, 2013).

Este fármaco es transportado por el GLUT 2 que se encuentra principalmente en páncreas, siendo su blanco principal, además de estar en hígado y riñón. La STZ es citotóxico para células beta del páncreas donde tiene su acción de 2 a 70 horas después de su administración (Eleazu, 2013).

La destrucción de las células beta del páncreas por STZ se da por diferentes vías. La metilación del ADN se da en la posición Oxígeno-6 de la guanina, al transferir un grupo metilo, por parte de la molécula de metilnitrosourea, dañando al ADN. Para reparar la metilación del ADN se utiliza un proceso donde participa la enzima Poli-ADP-ribosa polimerasa, que utiliza NAD⁺ como sustrato, que al disminuirse, también va reducirse la cantidad de ATP, lo cual va a ocasionar que se agote la energía celular, provocando una necrosis (muerte de las células beta por colapso energético, Eleazu, 2013).

La muerte de las células beta también se debe a que la STZ actúa como donante de óxido nítrico, inhibiendo la aconitasa y provocando metilación al ADN y muerte de la célula. Otro de los mecanismos por el cual hay destrucción de células beta es la formación de especies reactivas como hidroxilo y superóxido, que surgen a partir de la disminución de enzimas que actúan sobre el peróxido de hidrógeno que son la catalasa y glutatión peroxidasa, que impiden la formación de estos radicales libres (Eleazu, 2013).

Otro mecanismo que provoca la muerte celular es mediante la alteración de factor de transcripción nuclear kappa B (NF-κB; controla la transcripción de ADN y que responde a estímulos como infección bacteriana o viral, radicales libres, entre otros). En hígado también provoca muerte celular, por un aumento en la actividad de la caspasa-3 (mediador en procesos de apoptosis, Eleazu, 2013).

En un modelo de ratón diabético tipo 1 inducido experimentalmente con STZ al registrar los potenciales de acción ventriculares se reportó un aumento en la duración del potencial de acción (DPA) al 30%, 50% y 90% de ratones tratados con respecto a controles. En las corrientes repolarizantes de potasio $I_{to, fast}$, $I_{to, slow}$ e I_{Kslow} disminuyó la densidad de corriente (Torres-Jácome, 2013).

En NSA de ratón diabético, (DPA) en la zona transicional al 10% y al 30% aumentó mientras que al 90% disminuyó. En la zona marcapasos primario, la DPA al 10%, 60% y 90% disminuyó en animales diabéticos con respecto a controles (Arroyo-Carmona, 2013). Así mismo, se han registrado alteraciones en el ECG, observando una disminución en la frecuencia cardíaca (390 L/min en control vs 330 L/min en diabéticos) en un 15% en animales diabéticos (ver Figura 4), específicamente en el intervalo PQ de ratones control la duración fue de 35 ms mientras que en animales diabéticos fue de 42 ms (Arroyo-Carmona, 2013), lo que nos indicaría un posible aumento en el tiempo de propagación del potencial de acción entre el NSA y NAV.

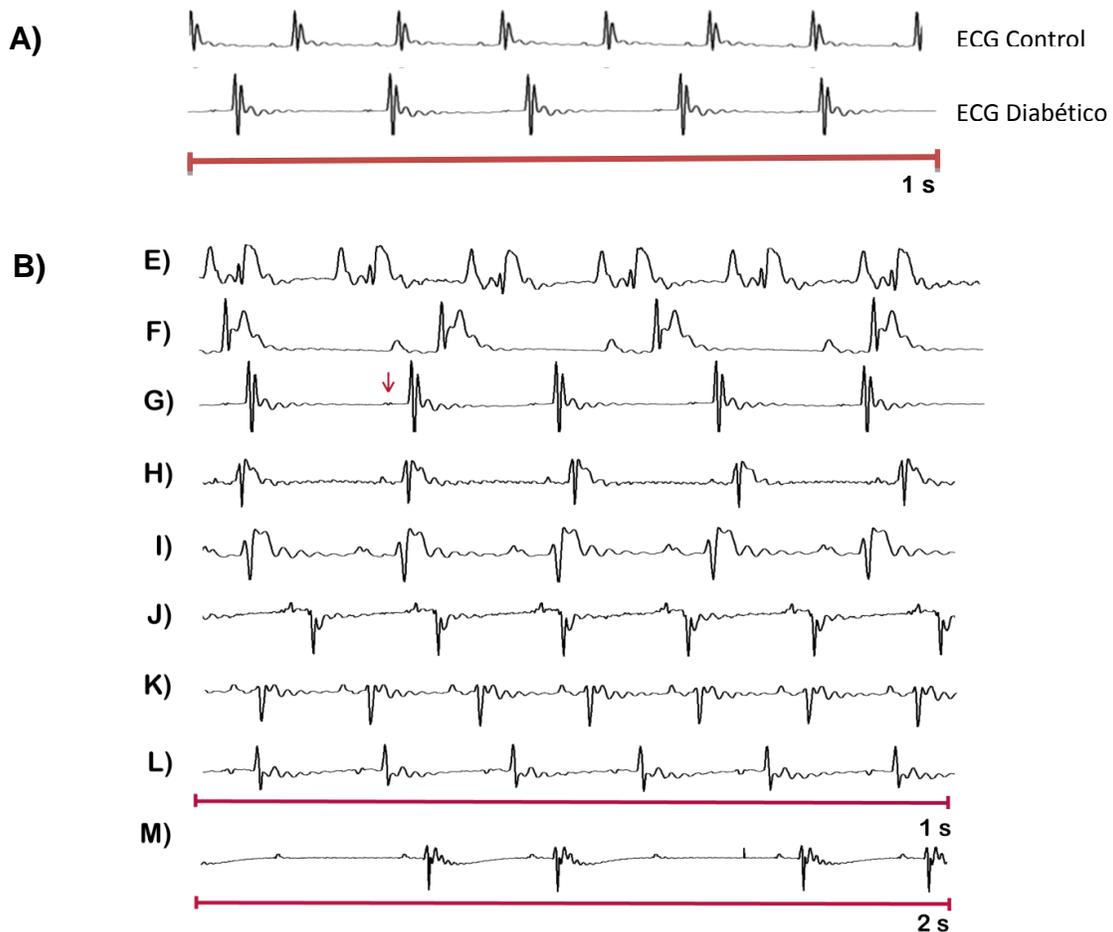


Figura 5. A) ECG de ratones en condiciones de control y diabético donde se observa que la frecuencia cardíaca está disminuida en animales diabéticos. **B)** Arritmias presentes en el modelo ratón diabético tipo 1. **E, G y H)** elevación del segmento ST. **J, K)** presentan inversión del complejo QRS. **L)** onda P invertida. **M)** bloqueo de segundo grado. **G)** Onda P mellada. Se muestra 1 segundo del ECG, excepto en M donde se presenta una marcada bradicardia (Modificado de Arroyo-Carmona, 2015)

Al existir una disminución de la frecuencia cardiaca en el registro del ECG (medida como el inverso del intervalo R-R), se esperaba que la actividad eléctrica intrínseca registrada en el NSA aislado estuviera afectada de la misma manera. Sin embargo se encontró que la frecuencia del disparo del NSA en animales controles es de 210 eventos/minuto, mientras que en animales diabéticos es de 265 eventos/minuto, lo que nos indica que hay un aumento en la frecuencia de disparo (en un 26%) del NSA en registro multicelular por la diabetes mellitus tipo 1 (ver Figura 6, Arroyo-Carmona, 2013).

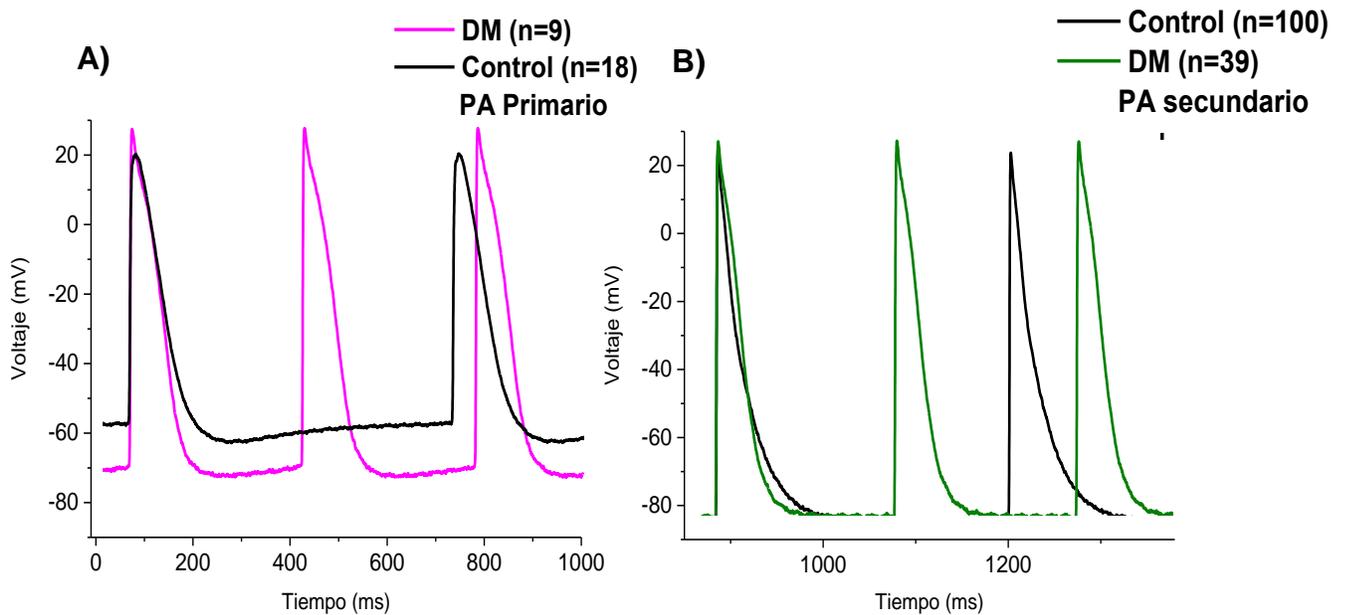


Figura 6. Registro de la actividad eléctrica del NSA aislado de ratón en condiciones de control y diabético. A) Se observa que en un intervalo de tiempo, la frecuencia de disparo del potencial de acción (PA) en la zona marcapasos primario del NSA de ratón diabético (rosa) es mayor que en controles (negro). **B)** En la zona marcapasos secundario del NSA la frecuencia de disparo está aumentada en animales diabéticos (verde) en comparación con controles (negro. Tomado de Arroyo-Carmona, 2013).

6. Justificación

La diabetes mellitus provoca alteraciones en la actividad eléctrica ventricular del corazón en ratón diabético inducido con STZ después de 10 semanas (Torres-Jacome, 2013). Además se ha observado que la frecuencia cardiaca registrada en el ECG disminuye en animales diabéticos al mismo tiempo de tratamiento. Sin embargo al registrar la actividad eléctrica del NSA en el tejido aislado se encontró un aumento en la frecuencia de disparo en los animales diabéticos (Arroyo-Carmona, 2013). Lo anterior resulta contradictorio ya que no se puede justificar un aumento en la frecuencia de disparo del marcapasos primario (NSA) y una disminución en la frecuencia cardiaca medida en el ECG. Una posible explicación de esta contradicción es que la velocidad de propagación del potencial de acción del NSA al NAV se vea disminuida por la diabetes mellitus tipo 1. Ya que al disminuir la velocidad de conducción no se podrían propagar las altas frecuencias de disparo generadas en el NSA al NAV y el tejido de conducción quedaría en periodo refractario. Lo anterior generaría una disminución en la frecuencia cardiaca, en este trabajo se propone que la velocidad de conducción del potencial de acción del NSA hacia el NAV se ve disminuida por la diabetes mellitus tipo 1.

7. Hipótesis

- ▶ La velocidad de propagación del potencial de acción entre nodo senoauricular y nodo auriculoventricular disminuye por la diabetes mellitus tipo 1.

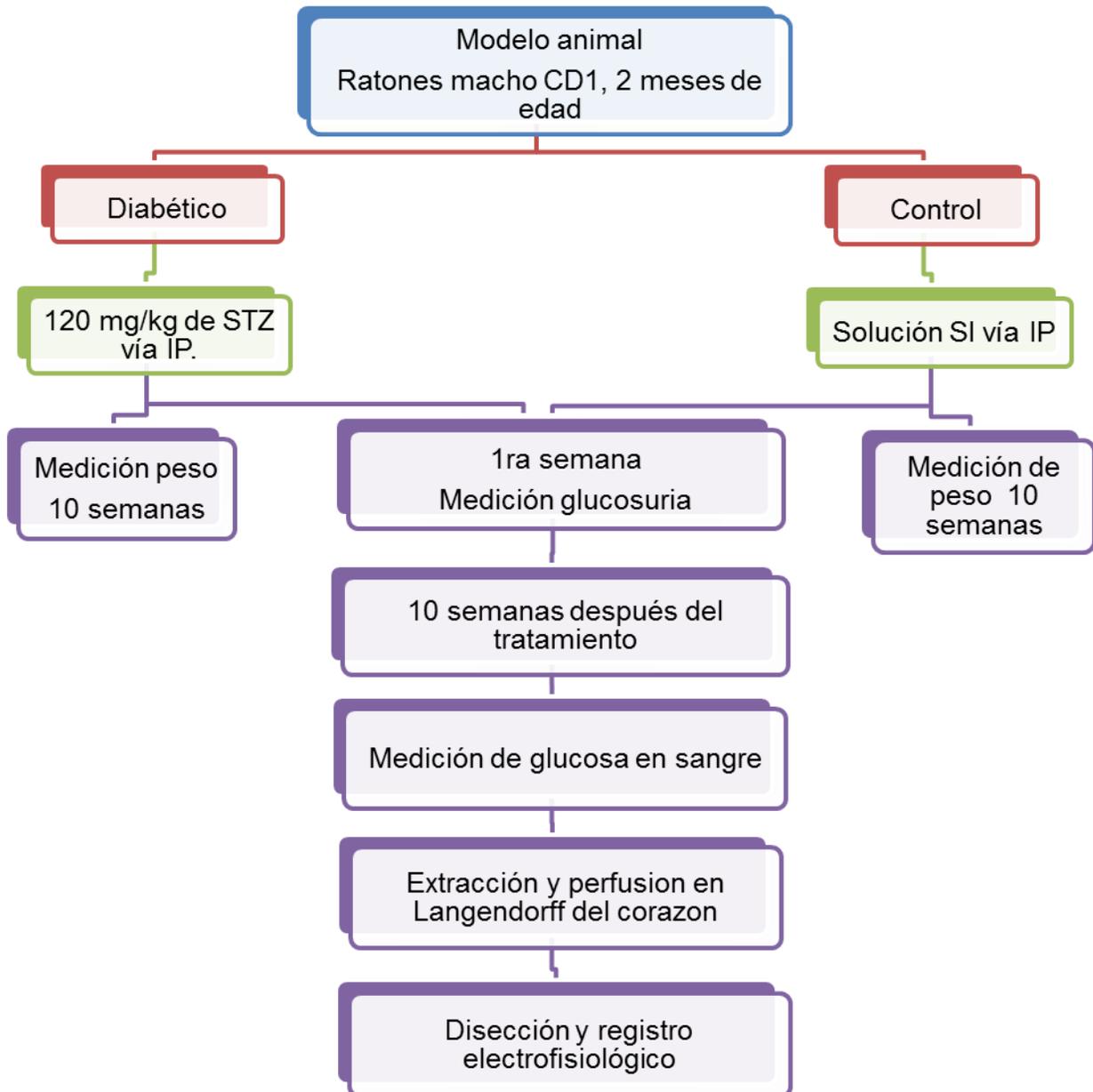
8. Objetivo general

- ▶ Medir y conocer los cambios en la velocidad de propagación ocasionados por la diabetes mellitus tipo 1.

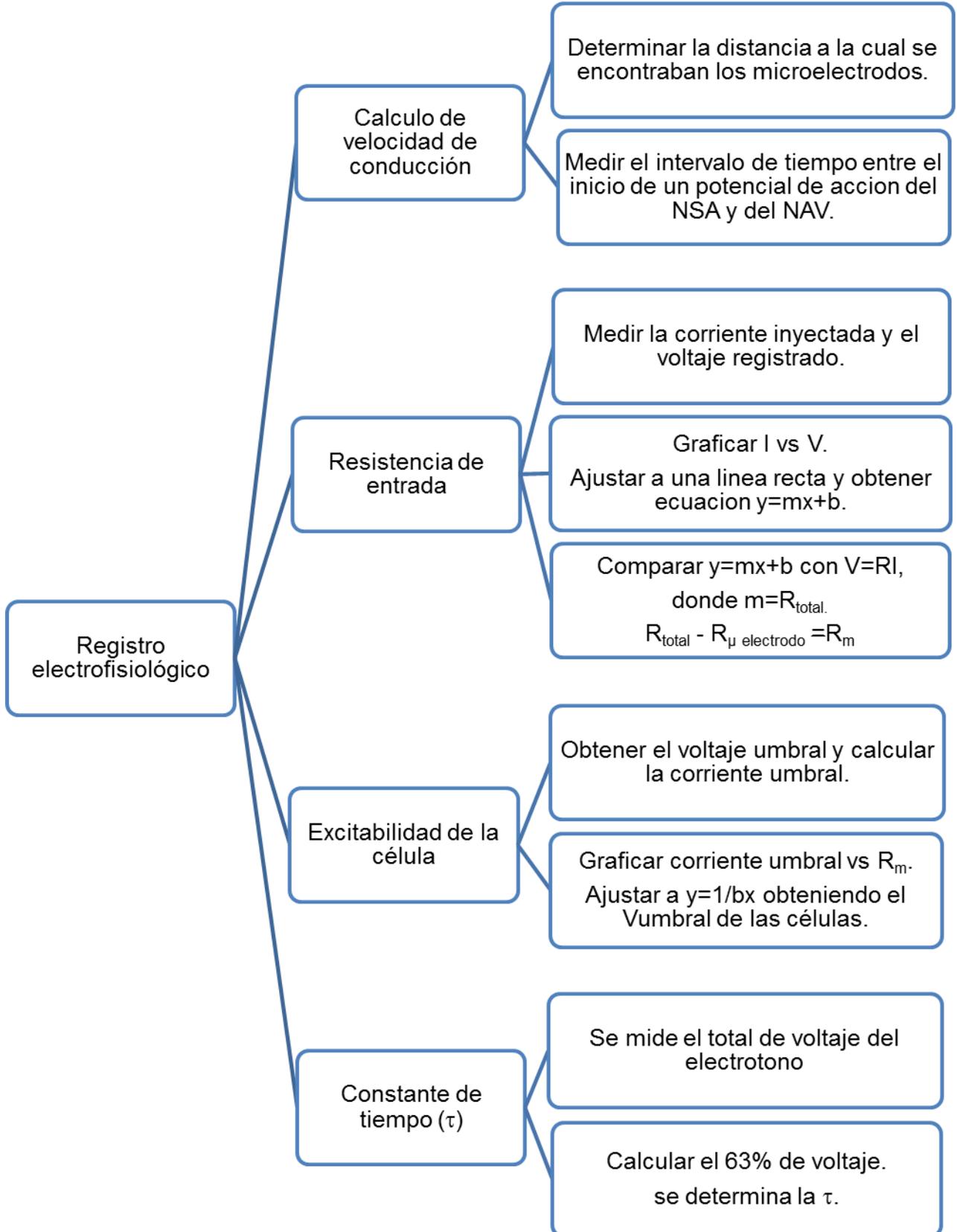
8.1. Objetivos particulares

- ▶ Cuantificar los cambios provocados por la diabetes mellitus tipo 1 en la velocidad de conducción.
- ▶ Evaluar los cambios generados en la resistencia de entrada de las células del NSA por la diabetes mellitus tipo 1.
- ▶ Evaluar si hay cambios en la excitabilidad de las células cardiacas cardiacos por la diabetes mellitus tipo 1.

9. Esquema de trabajo



9.1. Análisis de datos



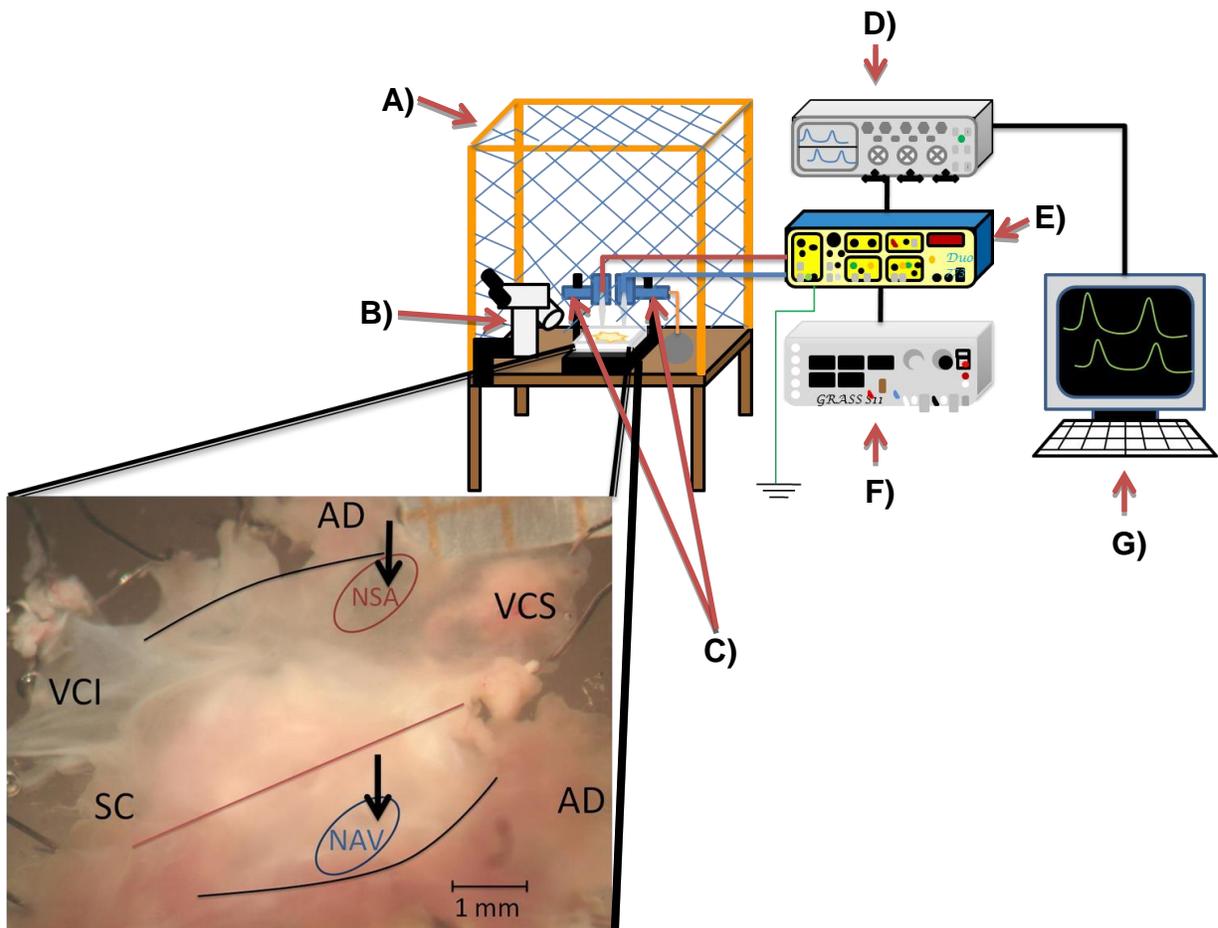


Figura 7. Equipo de trabajo para el registro multicelular del NSA y NAV. A) Jaula de Faraday, B) Microscopio, C) Micromanipuladores, D) Osciloscopio, E) Amplificador, F) Estimulador, G) Computadora.

10. Material y métodos

10.1. Modelo animal

Se utilizaron ratón macho de la cepa CD1 de 2 meses de edad, se dividieron en 2 grupos:

- Grupo control: se les administró SSI vía intraperitoneal, además de dar agua simple durante el tratamiento.
- Grupo tratado: se les administró STZ en una dosis única de 120 mg/kg de peso del animal por vía intraperitoneal, a quienes una semana antes y una después de administrar se les dio a beber electrolitos con 10% de azúcar. Pasado ese tiempo se cambió esta solución por solo electrolitos cuya composición es glucosa (71.6%), cloruro de potasio (5.4%), cloruro de sodio (12.6%) y citrato trisódico dihidratado (10.4%).

A ambos grupos se les dio libre acceso a alimento LabDiet® 5001, además los animales se mantuvieron en un ciclo luz-obscuridad de 12:12 horas.

A los animales se les realizó un análisis de orina con tiras reactivas Combi Screen® 11SYS PLUS en la primera semana después del tratamiento, para verificar que en el grupo diabético se presentó un aumento en la concentración de glucosa. El peso de los animales se registró semanalmente.

10 semanas después del tratamiento, se anestesió al animal con pentobarbital sódico (Sedalphorte ®) a una dosis de 0.0001 ml/g y heparina a una dosis de 0.0004 ml/g de peso del animal, se obtuvo una muestra de sangre y se midió la concentración de glucosa, se extrajo el corazón y se canuló a través de la aorta para perfundirlo en un sistema Langendorff (perfusión retrógrada) utilizando solución Tyrode [0.125 M de NaCl, 0.0054 M de KCl, 0.00105 M de MgCl, 0.024 M de NaHCO₃, 0.00042 M de Na₂HPO₄, 0.011 M de glucosa, 0.0018 M de CaCl₂] gaseado con carbógeno (mezcla de 95 % O₂ y 5% de CO₂). La perfusión duró 5 minutos para verificar que el corazón seguía funcionando.

10.2. Preparación de ambos nodos

Para la disección de ambos nodos se inició cortando el ápex para exponer las cavidades del ventrículo derecho e izquierdo. En el ventrículo derecho, se cortó la pared libre hasta llegar a la válvula tricúspide, después se introdujo la tijera dentro de la cavidad de la aurícula derecha, cortándola por la parte media, para abrir y exponer ambos nodos. La vena cava superior e inferior se abrió desde su desembocadura. A continuación se abrió también el seno coronario, se quitó el ventrículo, la aurícula izquierda, la aorta y restos de la aurícula derecha, toda esta maniobra se realizó en solución Tyrode gaseado con carbógeno. La preparación quedó como se observa en la Figura 8.

El tejido nodal se montó en una cámara de acrílico para el registro de potenciales de acción en preparación multicelular con fondo de elastómero de silicona (Sylgard®), los nodos se expusieron del lado del endocardio para su registro, estirándolo con delgados pines sin dañar las estructuras, la preparación se colocó sobre una mesa antivibraciones. Se dejó reposar el tejido 1 hora, tiempo necesario para que el NSA y NAV recuperaran su ritmo, la preparación tuvo perfusión de Tyrode continua a una temperatura de 36 °C gaseado con carbógeno.

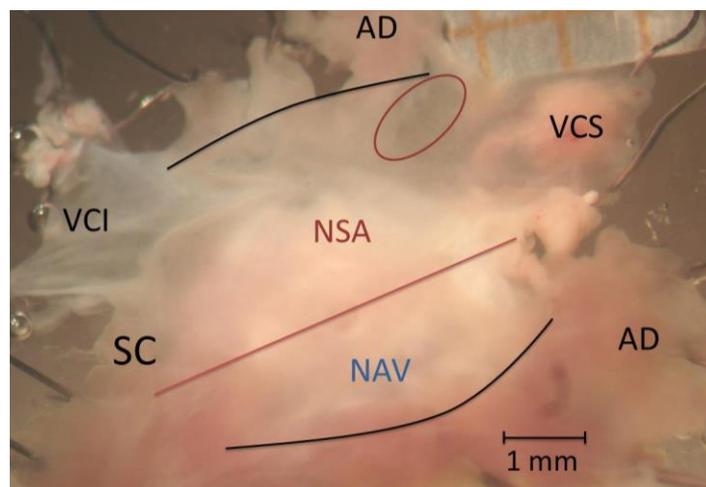


Figura 8. Disección del nodo senoauricular (NSA) y nodo auriculoventricular (NAV) de ratón. Se observa el NSA entre la vena cava superior (VCS) y vena cava inferior (VCI), dentro del ovalo se señala la zona central del NSA, el NAV se encuentra entre el seno coronario (SC) y la aurícula derecha (AD), la línea roja permite visualizar el límite entre ambos nodos.

10.3. Registro electrofisiológico

Para el registro de potenciales de acción se utilizaron micropipetas que se elaboraron con tubos capilares de borosilicato (wpi®) y un estirador de pipetas vertical modelo 700c David Kopf Instruments. Las micropipetas se llenaron de solución KCl 3 M, a las cuales se les introdujo un electrodo de plata conectado a un amplificador (Duo 773 electrometer, WPI), al mismo tiempo el amplificador estuvo conectado a un osciloscopio (Tektronix modelo 2201) para la visualización de los registros de potenciales de acción en tiempo real. Para el almacenamiento de los registros se utilizó una computadora Intel inside® Pentium 4 (Windows xp), utilizando el programa ADQsing. La frecuencia de captura de los registros fue de 10 kHz.

10.4. Registro de velocidad de conducción

Para el registro se utilizaron 2 microelectrodos de borosilicato con una resistencia de 20 a 40 MΩ. En el NSA existen dos tipos de potenciales de acción los llamados primarios o marcapasos verdaderos los cuales presentan pendiente en la fase 4 y los potenciales de acción sin pendiente de la fase 4 llamados secundarios o de transición, para este trabajo se utilizaron únicamente los potenciales de acción marcapasos. El primer microelectrodo se colocó en la zona marcapasos primaria del NSA como se observa en la Figura 7 (ovalito rojo), obteniendo potenciales de acción que presentaron pendiente de despolarización que es característico de células marcapasos, cuando el registro fue estable se colocó el segundo microelectrodo en la zona central del NAV (ovalito azul) y se registraron los potenciales de acción. El registro fue de ambos potenciales de acción de manera simultánea (ver Figura 9B).

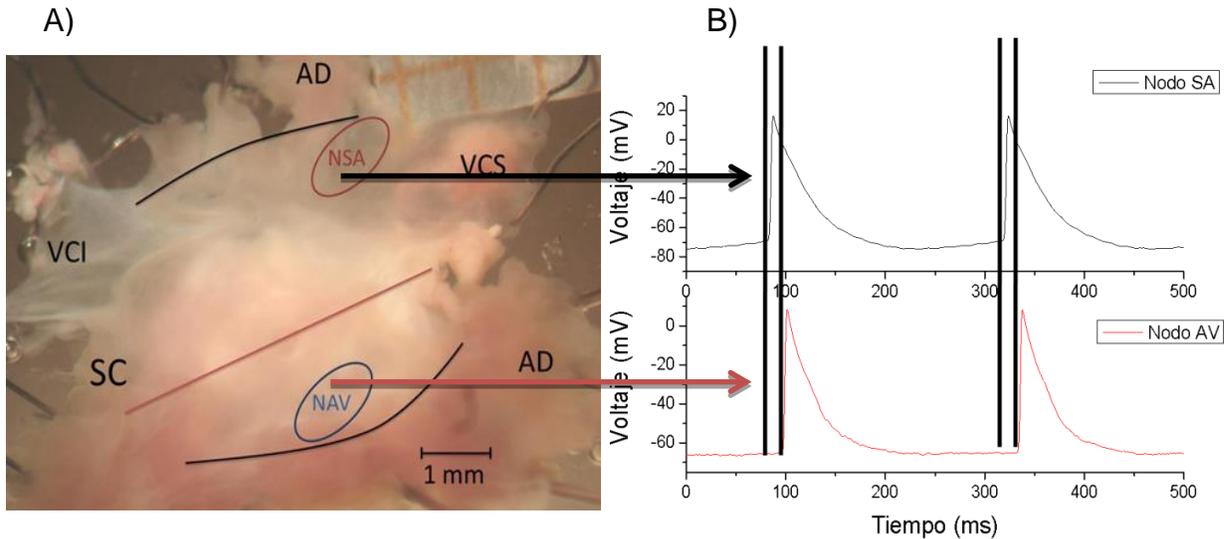


Figura 9. Preparación de NSA y NAV y registro de su actividad eléctrica. A) Se señala en la imagen con un ovalo la zona donde se hicieron los registros de potenciales de acción tanto del NSA y del NAV. **B)** Registro de potenciales de acción obtenidos de la zona marcapasos del NSA y la zona central del NAV, donde se observa el NSA comanda al NAV, las líneas negras indican el tiempo en el retraso en la propagación del potencial de acción de un nodo hacia el otro.

10.4.1. Análisis de datos de velocidad de conducción

Después de grabar los potenciales de acción, se marcó en una fotografía la zona en la cual se obtuvieron los registros, así; con la ayuda del programa ImageJ® y una escala de 1 mm, fue posible medir la distancia entre ambos puntos de registro, los datos se convirtieron a cm. Para la medición del intervalo de tiempo entre la aparición del potencial de acción del NSA y el NAV se utilizó el registro simultáneo de los potenciales de acción de ambos nodos, y se midió el retardo de la activación del potencial de acción del NAV con respecto a la activación del potencial de acción del NSA con el programa Clampfit 10.2 (ver Figura 9B). Con estos datos fue posible calcular la velocidad de conducción, aplicando la fórmula de $v = d/t$, en cm/s. Se realizó una prueba t de student con el programa Origin® 8 entre ambos grupos de datos.

Para el análisis de la velocidad de conducción se utilizaron registros de potenciales de acción de células que estuvieran acopladas, esto quiere decir, registros en donde el NSA comandaba al NAV, ya que se obtuvieron registros en

los que el NAV no llegó a sincronizarse con el NSA, teniendo así ambas estructuras diferente ritmo.

10.5 Registro de resistencia de entrada

Previo al registro de la resistencia de entrada, se grabó la resistencia del microelectrodo, esto se hizo introduciendo el microelectrodo en la solución Tyrode, después se aplicó una corriente con el amplificador, obteniendo un registro en forma de pulso cuadrado, posteriormente se grabó y midió la corriente inyectada y el voltaje registrado. Luego se introdujo el microelectrodo en la zona marcapasos primario del NSA, obteniendo potenciales de acción estables y con pendiente, este registro se grabó por un minuto. Después se aplicaron 6 pulsos de corriente de diferentes magnitudes (0.18, 0.24, 0.3, -0.3, -0.24, -0.18 nA) con un estimulador (GRASS®S11) acoplado al amplificador para que la corriente se inyecte a las células por el microelectrodo de registro de potenciales de acción. Los pulsos utilizados para medir la resistencia de entrada debieron de estar en la zona del potencial diastólico máximo, cada pulso duró 9 ms. Terminado el protocolo se retiró el microelectrodo del tejido, dejándolo en la solución Tyrode, para grabar su resistencia. Se marcó la zona de registro en una fotografía de ambos nodos.

10.5.1 Análisis de datos de resistencia de entrada

Para el análisis de los datos se utilizó el programa Clampfit 10.2. Después de medir la corriente y voltaje en el registro, se hizo una gráfica entre estos valores en forma de línea recta de 6 puntos como se observa en la Figura 10.

Esta gráfica se ajustó a una línea recta y se obtuvo la ecuación del grafico del tipo $y = mx + b$ que comparando los términos de esta ecuación con la de la ley de Ohm, donde $y = \text{Voltaje}$, $x = \text{Corriente}$, $m = \text{Resistencia total}$.

Después de obtener la resistencia total, se calculó la resistencia de entrada haciendo una diferencia entre la resistencia total menos la resistencia del microelectrodo antes de introducirlo al tejido. Posteriormente, se hizo una prueba t de student entre ambos grupos de datos.

10.6. Excitabilidad de la célula

Para determinar la excitabilidad de las células primero se obtuvo el voltaje umbral de los registros de potenciales de acción donde se calculó la resistencia de la membrana, esto se hizo derivando la señal del potencial de acción y colocándola de manera simultanea con el potencial de acción, como se observa en la Figura 11. De la señal derivada, se determinó el tiempo en el cual se generó un cambio en la derivada desde cero hasta que fuera mayor o igual a 3 unidades, encontrando de manera simultánea el cambio de voltaje en el potencial de acción, obteniendo el voltaje umbral.

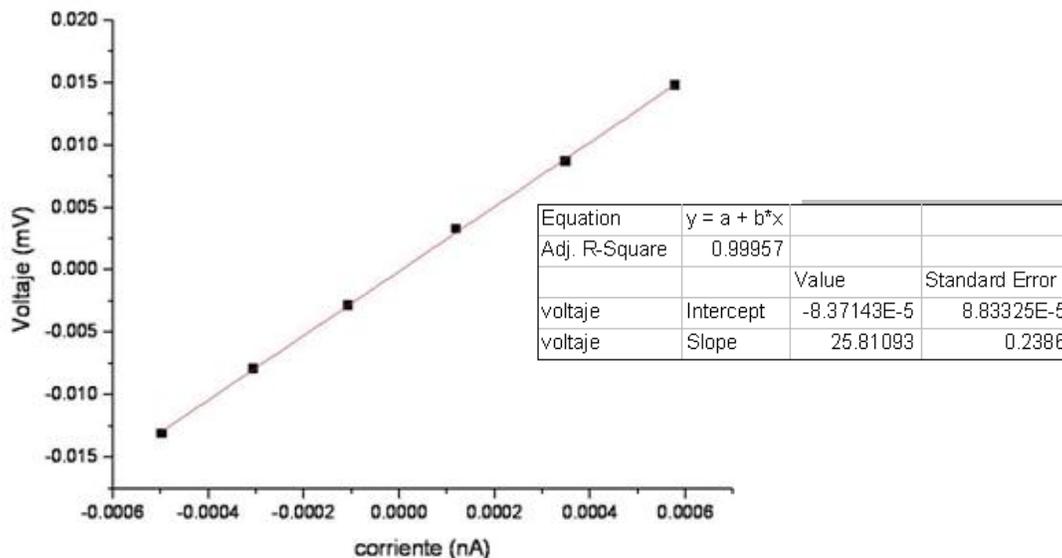


Figura 10. Ajuste a una línea recta de un grupo de datos de corriente y voltaje de diferentes magnitudes. Con el ajuste es posible obtener la ecuación del gráfico, donde la pendiente de la recta representa la resistencia total (resistencia del microelectrodo + resistencia de entrada). La tabla muestra los valores de los términos de la ecuación.

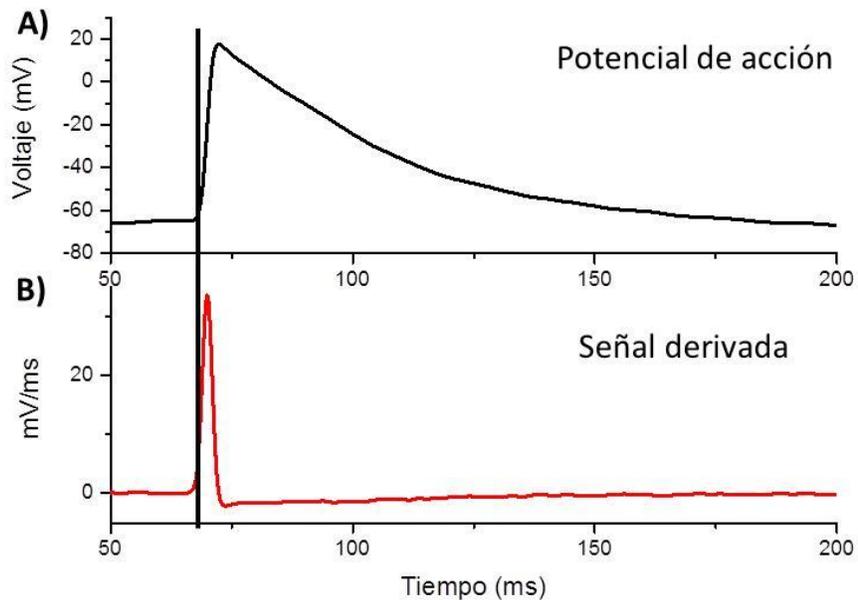


Figura 11. Gráfica de potencial de acción y derivada del potencial de acción. A) Potencial de acción donde se determino el voltaje umbral. **B)** Derivada del potencial de acción utilizada para obtener el punto donde cambio el voltaje en 3 unidades o mas, además de utilizar un cursor para determinar el voltaje umbral del potencial de acción.

Utilizando la ecuación de la ley de Ohm fue posible calcular la corriente umbral, usando los valores de resistencia de entrada y voltaje umbral ya determinados. Los valores de corriente umbral se graficaron con sus respectivos valores de resistencia de entrada (Mendez C. y Hernández ,2001). Se obtuvo una gráfica similar a la mostrada en la Figura 12 donde fue posible saber el valor del voltaje umbral del grupo de datos utilizando la Fórmula 3. Posteriormente se compararon las gráficas de los animales controles y diabéticos.

$$y = \frac{1}{bx}$$

Fórmula 3. Comparando los términos con los de la ley de Ohm, donde y =corriente umbral, $1/x$ = resistencia de entrada y $1/b$ = voltaje umbral.

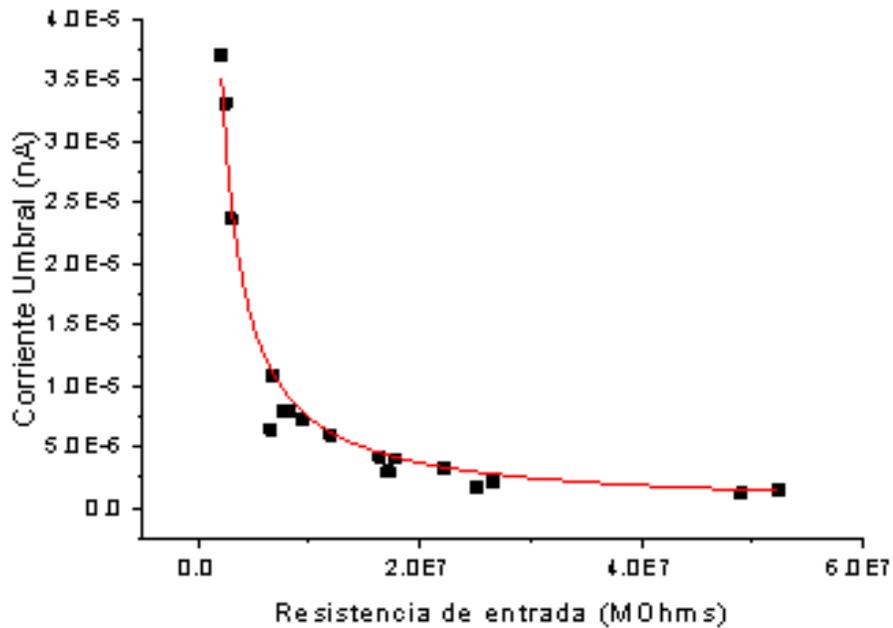


Figura 12. Gráfica de resistencia de entrada vs corriente umbral.
 Determinando el voltaje umbral se evaluó la excitabilidad de las células.

10.7. Constante de tiempo

Para la medición de la constante de tiempo se utilizaron los registros de cambio de voltaje por un pulso de corriente con el potencial de acción, seleccionando electrotono que estuviera en el potencial diastólico máximo, después se buscó el voltaje máximo y el voltaje mínimo obteniendo el voltaje total y se calculó el 63% de voltaje para determinar la constante de tiempo (Figura 13). Los datos se muestran como la media \pm la desviación estándar y se aplicó una prueba t de student con un nivel de significancia de 0.05.

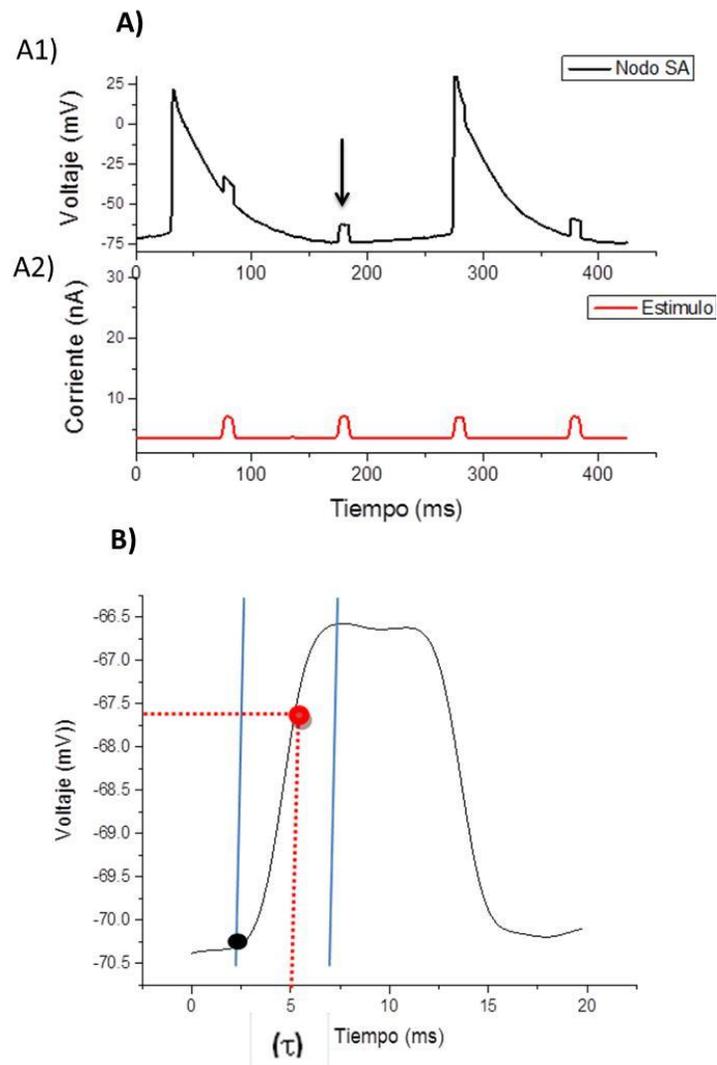


Figura 13. A) Registro de potencial de acción con estímulo de corriente. A1) Registro del potencial de acción con cambios de voltaje por inyección de corriente, la flecha indica el electrotono utilizado para medir la τ . **A2)** Se observa el estímulo inyectado a la célula para generar un electrotono. **B)** registro del electrotono producido por la aplicación del estímulo de corriente, para la determinación del voltaje total, que se obtuvo midiendo la diferencia de corriente, para la determinación del voltaje total, que se obtuvo midiendo la diferencia entre el voltaje máximo (2) y mínimo (1), de ese voltaje total se calcula el 63% (punto rojo) y se encuentra el tiempo en el cual se genero este cambio (τ).

11. Resultados

11.1. Modelo de diabetes mellitus

Después de la primera semana de inducción de la diabetes mellitus, se midió la concentración de glucosa en orina en los animales diabéticos que fue de 700 mg/dL \pm 183.7 (n=5) comparado con los animales control que fue negativo (n=13). Mientras que la concentración de glucosa en sangre en animales diabéticos a las 10 semanas después de la inducción fue de 454 mg/dL \pm 58.5 (n=5) y en los controles fue de 161.6 \pm 46.8 EEM (error estándar de la media; n=13).

Tabla 1. Concentración de glucosa en orina y sangre en animales control y diabético.

	Control (n=13 ratones)	DM (n=5 ratones) $\mu \pm$ EEM
Concentración de glucosa en orina	Negativo	700 mg/dL \pm 183.7*
Concentración de glucosa en sangre	161.6 \pm 46.8	454 mg/dL \pm 58.5*

* Diferencia significativa entre ambos grupos (p<0.05)

En la Figura 14 se muestra la variación del peso en ambos grupos durante las 10 semanas después del tratamiento a partir de la semana 3 la diferencia en el peso de ambos grupos fue significativa (p<0.05).

Además, a partir de la semana 5 en el grupo diabético, la disminución del peso fue significativa entre el mismo grupo con respecto al peso en la semana cero, tomando en cuenta que el peso del grupo control siguió aumentando. Es importante mencionar que los animales utilizados para la variación del peso, no fueron los mismos que se utilizaron para registro de la velocidad de conducción, resistencia de entrada y excitabilidad de las células, si no para la validación del modelo de ratón diabético inducido con STZ.

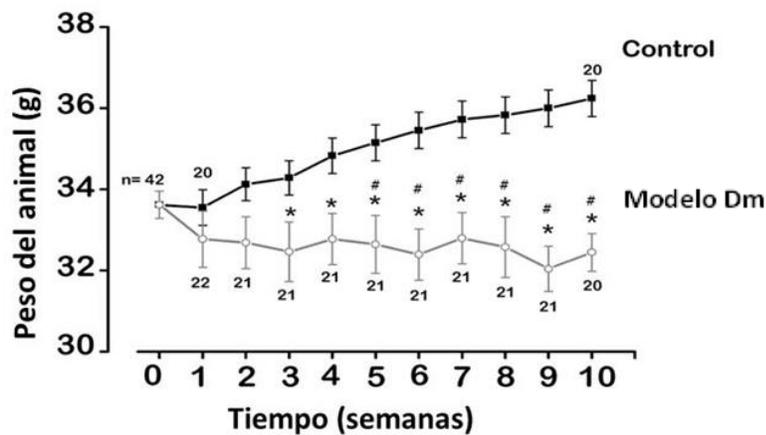


Figura 14. Medición del peso de ratones controles y diabéticos por 10 semanas. En el grupo diabético se presentó una disminución del peso desde la tercera semana, mientras que en el grupo control continuó aumentando. * indica diferencia significativa entre el peso de animales diabéticos y controles, mientras que # indica diferencia significativa entre el peso en la semana cero y el peso en la semana 5. El valor graficado corresponde a la media \pm EEM (tomado de Arroyo-Carmona, 2015).

11.2. Velocidad de conducción

La zona donde se realizó el registro de la velocidad de conducción del NSA al NAV fue en la zona central o marcapasos, el sitio de registro se muestra en la Figura 13A. La velocidad de conducción del potencial de acción fue en condiciones de control de $500.4 \text{ cm/s} \pm 70.9 \text{ EEM}$ ($n=5$ células acopladas), mientras que en animales diabéticos la velocidad de conducción fue de $178 \text{ cm/s} \pm 31.7 \text{ EEM}$ ($n=12$ células acopladas). Entre ambos grupos existe diferencia significativa (t de Student una $p < 0.05$).

Tabla 2. Valores de velocidad de conducción del NSA al NAV en condiciones de control y diabético.

Control (n=5 células acopladas) $\mu \pm \text{EEM}$	DM (n=12 células acopladas) $\mu \pm \text{EEM}$
500.4 cm/s \pm 70.9	178 cm/s \pm 31.7 *

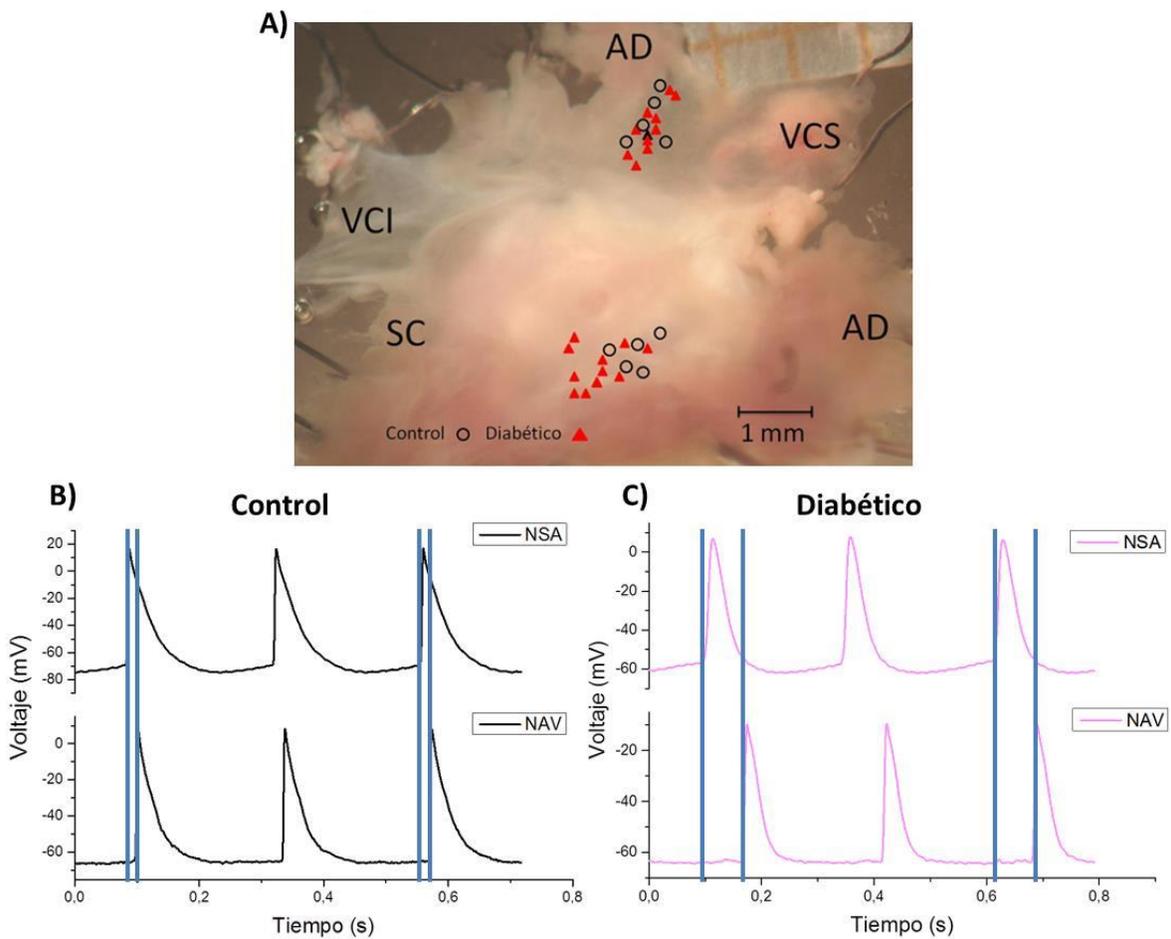


Figura 15. Registro de los potenciales de acción en el NSA y NAV de animales controles y diabéticos. A) Las zonas marcadas en círculos vacíos representan el lugar de registro de potenciales de acción del grupo control, mientras que en color rojo los del grupo con diabetes mellitus **B)** Registros de potenciales de acción de animales control y **C)** animales diabéticos donde se puede observar que el tiempo que tarda en propagarse el potencial de acción de una estructura a otra es mayor en animales diabéticos. Los registros utilizados para el cálculo de la velocidad de conducción son de células acopladas.

El tiempo que tarda en propagarse el potencial de acción del NSA al NAV en los animales controles fue de $0.005 \text{ s} \pm 5.9 \times 10^{-4}$ (n=5 células acopladas), mientras que en los diabéticos fue de $0.02 \text{ s} \pm 0.006 \text{ EEM}$ (n=12 células acopladas). Para este estudio se utilizaron únicamente células que estaban acopladas, esto quiere decir que el NSA comandaba al NAV.

En la Figura 15B y C se observan dos registros de los potenciales de acción utilizados para medir el retardo en la activación del NAV para generar un potencial de acción, previo a la generación del potencial de acción en el NSA en condiciones de control y diabético.

11.3. Resistencia de entrada

La zona donde se realizó el registro de la resistencia de entrada fue en la zona central o marcapasos, el sitio de registro se muestra en la Figura 15.

Tabla 3. Valores de resistencia de entrada de NSA en condiciones de control y diabético.

Control (n=19 células) $\mu \pm \text{EEM}$	DM (n=9 células) $\mu \pm \text{EEM}$
$15.9 \times 10^6 \text{ M}\Omega \pm 3.2 \text{E}6$	$13.05 \times 10^6 \text{ M}\Omega \pm 4.3 \text{E}6$

La resistencia de entrada obtenida en los animales control fue de $15.9 \times 10^6 \text{ M}\Omega \pm 3.2 \times 10^6 \text{ EEM}$ (n=19 células), mientras que en animales diabéticos la media fue de $13.05 \times 10^6 \text{ M}\Omega \pm 4.38 \times 10^6 \text{ EEM}$ (n=9 células). Se determinó con una prueba t de Student ($p < 0.05$) que no hubo diferencia significativa con respecto a los valores de resistencia de entrada en el NSA de animales control y diabéticos.

El valor del voltaje umbral en los animales control fue de -67.1 mV (n=17), mientras que en los animales diabéticos la media fue de -59.7 mV (n=8), no hubo diferencia significativa entre ambos grupos.

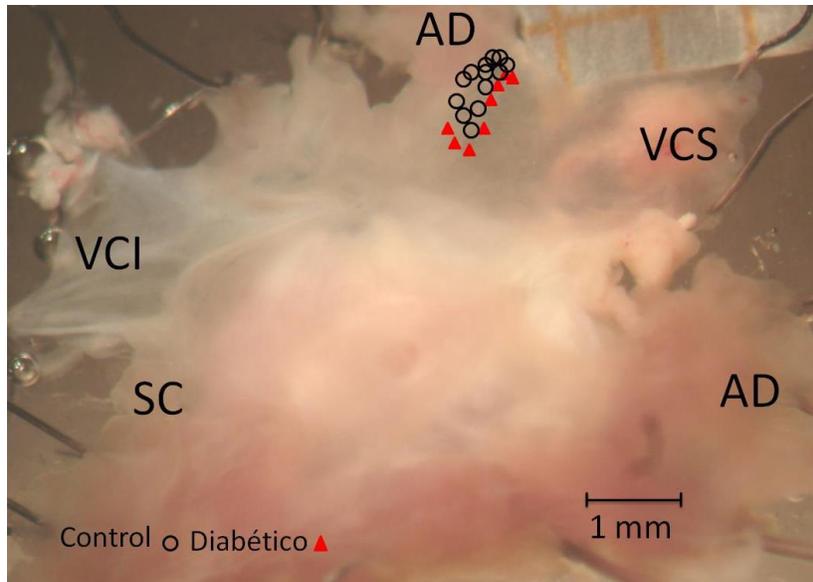


Figura 17. Preparación del NSA y NAV de ratón para el registro de resistencia de entrada. La zona marcada con círculos vacíos representa el sitio donde se hizo el registro en los animales control y en rojo para los diabéticos en el análisis de resistencia de entrada.

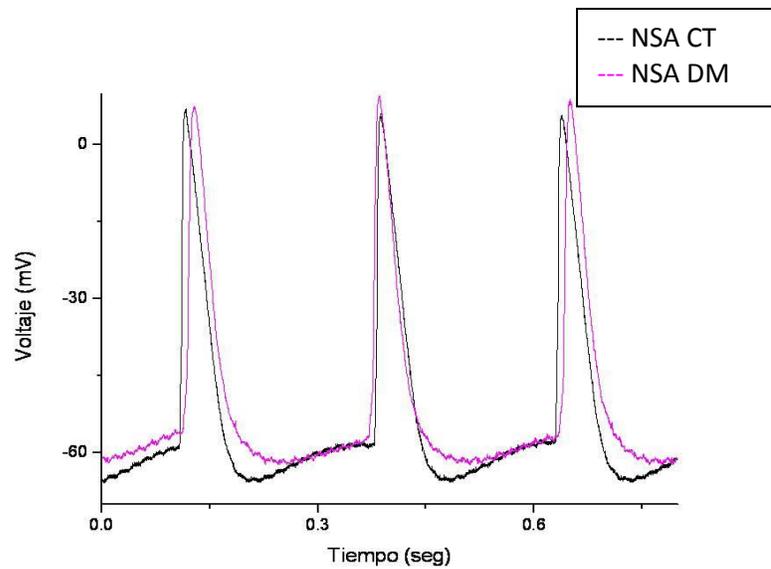


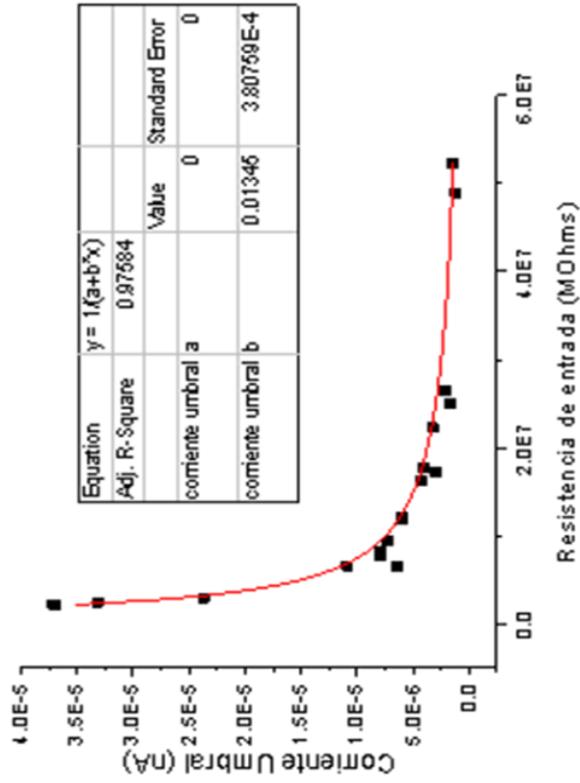
Figura 18. Morfología de potenciales de acción del NSA de la zona central en condiciones control y diabético. Únicamente los potenciales de acción marcapasos se utilizaron para el registro de la resistencia de entrada.

11.4. Excitabilidad de las células cardiacas

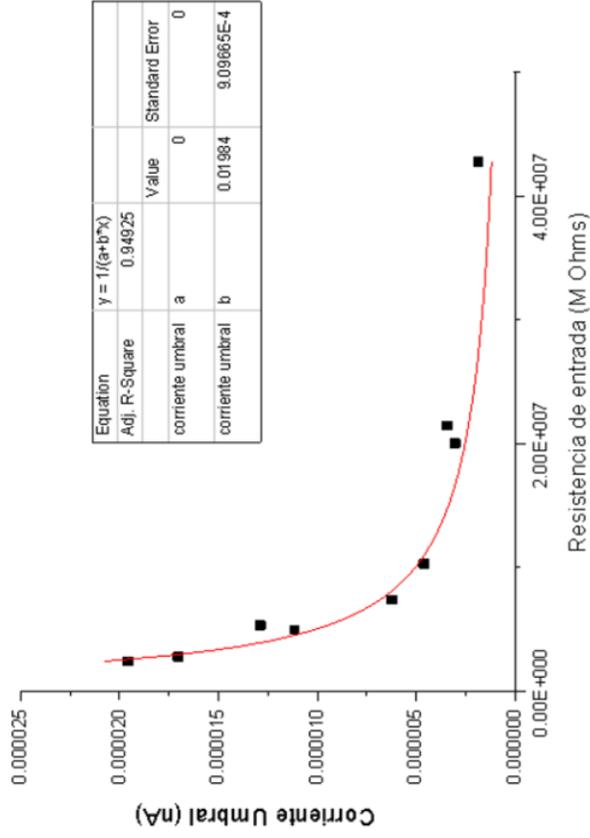
Para medir la excitabilidad de las células se construyó una gráfica de resistencia de entrada vs corriente umbral de las células registradas en el NSA de ratón en condiciones control y diabético (Figura 19). Utilizando la Fórmula 3 para ambos grupos de datos el voltaje umbral (término $\frac{1}{b}$) para las células cardiacas de los animales control fue de -74.3 mV y para animales diabéticos fue de -50.4 mV. Se observa que hubo un aumento en el voltaje umbral en los animales tratados.

Los ajustes de la gráfica corriente umbral contra resistencia de entrada de células cardiacas de NSA de los animales control y diabéticos se graficaron de manera conjunta y al comparar las dos gráficas de corriente umbral contra resistencia de entrada se separan de modo que a una misma resistencia de entrada para las células cardiacas de ratones diabéticos la corriente que se necesita para generar un potencial de acción debe ser menor que en las células cardiacas de ratones controles, determinando así que las células cardiacas de ratones diabéticos son más excitables (Figura 20).

Control



Diabético



19. **Excitabilidad de las células cardiacas.** Gráfica de resistencia de entrada contra corriente umbral de los registros en NSA de ratones ico. Con el ajuste de la gráfica en ambas condiciones se determinó el valor del voltaje umbral del grupo

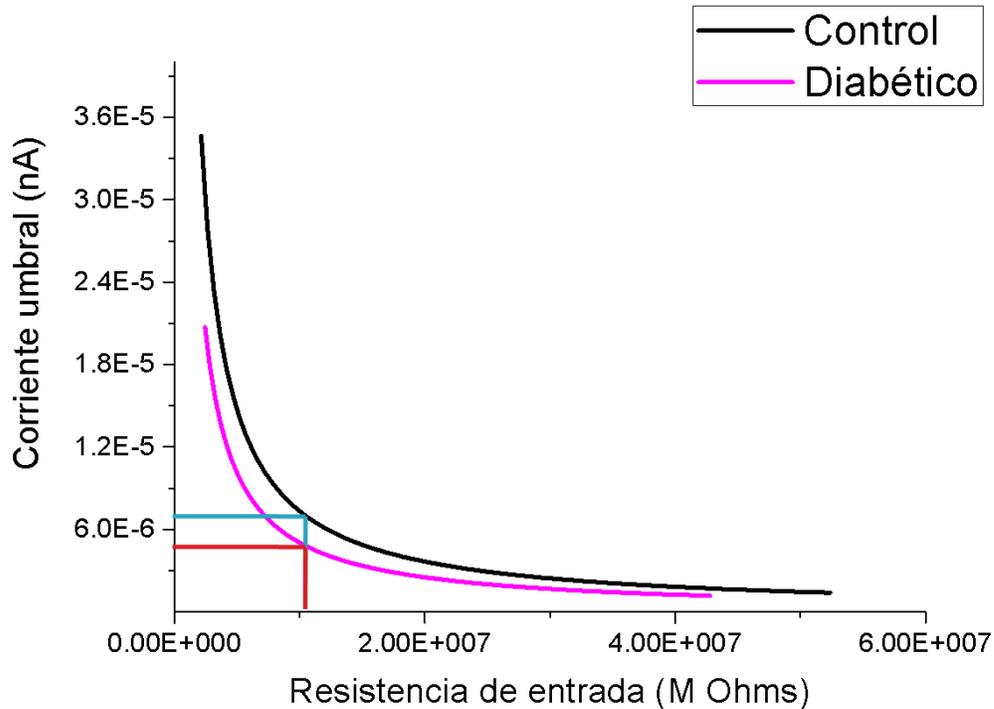


Figura 20. Gráfica de excitabilidad de las células cardíacas del NSA de animales control y diabético. Se observa en el ajuste de datos de resistencia de entrada de las células de animales diabéticos (ajuste en color rosa) que a una misma resistencia de entrada, se requiere menos corriente para poder generar un potencial de acción (línea roja), que en células de los animales controles (ajuste en color negro), ya que necesitan mas corriente (línea azul).

11.4. Constante de tiempo

En la tabla 4 se observan los valores de las constantes de tiempo para los estímulos aplicados en el potencial diastólico máximo de los potenciales de acción del NSA de ratones controles y diabéticos, los valores de constante de tiempo no varían entre cada grupo, lo que significa que sin importar la magnitud del pulso de corriente ni la polaridad, la resistencia de entrada fue siempre la misma sin importar la zona de registro.

Tabla 4. Valores de constante de tiempo (τ) a diferentes pulsos de corriente para NSA de animales controles y diabéticos.

Pulso de corriente (nA)	Control (ms) (n=18 células)	Diabético (ms) (n=9 células)
0.18	2.9 \pm 0.6	3.2 \pm 0.7
0.24	3.1 \pm 0.8	3.1 \pm 0.5
0.3	3.0 \pm 0.4	3.0 \pm 0.6
-0.3	3.0 \pm 0.5	3.3 \pm 0.7
-0.24	3.0 \pm 0.7	3.2 \pm 0.7
-0.18	2.9 \pm 0.9	3.0 \pm 1.0

12. Discusión de resultados

La localización, estructura y actividad eléctrica del NSA y NAV se ha descrito ampliamente en el conejo, ya que por su anatomía, morfología y tamaño esta especie ha sido ampliamente utilizada. Por otro lado la familia de roedores se ha usado para obtener modelos de diabetes mellitus ya que tiene una gran cantidad de ventajas sobre los conejos, desde el fácil mantenimiento hasta el registro de corrientes que sólo hay en los humanos y en algunas especies de roedores.

Al utilizar en este trabajo a los ratones para el modelo de DM, primero se complicó la disección de ambos nodos ya que las dimensiones de la estructura son 10 veces menores que en el conejo, por lo cual se tuvo el primer desafío, identificar las estructuras que delimitan ambos nodos y obtener la disección correcta. Como se sabe, la literatura describe la actividad eléctrica de cada uno de los nodos por separado, ya que tener una preparación donde ambos nodos estén fisiológicamente funcionales y se registren, nos hace remontar a la época de Don Carlos Méndez y Gordon Moe. Es por ello que ese fue nuestro segundo desafío mantener a ambos nodos funcionales y registrarlos al mismo tiempo.

Considerando los dos retos referidos, quisiera mencionar que el número de animales controles utilizados en este estudio es mayor que los diabéticos por las razones antes descritas. Cabe señalar que el registro del NAV en condiciones control tiene una dificultad mayor en el registro intracelular, ya que el NAV es una estructura tridimensional que tiene además de tejido especializado músculo cardíaco lo que le permite, tener una fuerza de contracción mayor que el NSA, por lo cual al hacer el registro intracelular es capaz de romper el microelectrodo de vidrio. Agrego también que tuvimos impedimento espacial con los electrodos de registro por las dimensiones propias de la disección, ya que como se dijo se registró en la parte central de cada nodo, pero este reto también fue superado.

Finalmente los registros que se utilizaron en cada una de las condiciones (control y diabetes mellitus) para la medición de los cambios de la velocidad de conducción tenían las características óptimas para su medición.

Como se ha reportado, la velocidad de conducción puede ser calculada como $\lambda/\tau = \left(\sqrt{\frac{R_m}{R_i + R_o}} \right) / R_m C_m$, (Hudgking y Huxley, 1954). Por lo que nos dimos a la tarea de determinar si cambiaba alguna de estas variables tau y Rm por la diabetes mellitus tipo 1, así como investigar los cambios en la velocidad de propagación del potencial de acción del NSA al NAV en condiciones control y diabetes mellitus tipo 1.

Se encontró que la resistencia de entrada de las células del NSA no cambiaba significativamente, por lo que determinamos si la excitabilidad de las células medida con la gráfica corriente umbral vs resistencia de entrada era la misma en estos registros y encontramos que hay una mayor excitabilidad en las células del NSA de ratón diabético. Este resultado explicaría el aumento en la frecuencia de disparo en el nodo aislado en preparación multicelular, ya que requerimos menos corriente para producir un potencial de acción.

En este trabajo se ha encontrado que la velocidad de conducción entre el NSA y el NAV en ratones con diabetes mellitus tipo 1 disminuye en comparación con animales control, lo que puede explicar la disminución de la frecuencia cardiaca en el ECG de animales diabéticos, ya que al disminuir la velocidad de conducción, sólo se propagará una tercera parte de los potenciales de acción generados en el NSA hacia el NAV, esto porque la velocidad de propagación disminuyó casi a la tercera parte de su valor con respecto a los controles.

Una posible explicación de la disminución de la velocidad de conducción es que la diabetes mellitus provoca remodelación cardiaca, específicamente en aurícula izquierda de rata diabética, Zhang y cols. reportaron alteraciones en la expresión y distribución Cx 43, fibrosis, y conducción anormal, por lo que una disminución o sobreexpresión de las Cxs también alteraría la velocidad de conducción o el tiempo de conducción (Zhang y cols., 2014; Howarth y cols., 2007).

Además la disminución en la velocidad de conducción podría tener relación con un aumento en la resistencia de las uniones comunicantes entre las células cardíacas debido a una remodelación estructural o también debido a una ausencia de estas, dificultando la propagación del potencial de acción del NSA al NAV.

13. Conclusión

La velocidad de conducción del potencial de acción entre el NSA y NAV disminuye por la diabetes mellitus, esto podría explicar la disminución de la frecuencia cardíaca en estos animales. Por otro lado, la excitabilidad de las células cardíacas aumenta con la diabetes mellitus, esto podría explicar el aumento de la frecuencia de disparo del NSA en estos animales. Con esto demostramos que la veracidad de nuestra hipótesis es verdadera.

14. Bibliografía

- ▶ American Diabetes Association (2014). Diagnosis and classification of diabetes mellitus. *Diabetes Care*, 37: Suppl 1: S81-90.
- ▶ Aronson R. S., Cranefield P. F. (1973). The electrical activity of canine cardiac Purkinje fibers in sodium-free, calcium-rich solutions. *J Gen Physiol* 61:786-808.
- ▶ Arroyo-Carmona R.E, López-Serrano A.L., Albarado-Ibáñez A., Mendoza-Lucero F.M., Avelino-Cruz E., López-Mayorga R.M., Hiriart M., Torres-Jácome J (2013). *Alteración de la actividad eléctrica del nodo senoauricular inducida por la Diabetes mellitus tipo 1 experimental en ratón*. LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.
- ▶ Arroyo-Carmona R.E (2015). *“Estudio de la remodelación de la actividad eléctrica del nodo seno auricular y Auriculo ventricular inducida por la Diabetes mellitus tipo 1 experimental en ratón”*. Tesis de doctorado. Escuela superior de medicina. Instituto politécnico nacional.
- ▶ Sohn K., Punske B. B., Sachse F. B. (2009). Relationship between Maximal Upstroke Velocity of Transmembrane Voltage and Minimum Time Derivative of Extracellular Potential. En: Ayache N. Delingette H., Sermesant M. Springer. *Functional imaging and modeling of the heart*. (5528: 505-512). Berlin.
- ▶ Bartos D. C., Grandi E., Ripplinger C. M. (2015). Ion Channels in the Heart. *Compr. Physiol* 5 (3): 1423-64.
- ▶ Bayés de Luna A., López-Sendón J., Attie F., Ezquerra A. E. (2003). *Cardiología clínica*, Masson.
- ▶ Berne R. M, Levy M. N. (1977). *Cardiovascular physiology*. San Louis, EUA, Mosby
- ▶ Blaustein, M. P., Kao, J. P. Y., Matteson, D. R. (2004). *Cellular physiology*. Filadelfia, EUA: Elsevier/Mosby.
- ▶ Blaustein M. P, Kao J. P, Mattenson D. R. (2012). *Cellular physiology and neurophysiology*. Edimburgo, Escocia, Mosby.

- ▶ Boyett M.R, Honjo H., Kodama I. The sinoatrial node, a heterogeneous pacemaker structure, (2002). *Cardiovascular Research*; 47: 658-687.
- ▶ Cardinali D. P. (2007). *Neurociencia aplicada; sus fundamentos*. Buenos Aires, Argentina. Editorial medica panamericana.
- ▶ Cho, H. S, Takano M., Noma A.. (2003). The Electrophysiological Properties of Spontaneously Beating Pacemaker Cells Isolated from Mouse Sinoatrial Node. *The Journal of Physiology* 550. 1:169–180.
- ▶ Cutler MJ, Jeyaraj D, Rosenbaum D.S. (2011). Cardiac electrical remodeling in health and disease. *Trends in pharmacological sciences*. 32(3):174-180.
- ▶ Dobrzynski H., Boyett M. R., y Anderson R. H. (2007). New Insights Into Pacemaker Activity: Promoting Understanding of Sick Sinus Syndrome. *Circulation*;115:1921-1932
- ▶ Eleazu, C. O., Eleazu, K. C., Chukwuma, S., Essien, U. N. (2013). Review of the Mechanism of Cell Death Resulting from Streptozotocin Challenge in Experimental Animals, Its Practical Use and Potential Risk to Humans. *Journal of Diabetes and Metabolic Disorders* 12: 60.
- ▶ Gaudesius G., Miragoli M., Thomas S. P., Rohr S. (2003). Coupling of Cardiac Electrical Activity over Extended Distances by Fibroblasts of Cardiac Origin, *Circulation Research*; 93:421-428.
- ▶ Hall J. E, Guyton A. C. (2011). *Guyton and Hall textbook of medical physiology*. Filadelfia, EUA. Saunders/Elsevier.
- ▶ Howarth F.C., Nowotny N., Zilahi E., El Haj M. A., Lei M. (2007). Altered expression of gap junction connexin proteins may partly underlie heart rhythm disturbances in the streptozotocin-induced diabetic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry*; 305:145–151.
- ▶ Iturralde Torres P. (1997). *Arritmias cardiacas*. Mc Graw Hill interamericana.
- ▶ Kannel W.B, McGee D.L. (1979). Diabetes and cardiovascular risk factors: the Framingham study, *Circulation*; 59(1):8-13.
- ▶ Kelley, W. N. (1993). *Medicina interna*. Buenos Aires: Médica Panamericana
- ▶ Koeppen B. M, Stanton B.A. (2008). *Berne & Levy Physiology*. Filadelfia, EUA. Mosby Elsevier.

- ▶ Kreuzberg M. M., Willecke K., F. Bukauskas F. (2006). Connexin-Mediated Cardiac Impulse Propagation: Connexin 30.2 Slows Atrioventricular Conduction in Mouse Heart. *Trends Cardiovasc Med.* 16(8):266-72.
- ▶ Kusumoto F., Bernath P. (2012). *ECG interpretation for everyone: an on-the-spot guide.* Oxford, Inglaterra. Wiley-Blackwell.
- ▶ Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla F., Llinás R. (1996). *Biofísica y fisiología celular. Biofísica y Fisiología Celular.* España.
- ▶ Lei M., Goddard C., Liu J., Leoni A., Royer A., Simon S., Fung M., Xiao G., Ma A., Zhang H., Charpentier F., Vandenberg J. I., Colledge W. H., Grace A. A. and Huang C. L.H. (2005). Sinus node dysfunction following targeted disruption of the murine cardiac sodium channel gene *Scn5a*. *Physiol.* 567 387–400.
- ▶ Luthra A. (2012). *ECG made easy.* Jaypee Brothers medical publishers Ltd. Delhi, India.
- ▶ Manell E. (2013). *The pig as an animal model for type 1 Diabetes Mellitus – with focus on carbohydrate and fat metabolism.* Edición digital. [DOI: http://stud.epsilon.slu.se/5313/11/manell_e_130226.pdf].
- ▶ Marger L., Mesirca P., Alig J., Torrente A., Dubel S., Engeland, B., Mangoni M. E. (2011). Pacemaker activity and ionic currents in mouse atrioventricular node cells. *Channels*, 5(3), 241–250.
- ▶ Mendez C. y Hernández (2001). Inverse relation between input resistance and threshold current in canine cardiac syncytium. *Journal of cardiovascular electrophysiology*, 12: 337-342.
- ▶ Mohrman D. E, Heller L. J. (2006). *Cardiovascular physiology.* Stamford, Conn. London, Appleton & Lange; McGraw-Hill.
- ▶ Nerbonne J. M., Kass R. S. Molecular physiology of cardiac repolarization, *Physiological Reviews*; 85 (4) 1205-1253, Oct. 2005.
- ▶ Sanes D. H., Reh T. A., Harris W. A. (2012). *Development of the nervous system.* London, Academic.
- ▶ Sengupta P. P, Khandheria B. K, Korinek J., Wang J., Jahangir A., Seward J. B., Belohlavek M. (2006). Apex-to-Base Dispersion in Regional Timing of

Left Ventricular Shortening and Lengthening, *Journal of the American College of Cardiology*; 47 (1):163–172.

- ▶ 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.
- ▶ Verheijck E., van Kempen M. J. A, Veereschild M., Lurvink J., J. Jongsma H., N. Bouman L. (2001). Electrophysiological features of the mouse sinoatrial node in relation to connexin distribution. *Cardiovasc Res* 52 (1): 40-50.
- ▶ Gan-Xin Y., Antzelevitch C. (1998). Cellular Basis for the Normal T Wave and the Electrocardiographic Manifestations of the Long-QT Syndrome, *Circulation*; 98:1928-1936.
- ▶ Zhang, Q., Liu, T., Ng, C. Y. and Li, G. (2014). Diabetes mellitus and atrial remodeling: mechanisms and Potential upstream therapies, *cardiovascular therapeutics*, 32: 233–241.