



**Benemérita Universidad Autónoma de Puebla**

---

**INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA**

**ANÁLISIS DEL POTENCIAL DE ACCIÓN Y CORRIENTES  
REPOLARIZANTES  $I_{to}$ ,  $I_K$ , e  $I_{K1}$  EN MIOCITOS DEL VENTRÍCULO  
DERECHO DEL CORAZÓN EN UN MODELO ANIMAL DE  
DIABETES MELLITUS TIPO 2**

TESIS PRESENTADA PARA OBTENER EL TÍTULO DE

**Maestría en Ciencias Fisiológicas**

PRESENTA

**Lft. Sosipater González Sandoval**

ASESOR DE TESIS

**Dr. José Everardo Avelino Cruz**

**Junio 2016**

*A mis padres y mi hermano.*

# AGRADECIMIENTOS

Deseo agradecer primero al CONACyT por el apoyo brindado durante mis estudios de Maestría bajo el registro de Beca No. 374397 en el Instituto de Ciencias Fisiológicas de la BUAP y a la BUAP por el apoyo brindado a través del Programa de Becas de Posgrado VIEP.

Agradezco a los integrantes de mi comité revisor Dr. Julián Torres, Dr. Eduardo Monjaraz y Dr. Rubén Vázquez por sus comentarios, críticas y sugerencias. Agradezco que durante el desarrollo de este proyecto siempre se mostraran accesibles, objetivos y que en todo momento sus aportaciones estuvieran encaminadas a mejorar y dar soporte a este trabajo.

Agradezco a mi Director de Tesis, a mi Tutor, Dr. Everardo Avelino. Gracias por abrirme las puertas y permitirme trabajar con usted a pesar de mi inexperiencia. Gracias por la confianza brindada y por tantas enseñanzas. Admiro su paciencia y su pasión por el conocimiento.

Agradezco también a todos los miembros del laboratorio de Cardiología Molecular. Gracias a Saret, Baldu y Julián por recibirme y por enseñarme tanto. Gracias Alfredo, Moy y Julio por su compañía en esta travesía. Gracias Gis y Angélica por su apoyo y por ayudarme a conseguir el equilibrio. Gracias a todos por todos los buenos momentos y por hacer de esta experiencia algo inolvidable. Junto con ustedes, y con la guía del Dr. Everardo, aprendí mucho más de lo que esperaba. Aprendimos de mecánica, albañilería, contaduría, plomería, administración, restauración, teología, gastronomía, reciclaje, deportes, cinematografía, literatura, primeros auxilios, música y artes plásticas. Les deseo a todos lo mejor y éxito en todos sus proyectos.

Agradezco inmensamente a todos mis amigos y a los miembros de mi familia. Gracias por comprender mis ausencias, por apoyarme a cumplir esta meta y por creer en mí. Agradezco especialmente a mis padres y a mi hermano por ser mi ejemplo y por su apoyo incondicional. Gracias también Ana y Giuse por escucharme y alentarme cuando lo necesitaba.

Gracias a todas las personas que estuvieron involucrados directa e indirectamente en la culminación de este proyecto.

A todos ustedes gracias, este logro también es suyo.

# Contenido

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>6</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>7</b>
<b>INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>8</b>
• DIABETES MELLITUS .....	8
• EL CORAZÓN .....	10
-Anatomía y funcionamiento .....	10
-Histología .....	11
-Actividad eléctrica.....	11
-Potencial de acción en músculo ventricular cardiaco y corrientes repolarizantes.....	13
• ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIACA EN LA DIABETES .....	18
• RATAS ZUCKER DIABETIC FATTY (ZDF) COMO MODELO ANIMAL DE DM2.....	24
<b>ANTECEDENTES .....</b>	<b>28</b>
<b>JUSTIFICACIÓN .....</b>	<b>29</b>
<b>HIPÓTESIS .....</b>	<b>30</b>
<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>30</b>
• Objetivo general.....	30
• Objetivos específicos.....	30
<b>DIAGRAMA DE TRABAJO.....</b>	<b>31</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
• MODELO ANIMAL.....	32
• AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES.....	33
• REGISTRO DE POTENCIAL DE ACCIÓN .....	33
• REGISTRO DE CORRIENTES DE POTASIO .....	34
• ESTADÍSTICA .....	36
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>37</b>
• RESULTADOS EN EL MODELO ANIMAL.....	37
-Glucosa espontánea y curva de tolerancia a la glucosa.....	37
-Parámetros morfométricos.....	38
• RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS, ENDOCARDIO DERECHO .....	39
- Capacitancia celular .....	39

-Potencial de acción del endocardio derecho .....	40
-Corrientes repolarizantes del endocardio derecho .....	50
• RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS, ENDOCARDIO IZQUIERDO .....	59
-Capacitancia celular .....	59
-Potencial de acción del endocardio izquierdo .....	59
<b>DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....</b>	<b>66</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>79</b>
<b>PERSPECTIVAS .....</b>	<b>80</b>
<b>APÉNDICES .....</b>	<b>81</b>
Apéndice I Alteraciones de la función y estructura cardiaca en ratas ZDF (van den Brom, Bosmans et al. 2010) .....	81
Apéndice II Aumento en el QTc y QTd como predictores de mortalidad cardiovascular en pacientes con DM2.....	82
Apéndice III Diagrama de trabajo para el aislamiento de cardiomiocitos .....	83
Apéndice IV Soluciones .....	84
Apéndice V Trasfondo genético del modelo animal .....	85
Apéndice VI Fotografías de especímenes Long Evans, Lean y ZDF. ....	85
Apéndice VII Parámetros metabólicos y morfométricos .....	86
Apéndice VIII Capacitancias celulares .....	86
Apéndice IX Tablas de análisis del potencial de acción, endocardio derecho a 2, 3 y 4 Hz.....	87
Apéndice X Tablas de análisis del potencial de acción, endocardio izquierdo a 2, 3 y 4 Hz .....	88
Apéndice XI Registro de la corriente $I_{K1}$ en presencia de $BaCl_2$ .....	89
<b>ÍNDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>90</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>91</b>

# ABREVIATURAS

ADA	American Diabetes Association
DM	Diabetes mellitus
DM1	Diabetes mellitus tipo 1
DM2	Diabetes mellitus tipo 2
MMPs	Metaloproteinasas
TIMPs	Factores inhibidores de las metaloproteinasas
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral- $\alpha$
TGF- $\beta$	Factor de crecimiento transformante- $\beta$
$I_{to}$	Corriente transitoria de salida de $K^+$
$I_{to,f}$	Corriente transitoria rápida de salida de $K^+$
$I_{to,s}$	Corriente transitoria lenta de salida de $K^+$
$I_K$	Corriente rectificadora tardía de $K^+$
$I_{Ks}$	Componente lento de la corriente rectificadora tardía de $K^+$
$I_{Kr}$	Componente rápido de la corriente rectificadora tardía de $K^+$
$I_{K1}$	Corriente entrante de potasio
ZDF	Ratas Zucker diabetic fatty
$[Ca^{2+}]_i$	Concentración de $Ca^{2+}$ intracelular
PPAR- $\alpha$	Receptores activados por proliferadores de peroxisomas $\alpha$
MHC- $\beta$	Cadena pesada de miosina
ECG	Electrocardiograma
QTd	Dispersión del intervalo QT
QTc	Intervalo QT corregido por la frecuencia cardiaca
DPA	Duración del potencial de acción
AMP-K	AMP-dependent protein kinase
$I_p/I_c$	Cociente corriente de prueba/corriente condicionante
AT <sub>1</sub> R	Receptor a angiotensina tipo 1
BNP	Péptido natriurético cerebral
ANP	Péptido natriurético atrial

## RESUMEN.

Existen evidencias clínicas de que la diabetes mellitus (DM) causa una remodelación eléctrica caracterizada por un retraso en la repolarización del potencial de acción cardíaco, además de alteraciones funcionales y mecánicas celulares, lo que puede generar las condiciones electrofisiológicas para una arritmia por un aumento en la heterogeneidad eléctrica intrínseca del tejido cardíaco. Hasta el momento, son escasos los trabajos en los que se han estudiado los cambios que produce la diabetes mellitus tipo 2 (DM2) en las características electrofisiológicas de los cardiomiocitos del ventrículo derecho.

En este trabajo determinamos mediante patch clamp, los cambios en la morfología del potencial de acción en los miocitos aislados del endocardio del ventrículo derecho en las ratas Zucker diabetic fatty (ZDF) como modelo experimental de DM2 y, además, registramos las corrientes repolarizantes de potasio  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$  para determinar si los cambios en la DPA, de presentarse, tienen una relación positiva con la disminución de estas corrientes. Para ello usamos ratas de las cepas Long Evans y Lean-ZDF como controles no diabéticos y ratas ZDF como modelo animal de DM2.

En los cardiomiocitos del endocardio derecho de las ratas ZDF encontramos una despolarización del potencial de membrana diastólico con respecto a las ratas Lean y Long Evans en todas las frecuencias de estimulación (1 a 5 Hz). A 1 y 4 Hz encontramos un aumento significativo de la DPA al 90% con respecto al grupo Long Evans y tanto a 1 como a 5 Hz encontramos un aumento de la DPA al 10, 20, 50, 60 y 90% con respecto a las ratas Lean.

No encontramos diferencias significativas en las densidades de las corrientes  $I_{to}$  o  $I_K$  en los cardiomiocitos del endocardio derecho de las ratas ZDF con respecto a los grupos Long Evans o Lean. Encontramos una diferencia significativa en el  $V_{1/2}$  de la curva de inactivación en estado estacionario de la  $I_{to}$  al comparar las cepas ZDF,  $-36.08 \pm 2.95$  mV, y Long Evans,  $-43.82 \pm 1.28$  mV. Además, encontramos una disminución significativa de la densidad en la corriente  $I_{K1}$ , de aproximadamente 58%, en los cardiomiocitos de las ratas ZDF con respecto al grupo Long Evans ( $p < 0.05$ ).

Paralelamente a los objetivos de este proyecto, registramos y analizamos los potenciales de acción del endocardio izquierdo en este mismo modelo. Encontramos que existe un aumento significativo de la DPA en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo de las ratas ZDF al compararlas con las ratas del grupo Long Evans y Lean al 20, 30, 50, 60, y 90%. No encontramos diferencias significativas en el potencial de membrana diastólico entre las tres condiciones.

En conclusión, en las ratas ZDF existe una despolarización del potencial de membrana diastólico de los cardiomiocitos ventriculares derechos y un aumento de la DPA por una disminución en la densidad de la corriente  $I_{K1}$  y, además, en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo existe un aumento significativo de la DPA.

# INTRODUCCIÓN

- **DIABETES MELLITUS**

De acuerdo a la American Diabetes Association, la diabetes es un grupo de desórdenes metabólicos caracterizado por hiperglucemia como resultado de defectos en la secreción de insulina, en su acción o en ambas. La hiperglucemia crónica está asociada con daños a largo plazo que inducen disfunción y fallo de diferentes órganos como ojos, riñones, corazón, vasos sanguíneos y nervios (ADA 2014).

Los procesos involucrados en el desarrollo de diabetes van desde la destrucción de las células  $\beta$  del páncreas con la consiguiente deficiencia de secreción de la insulina hasta anormalidades que resultan en la resistencia a la acción de la insulina. Los pacientes con diabetes, además, tienen un incremento en la incidencia de aterosclerosis, enfermedad arterial periférica y enfermedad cerebrovascular. La hipertensión y anormalidades del metabolismo de las lipoproteínas son generalmente encontradas en estos pacientes (ADA 2014), además de incrementarse el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Stamler, Vaccaro et al. 1993) las cuales son la mayor causa de morbilidad y mortalidad en pacientes con DM.

Una investigación realizada por Guariguata y colaboradores (Guariguata, Whiting et al. 2014) en base a los datos obtenidos por estudios de prevalencia de diabetes en 130 países y territorios, determinó que, a nivel mundial en el 2013 había aproximadamente 382 millones de personas, de entre 20 y 79 años de edad, con diabetes y estimó que este número alcanzará los 592 millones para 2035. Este estudio también confirmó, de acuerdo a los datos analizados, que los países con más casos reportados de DM se caracterizaban por ser países en desarrollo donde la urbanización ha llevado a dramáticos cambios en el estilo de vida como el sedentarismo. De acuerdo a este trabajo se estimó que en México, en el año 2013 se presentaron 8,723,000 casos de diabetes, es decir, el 11.8% de la población nacional padecía de DM ese mismo año y se estimó que 15.2% de la población nacional la padecerá para el año 2035, siendo para ese año el 5º país en la lista con más casos de diabetes después de China, India, EUA y Brasil (Guariguata, Whiting et al. 2014).

Los casos de diabetes se clasifican en dos grandes categorías debido a su etiopatogenia. En el caso de la diabetes tipo 1 la causa es una deficiencia absoluta de la secreción de insulina o niveles bajos de su producción; los pacientes suelen presentar un proceso autoinmune patológico en los islotes del páncreas que

genera la destrucción de las células  $\beta$  (Barthelemy, Jacqueminet et al. 2008; Raffel, Goodarzi et al. 2013; ADA 2015). En la diabetes tipo 2, que es el tipo más prevalente (~90–95%), la causa es una combinación de resistencia a la insulina y una inadecuada respuesta secretoria compensatoria (Barthelemy, Jacqueminet et al. 2008; ADA 2015). A este tipo de diabetes también se le conoce como no insulino dependiente y está asociada fuertemente a una predisposición genética (Elbein, Chiu et al. 2002).

Existen además otros tipos menos frecuentes de DM como la diabetes gestacional que es diagnosticada durante el segundo o tercer trimestre del embarazo o bien, algunos tipos específicos de diabetes debido a otras causas, por ejemplo los síndromes diabéticos monogénicos, enfermedades exócrinas pancreáticas (como fibrosis quística) o la diabetes inducida por químicos o drogas (ADA 2015).

De acuerdo a la American Diabetes Association (ADA 2014) debe cumplirse alguno de los siguientes criterios para el diagnóstico de diabetes:

- Prueba de hemoglobina glucosilada ( $HbA_{1c}$ )  $\geq 6.5\%$
- Glucosa en plasma en ayunas  $\geq 126$  mg/dL (7.0 mmol/L)
- Glucosa en plasma  $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol) después de dos horas durante la prueba de tolerancia oral a la glucosa.
- $\geq 200$  mg/dL (11.1 mmol/L) de glucosa en plasma en una toma de sangre aleatoria durante el día en pacientes con síntomas clásicos de hiperglicemia o crisis hiperglucémica.

La hiperglucemia en la DM es atribuida principalmente a dos defectos: a resistencia a la insulina y a la reducción de la secreción pancreática de insulina. En la diabetes mellitus tipo 2 (DM2), los islotes pancreáticos desarrollan la incapacidad de adaptar las células  $\beta$  al incremento de la demanda de insulina, lo que conduce a un aumento sanguíneo de glucosa (Raffel, Goodarzi et al. 2013).

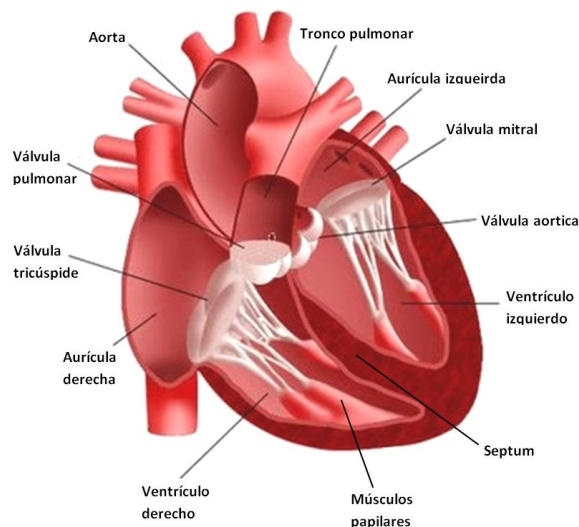
La DM2 a menudo está relacionada con hipertensión, obesidad (Barthelemy, Jacqueminet et al. 2008) o a un aumento de grasa corporal predominantemente abdominal; debe tenerse en cuenta que la obesidad, por sí misma, causa resistencia a la insulina (ADA 2014). En este aspecto, de acuerdo a los resultados de la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012 (ENSANUT 2012), 7 de cada 10 adultos presentan sobrepeso y, de estos, la mitad presenta obesidad. La prevalencia de sobrepeso y obesidad nacional incrementó 14.3% entre la encuesta del año 2000 y la del 2012. Además, los factores característicos de algunos cuadros patológicos como el del Síndrome Metabólico, que incluye obesidad abdominal, dislipidemia aterogénica, hipertensión, resistencia a la

insulina, estados protrombóticos y proinflamatorios, entre otros, favorecen el riesgo de desarrollar DM2.

## • EL CORAZÓN

### **-Anatomía y funcionamiento**

El corazón, situado en el tórax en el mediastino medio inferior, bombea sangre a todo el organismo. Cada lado del corazón está conformado por una aurícula, de paredes delgadas, y un ventrículo, de pared gruesa, que se comunican a través de las válvulas auriculoventriculares, mitral y tricúspide. Estas válvulas aseguran la circulación sanguínea en un sentido único dentro del corazón gracias a la disposición de sus valvas, que están unidas a la pared ventricular mediante los músculos papilares y las cuerdas tendinosas. Los ventrículos aportan la principal fuerza de bombeo que impulsa la sangre hacia la circulación pulmonar por el ventrículo derecho a través del tronco pulmonar o hacia la circulación sistémica por el ventrículo izquierdo a través de la aorta durante la sístole ventricular. El corazón está rodeado por el pericardio, un saco de tejido conjuntivo que envuelve al corazón y rodea a los grandes vasos que llegan y salen de él, manteniéndolo en su posición. El pericardio está conformado por dos capas, el pericardio fibroso, superficial y conformado principalmente por colágeno, y el pericardio seroso o pericardio, en íntima relación con el miocardio y que contiene los vasos del sistema coronario (Latarjet and Ruiz 2004; de los Nietos 2007; Fuster and Harrington 2011). **Figura 1.**



**Figura 1. Corazón.** Diagrama esquemático de las partes del corazón

### ***-Histología***

En el espesor de las paredes cardiacas se distinguen fibras comunes (superficiales) y fibras propias (profundas) dispuestas en planos con diferentes direcciones que favorecen la contracción coordinada del tejido. Se reconocen tres planos en el tejido cardiaco: epicardio (superficial), mediocardio y endocardio (profundo). El músculo cardiaco es estriado al igual que el músculo esquelético y contiene miofibrillas típicas que contienen los filamentos de actina y de miosina casi idénticos a los que se encuentran en el músculo esquelético; estos filamentos están contiguamente dispuestos y se deslizan entre sí durante la contracción; además debe mencionarse el tejido especializado de excitación y conducción (Mangoni and Nargeot 2008; Fuster and Harrington 2011; Guyton and Hall 2011).

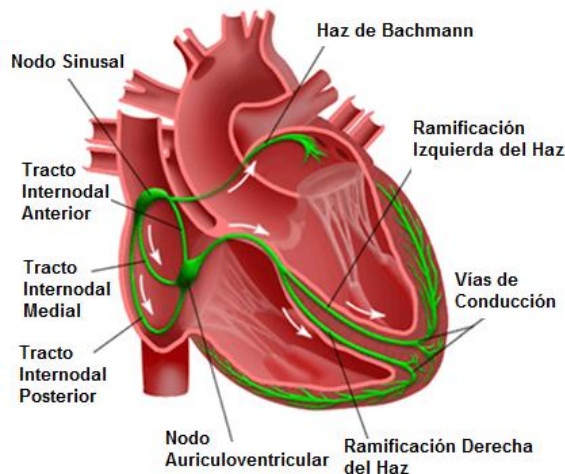
El tejido cardiaco está compuesto por dos grandes grupos celulares: los cardiomiocitos y los no cardiomiocitos (fibroblastos, células endoteliales, células vasculares musculares lisas, etc). Todas estas células se encuentran embebidas en las proteínas de la matriz extracelular que es esencial para proveer una integridad estructural y que además, transmite fuerzas mecánicas y señales en las fibras miocárdicas (Baudino, Carver et al. 2006; Curtis and Russell 2011). La matriz extracelular está compuesta por colágeno, glucoproteínas, proteoglicanos y proteasas (Corda, Samuel et al. 2000; Goldsmith and Borg 2002); siendo el colágeno el más abundante de los componentes (Bowers and Baudino 2012). En particular, el colágeno tipo I (85%) y III (11%) son los tipos predominantes en tejido cardiaco y mantiene relación constante con los cardiomiocitos y la microcirculación coronaria (de Souza 2002; Goldsmith and Borg 2002).

### ***-Actividad eléctrica***

El miocardio posee una capacidad de contracción automática gracias a células especializadas que se ubican subendocárdicamente. El sistema de conducción consiste en el nodo sinusal, tractos internodales, nodo auriculoventricular, haz auriculoventricular (de His) y las ramas derecha e izquierda que terminan en el sistema de fibras de Purkinje (Latarjet and Ruiz 2004). Este peculiar e importante sistema permite que el impulso generado en el nodo sinusal sea propagado y estimule al músculo cardiaco causando su contracción en una activación coordinada del miocardio que permite la eficaz función del corazón, de modo que la sangre sea bombeada por todo el cuerpo (de los Nietos 2007; Mangoni and Nargeot 2008) **Figura 2.**

El nodo sinoauricular (sinusal o de Keith y Flack) se encuentra ubicado subepicárdicamente en la pared de la aurícula derecha (Fuster and Harrington 2011). Entre el nodo auriculoventricular y el nodo sinoauricular se describen las

vías de conducción internodales. El nodo auriculoventricular (de Aschoff-Tawara) está situado en el tabique auriculoventricular (Latarjet and Ruiz 2004; Fuster and Harrington 2011). El fascículo auriculoventricular (fascículo de His) se dirige hacia adelante, arriba y a la izquierda. Sigue sobre el flanco derecho del tabique del corazón hasta la inserción de la valva septal de la válvula tricúspide; llega así a la parte anterior e inferior de la porción membranosa del tabique interventricular, donde se divide en la rama derecha y rama izquierda. La rama derecha sigue el trayecto de la llamada trabécula septomarginal, bajo el endocardio, lo que la conduce hasta la base de los músculos papilares en contacto de los cuales se ramifica. La rama izquierda atraviesa el tabique interventricular y aparece cubierta por el endocardio de su cara izquierda, en la vertical del eje del espacio entre las valvas semilunares aórticas derecha y posterior para ramificarse a cada uno de los músculos papilares del ventrículo izquierdo (Fuster and Harrington 2011). Los ramos subendocárdicos o red de Purkinje se conforman por la dispersión en las paredes de los ventrículos. Algunas de estas fibras son libres, cubiertas por el endocardio y adquieren aspecto de cuerdas tendinosas; son las llamadas falsas cuerdas del corazón (Latarjet and Ruiz 2004; Mangoni and Nargeot 2008) **Figura 2.**



**Figura2.** Diagrama esquemático del sistema de conducción del corazón.

El desplazamiento de la onda despolarizante en el tejido cardíaco, se ve favorecido por la presencia de canales iónicos en la membrana plasmática y de gap junctions, uniones especializadas ubicadas en los discos intercalares, por las cuales los iones se mueven con facilidad a lo largo de las fibras musculares cardíacas. Por tanto, el músculo cardíaco se puede considerar un sincitio en el que las células están interconectadas entre sí de tal manera que, cuando una de ellas se excita, el potencial de acción se propaga a todas extendiéndose de una célula a otra (Mangoni and Nargeot 2008; Guyton and Hall 2011).

### ***-Potencial de acción en músculo ventricular cardiaco y corrientes repolarizantes***

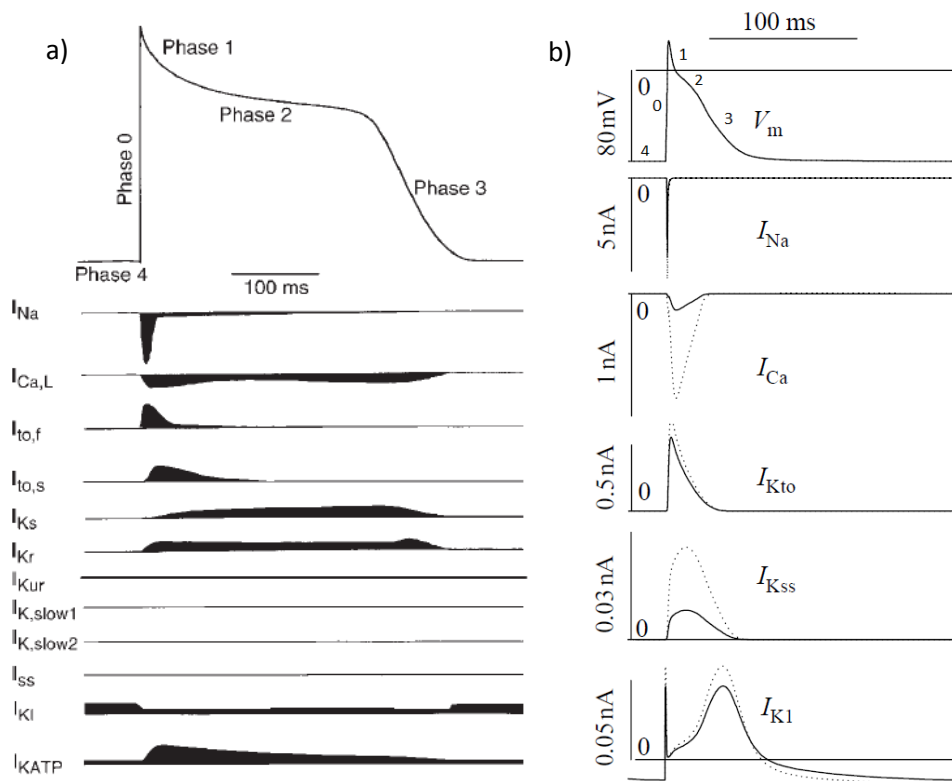
La actividad eléctrica miocárdica es atribuida a la generación del potencial de acción en las células cardíacas y a la propagación ordenada de este potencial (Kanno and Saffitz 2001). La contracción en el corazón, así, es iniciada por la generación del potencial de acción en las células especializadas del sistema de conducción, esta onda de despolarización será seguida de una fase de repolarización y un periodo refractario antes de que el siguiente impulso sea propagado (Nerbonne and Kass 2005).

El potencial de acción que se registra en una fibra muscular ventricular, en el humano, tiene una amplitud de 105mV aproximadamente, partiendo de un voltaje de -85mV. Después de la espiga inicial la membrana permanece despolarizada durante aproximadamente 200 ms mostrando una meseta, seguida al final por una repolarización súbita. La presencia de esta meseta hace que la duración del potencial de acción en el músculo cardíaco, en condiciones normales, dure hasta 250ms, aproximadamente 15 veces más que en el músculo esquelético. Por otro lado, los iones de calcio que entran durante esta fase de meseta dan inicio al acople excitación-contracción con la liberación de iones calcio del retículo sarcoplasmático (liberación de calcio inducida por calcio) y el proceso de contracción (Korzick 2003).

En la **Figura 3** se pueden observar las diferentes fases en el potencial de acción cardíaco ventricular de humano y rata. El inicio del potencial de acción se debe a un estímulo despolarizante con magnitud suficiente para llevar el potencial de reposo de la membrana celular a su umbral. La fase 0 de despolarización se debe sobre todo a la entrada de  $\text{Na}^+$  y está presente en las células miocárdicas, excepto en las del nodo sinusal y auriculoventricular en cuya fase 0 es dependiente de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ ; el pico del potencial de acción en esta fase está limitado sobre todo por la inactivación de los canales de  $\text{Na}^+$  y la disminución del gradiente electroquímico de este ion. La fase 1 o de repolarización rápida precoz se debe a la corriente transitoria rápida de salida de  $\text{K}^+$  ( $I_{to}$ ), lo que resulta en una disminución del potencial de membrana a aproximadamente 0mV. En la fase 2 de meseta o de repolarización lenta, el potencial de membrana se mantiene estable gracias a la corriente lenta de entrada de  $\text{Ca}^{2+}$ , la corriente de entrada de  $\text{Na}^+$ , y la corriente de salida de  $\text{K}^+$ . La Fase 3 o de repolarización rápida tardía se debe a la corriente de salida de  $\text{K}^+$  justo cuando se inactivan los canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ; la célula alcanza valores cercanos al potencial de reposo. Finalmente, en la fase 4 la célula ha recuperado su potencial de reposo por la participación de la bomba sodio-potasio que bombea iones de  $\text{Na}^+$  al exterior y de una corriente entrante de potasio,  $I_{K1}$ , lo que mantiene el potencial de reposo hasta la próxima

despolarización (Nerbonne and Kass 2005; Bassani 2006; de los Nietos 2007; Fuster and Harrington 2011) **Figura 3**.

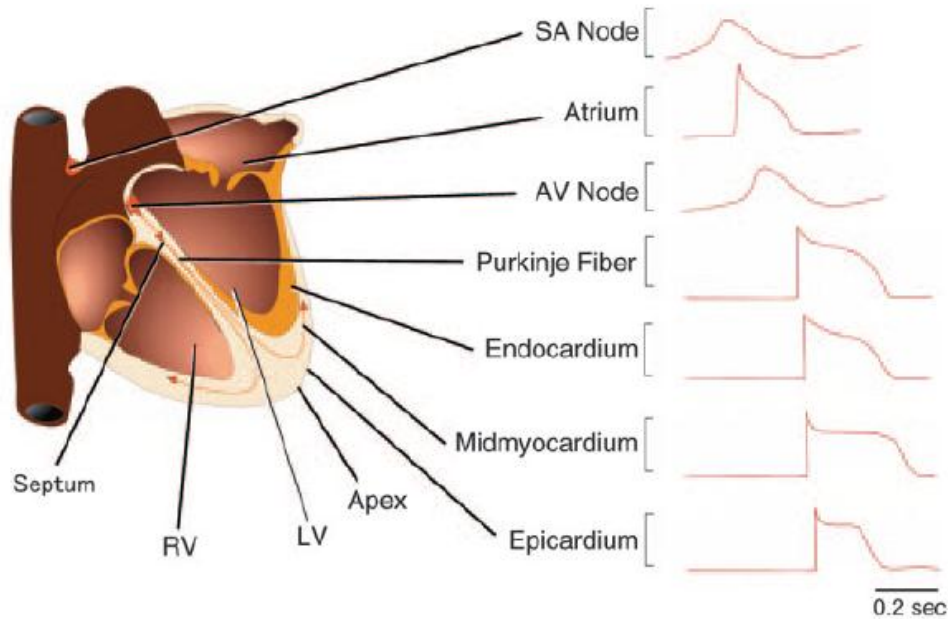
Ya que el potencial de acción es el resultado de cambios secuenciales y coordinados en la conductancia iónica, su morfología depende de la función de los canales iónicos que expresa cada célula; así también, los canales expresados y sus subunidades en cada célula dependen de la función de esta última y de la especie. Lo anterior resultará en la frecuencia cardiaca de cada especie. En la rata, por ejemplo, la forma de potencial de acción es diferente a la del humano, lo que condiciona también la forma del trazo en el electrocardiograma (Monfredi, Dobrzynski et al. 2010; Dobrzynski, Anderson et al. 2013).



**Figura 3.** Fases del potencial de acción y las corrientes iónicas asociadas. Se muestran trazos representativos del potencial de acción y las corrientes iónicas asociadas a cada fase en miocitos ventriculares de a) humano adulto y b) rata. (Nerbonne and Kass 2005; Pasek, Simurda et al. 2006).

Existen diferencias regionales de las propiedades eléctricas del miocardio ventricular debidas, principalmente, a las características de repolarización de los cardiomiocitos del epicardio, miocardio y endocardio (**Figura 4**); estas diferencias contribuyen a la propagación normal y unidireccional de la actividad de la

actividad eléctrica y a la generación de la rítmica contracción cardiaca (Bers 2001; Kleber and Rudy 2004; Nerbonne and Kass 2005). Estudios de Antzelevich y Fish en cardiomiocitos ventriculares caninos (Antzelevitch and Fish 2001), demuestran que el potencial de acción de los cardiomiocitos del mediocardio difieren del endocardio con respecto a la morfología de la fase 1. Estas células poseen una prominente  $I_{to}$  y además muestran una activación más lenta de la corriente de potasio rectificadora retardada ( $I_{Ks}$ ) pero una gran corriente tardía de sodio (late  $I_{Na}$ ) y de intercambiador sodio-calcio ( $I_{Na-Ca}$ ) en comparación de las células del epicardio y endocardio. Estas distinciones iónicas son la base de la mayor duración de potencial de acción en músculos del mediocardio. Un aumento de la heterogeneidad eléctrica de la pared ventricular puede predisponer al desarrollo de algunos tipos de arritmias como la arritmia de reentrada, ya que suele estar acompañada por un aumento de la dispersión de la repolarización.



**Figura 4.** Actividad eléctrica en el miocardio. Esquema de un corazón humano y diferentes formas de ondas del potencial de acción registrados en diferentes regiones (Nerbonne and Kass 2005)

La duración del potencial de acción de las células musculares cardiacas determina el tiempo de repolarización del tejido cardiaco. Así, la prolongación en tiempo del potencial de acción produce retardos en la repolarización de este tejido. Estos cambios en la duración del potencial se deben a alteraciones de las corrientes repolarizantes (Tomaselli and Marban 1999).

La repolarización de la membrana celular de los cardiomiocitos es determinada por la cinética de las corrientes iónicas totales, incluyendo diversas corrientes de  $K^+$  (Anumonwo and Lopatin 2010). En condiciones normales, el bloqueo o disminución de una de las corrientes de  $K^+$  no necesariamente causa una prolongación excesiva de la duración del potencial de acción ya que las demás corrientes de  $K^+$  proveen suficiente repolarización (Roden and Yang 2005). En los mamíferos, al menos cuatro grandes corrientes de  $K^+$  contribuyen a la repolarización y duración del potencial de acción en el miocardio ventricular,  $I_{to}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ , cada una de diferente densidad y dependencia de voltaje y tiempo (Nerbonne 2000) **Figura 3**.

Los cardiomiocitos ventriculares tienen distintas clases de canales de  $K^+$  dependientes de voltaje. De acuerdo a Xu y colaboradores y Nerbonne y colaboradores (Xu H. et al., 1999, Nerbonne J. et al., 2005), pueden distinguirse dos amplias clases de corrientes repolarizantes, las corrientes transitorias salientes (como  $I_{to}$ ) y las corrientes rectificadoras tardías ( $I_K$ ) **Figura 3**.

### ***Corriente Ito***

La corriente transitoria de salida independiente de calcio (calcium-independent transient outward current, o sólo transient outward current,  $I_{to}$ ), juega un rol importante en la fase de repolarización temprana e influye de manera importante en la fase 1 del potencial de acción e incluso en la fase de meseta (Tomaselli and Marban 1999; Bassani 2006). Esta corriente se activa e inactiva rápidamente cuando la despolarización de la membrana alcanza aproximadamente -30mV, produciendo entonces la fase 1 del potencial de acción.

El canal responsable de la corriente  $I_{to}$  es un complejo proteico macromolecular compuesto por 4 subunidades  $\alpha$  formadoras del poro, subunidades accesorias  $\beta$  y otras proteínas regulatorias. La subunidad  $\alpha$  presenta 6 dominios transmembrana, una región poro selectiva a  $K^+$  y un dominio altamente cargado, S4, que es considerado el sensor de voltaje del canal. De acuerdo a los estudios realizados por Dixon (Dixon, Shi et al. 1996) mediante PCR, el gen que codifica para gran parte de los canales de  $K$  de la corriente  $I_{to}$  del endocardio es el Kv4.3 tanto en humanos como en perros. El Kv4.3 y Kv4.2 contribuyen a esta misma corriente en el corazón de rata y las diferencias de su expresión en cada región ventricular contribuyen a las características cinéticas de la corriente. Por ejemplo, en el ventrículo de rata, la expresión de Kv4.2 es significativamente menor en endocardio que en epicardio, mientras que la expresión de Kv4.3 se mantiene a través de toda la pared del ventrículo (Xu, Dixon et al. 1996; Bassani 2006).

La corriente neta  $I_{to}$  es el resultado del flujo de  $K^+$  a través de, al menos, dos diferentes tipos de canales asociados con diferentes isoformas de la proteína formadora de este canal. Estos canales difieren especialmente de su inactivación dependiente de voltaje y en la recuperación de la inactivación en estado estacionario. Se reconoce la  $I_{to,f}$  (fast  $I_{to}$ ) que se debe a canales que se recuperan de la inactivación en menos de 100 ms, cuyas subunidades  $\alpha$  son codificadas por el gen  $Kv1.4$ ; mientras que los canales de la corriente  $I_{to,s}$  (slow  $I_{to}$ ) se recuperan de la inactivación en algunos segundos y sus subunidades  $\alpha$  son codificados por  $Kv4.2$  y  $4.3$ . En las células endocárdicas tanto el componente  $I_{to,f}$  como el  $I_{to,s}$  de la corriente es menor a comparación de las células epicárdicas (Nerbonne and Guo 2002; Bassani 2006).

### ***Corriente IK***

La corriente rectificadora tardía de potasio (delayed rectifier K current,  $I_K$ ), es importante en la fase 3, de repolarización tardía, y regula la duración del potencial de acción (Anumonwo and Lopatin 2010; Charpentier, Merot et al. 2010).

La corriente  $I_K$  se activa a potenciales similares que  $I_{to}$ , -30mV (Nerbonne and Kass 2005). Está compuesta por un componente rápido ( $I_{Kr}$ ) codificado por HERG (human ether a go-go related gene, actualmente conocido como  $KCNH2$ ), y uno lento ( $I_{Ks}$ ) codificado por  $KvLQT1/minK$  (Tomaselli and Marban 1999; Charpentier, Merot et al. 2010). Debe mencionarse sin embargo, otro componente de la  $I_K$ , la corriente  $I_{Kur}$  ( $I_{K(\text{ultrarápido})}$ ), de muy rápida activación y de un proceso de inactivación más lento (largely noinactivation), presente sólo en cardiomiocitos atriales.

### ***Corriente IK1***

La corriente entrante rectificadora de potasio (inward rectifier K current,  $I_{K1}$ ) mantiene el potencial de membrana en reposo y contribuye a la fase terminal de repolarización (Miake, Marban et al. 2003). Existen otras corrientes entrantes rectificadoras de la familia  $Kir$ , que son importantes para la función correcta cardíaca, como la corriente  $I_{K_{ATP}}$ , cuyos canales son inhibidos por ATP intracelular y activados por nucleótidos difosfatos (Nerbonne and Kass 2005) y la corriente  $I_{K_{ACh}}$ , activada por receptor y que está mayormente presente en el tejido auricular cardíaco, como en el nodo sinoauricular, donde juega un rol crítico en la regulación de la frecuencia cardíaca por actividad del nervio vagal (Anumonwo and Lopatin 2010).

Los canales de la corriente  $I_{K1}$ , presente en los cardiomiocitos ventriculares de los mamíferos, incluyendo a la rata y el humano, son heterotetrámeros de subunidades de la familia Kir2.X (Nagashima, Tohse et al. 2001; Kubo, Adelman et al. 2005). De manera específica, el gen KCNJ12 codifica para la proteína Kir2.2, el gen KCNJ2 codifica para la proteína Kir2.1, y el gen KCNJ4 codifica para la proteína Kir2.3, que son subunidades de los canales  $I_{K1}$  (Ishii, Yamagishi et al. 1994; Nerbonne 2000). En la rata adulta el gen principal que codifica para los canales de la corriente  $I_{K1}$  es KCNJ2 (Kir2.2) (Nagashima, Tohse et al. 2001). La combinación de las subunidades que conforman este canal permiten la existencia de la variabilidad observada en la corriente  $I_{K1}$  en diferentes órganos, tejidos e incluso en regiones membranales de una misma célula (Anumonwo and Lopatin 2010).

La densidad de la corriente  $I_{K1}$ , entrante, incrementa a potenciales negativos al potencial de equilibrio del potasio y disminuye con la despolarización de la membrana; a potenciales positivos del potencial de equilibrio la corriente se vuelve saliente (Anumonwo and Lopatin 2010). Esta naturaleza rectificadora entrante de la corriente implica que los canales participen en la estabilización del potencial de reposo de las células que los expresan, y en el caso de los cardiomiocitos, que participe en la repolarización del potencial de acción.

- **ALTERACIÓN DE LA FUNCIÓN CARDIACA EN LA DIABETES**

La DM es un factor de riesgo independiente para sufrir insuficiencia cardiaca (de Simone, Devereux et al. 2010; Davì, Santilli et al. 2012) y representa un factor de riesgo importante de muerte cardiaca repentina causada, por un mecanismo predominante de taquiarritmias ventriculares (Balkau, Jouven et al. 1999; Movahed, Hashemzadeh et al. 2007; Spooner 2008). Estudios basados en poblaciones, como los de From y colaboradores han mostrado que el factor de riesgo de insuficiencia cardiaca está aumentado alrededor de 2 veces en pacientes diabéticos (From, Leibson et al. 2006).

Existen evidencias clínicas de que en presencia de DM2 pueden desarrollarse importantes alteraciones del tejido miocárdico, como anomalías estructurales y metabólicas, que eventualmente conllevan a una hipertrofia ventricular izquierda, a una disfunción sistólica, diastólica o a una combinación de estas (Davì, Santilli et al. 2012). Pueden estar presentes también defectos en la función contráctil (Hayat, Patel et al. 2004; Davì, Santilli et al. 2012) y anomalías electrocardiográficas (Rozanski and Xu 2002; Veglio, Bruno et al.

2002; Clemente, Pereira et al. 2012; Giunti, Gruden et al. 2012; Miki, Tobisawa et al. 2014).

Todas estas alteraciones, en la DM2, que conllevan a disfunción ventricular cardiaca, se desarrollan en ausencia de enfermedades congénitas, enfermedad coronaria, aterosclerosis e hipertensión en pacientes diabéticos (Fang, Prins et al. 2004; Hayat, Patel et al. 2004; Scognamiglio, Avogaro et al. 2004; Poornima, Parikh et al. 2006; Bugger and Bode 2014).

Por otro lado, numerosos estudios experimentales en modelos animales, han demostrado un efecto negativo de la DM en el miocardio. Los mecanismos fisiopatológicos incluyen alteraciones metabólicas, alteraciones de la homeostasis de calcio (Belke, Swanson et al. 2004; Bidasee, Zhang et al. 2004), alteraciones en la utilización del sustrato utilizado para la obtención de energía que genera un incremento en el uso de lípidos y una disminución de la oxidación de glucosa, (Stanley, Lopaschuk et al. 1997; Sharma, Adroque et al. 2004), acumulación de lípidos (Rijzewijk, van der Meer et al. 2008), lipotoxicidad (Sharma, Adroque et al. 2004), glucotoxicidad con intervención de productos de la glucosilación avanzada (Norton, Candy et al. 1996), inflamación (Diamant, Lamb et al. 2005), disfunción mitocondrial (Anderson, Kypson et al. 2009), incremento del estrés oxidativo (Singh, Le et al. 2008; Arumugan and Watanabe 2013), activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (Frustaci, Kajstura et al. 2000; Singh, Le et al. 2008) y predisposición genética (Gaikwad, Sayyed et al. 2010). Todos estos mecanismos llevan a un incremento en la muerte celular (Frustaci, Kajstura et al. 2000) y fibrosis miocárdica (Singh, Le et al. 2008), con el consecuente desarrollo de disfunción miocárdica e insuficiencia cardiaca.

Las alteraciones estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo presentes en la DM han sido ampliamente estudiadas pero existen pocos estudios sobre el impacto de la diabetes en el ventrículo derecho aun cuando la disfunción de este ventrículo es fuerte predictor de desarrollo de fibrilación atrial (Aziz, Kukin et al. 2010).

Un estudio realizado mediante imagen por resonancia magnética en 78 pacientes masculinos de entre 45 y 65 años de edad, con DM2 sin isquemia cardiaca, reportó que las dimensiones y función del ventrículo derecho se encontraban afectadas similarmente al ventrículo izquierdo. En este mismo estudio se realizaron pruebas de ecocardiograma y se reportó que en el ventrículo derecho el pico de velocidad de llenado, el volumen al final de la diástole y el pico de desaceleración de la onda E, la cual refleja la fase de relajación y la fase de llenado rápido inicial del ventrículo, fueron menores en pacientes con diabetes con

respecto a pacientes sanos, lo que indica deterioro en la relajación miocárdica y/o un aumento de su rigidez (Widya, van der Meer et al. 2013).

Un estudio en un modelo animal (van den Brom, Bosmans et al. 2010), demostró mediante ecocardiografía que en las ratas con DM2 y obesidad, Zucker diabetic fatty (ZDF), de 14 semanas de edad existía una significativa disminución de la función sistólica tanto del ventrículo derecho como del izquierdo. Se determinó además que, en ambos ventrículos, las tasas metabólicas de utilización de glucosa estaban disminuidas 66% y 60% respectivamente, con respecto a sus controles. En este estudio se reportó que en la remodelación de ambos ventrículos de las ratas ZDF no existía fibrosis miocárdica; en el ventrículo izquierdo se encontró hipertrofia de cardiomiocitos en ausencia de dilatación del ventrículo y, por el contrario, se encontró una dilatación del ventrículo derecho sin hipertrofia de los cardiomiocitos en este ventrículo. Como referencia, en el Apéndice I se incluyen las gráficas de los resultados mencionados de este trabajo.

La obesidad, al ser una condición en la que existe un exceso de tejido adiposo corporal, y generalmente asociada a la DM, está en relación con el desarrollo de alteraciones en la función cardíaca (Barthelemy, Jacqueminet et al. 2008; ADA 2014). En este aspecto, el tejido adiposo no debe considerarse meramente como un almacén pasivo de grasa, sino como un órgano vascularmente difuso de gran impacto metabólico cardíaco. El aumento en el contenido de triglicéridos plasmáticos ha sido asociado con datos ecocardiográficos de disfunción diastólica (relación radio E/A <1, y tiempo de desaceleración de la onda E >275ms) (Rijzewijk, van der Meer et al. 2008).

De las Fuentes y colaboradores, (de las Fuentes, Waggoner et al. 2005) proponen que la disminución de la función diastólica del ventrículo izquierdo junto al incremento de su masa, pueden estar correlacionadas también a la alteración funcional del ventrículo derecho. De acuerdo a Fuentes y colaboradores, la acumulación de triglicéridos intracelulares puede interrumpir el acople excitación-contracción a través del proceso de lipotoxicidad. En este proceso la acumulación de ácidos grasos libres y grasas neutras dentro del cardiomiocito llevaría a la formación de especies reactivas de oxígeno que pueden inducir la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplasmático lo cual elevaría la concentración intracelular de este ión,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ , provocando por un lado la disminución de la fuerza de contracción y posteriormente la apoptosis celular, lo cual eventualmente provocaría una disfunción orgánica (Unger 1995; Borradaile and Schaffer 2005).

En otro estudio realizado con el mismo modelo animal de DM2, ratas ZDF, se demostró que la acumulación intramiocárdica de lípidos está relacionada positivamente con la disfunción contráctil (Sharma, Adroque et al. 2004). Además,

se reportó un aumento en la expresión de genes de receptores activados por proliferadores de peroxisomas  $\alpha$  (PPAR- $\alpha$ ), la isoforma  $\beta$  de la cadena pesada de miosina (MHC- $\beta$ ) y del TNF- $\alpha$  en el grupo animal con DM2. En este mismo estudio, se analizó la acumulación intramiocárdica de lípidos y expresión genética en pacientes con diabetes mellitus y obesidad con disfunción cardiaca no isquémica encontrando resultados similares a los del modelo animal. El PPAR- $\alpha$  es un receptor nuclear que cuando es activado por ácidos grasos de cadena larga induce la expresión de proteínas que incrementan el consumo y oxidación de ácidos grasos; su sobreexpresión en corazón induce disfunción cardiaca (Finck, Han et al. 2003). Por su parte, el TNF- $\alpha$  es una citoquina inflamatoria que se relaciona positivamente con la resistencia a la insulina y que puede causar directamente disfunción contráctil en el corazón ya que favorece una remodelación patológica (Mann 2002). Finalmente, la MHC- $\beta$  tiene una actividad ATPasa mucho menor que la isoforma  $\alpha$  (MHC- $\alpha$ ), lo que resulta en una disminución en la velocidad de contracción (Holubarsch, Goulette et al. 1985).

La insuficiencia cardiaca, que se presenta también en pacientes diabéticos, incluye complejos cambios en la estructura y función de los cardiomiocitos. Estos cambios incluyen procesos que generan una remodelación eléctrica, que es caracterizada por alteraciones a largo plazo en los canales iónicos en un esfuerzo compensatorio para mantener su función o como resultado de un intento de readaptación. Así, las alteraciones electrofisiológicas más frecuentes en los pacientes diabéticos, que coinciden además con datos obtenidos en modelos animales con diabetes mellitus tipo 1 (DM1), están relacionadas con la repolarización del músculo cardiaco debido a un aumento en la duración del potencial de acción lo que conlleva a un aumento en el riesgo de generación de arritmias (Rozanski and Xu 2002).

En el electrocardiograma (ECG), estudio clínico de relevancia para el diagnóstico de alteraciones eléctricas cardiacas, el segmento QT refleja la duración total de la despolarización y repolarización miocárdica ventricular. La dispersión del intervalo QT (QTd) es el máximo intervalo QT menos el mínimo intervalo QT y está ligado a la repolarización ventricular. Un QTd sobre 80 ms es considerado anormalmente largo e incrementa el riesgo de muerte (HR 1.26) en pacientes con DM2 (Giunti, Gruden et al. 2012). Un aumento en el QTc (QT corregido por la frecuencia cardiaca) y en el QTd (dispersión del segmento QT) reflejan una repolarización ventricular anormal y son considerados predictores de mortalidad cardiovascular en pacientes con DM2 (>400ms y >80ms, respectivamente) (Christensen, Gall et al. 2000; Giunti, Gruden et al. 2012; Fagher, Nilsson et al. 2014). Además una prolongación en intervalo  $T_{peak}-T_{end}$ , otro parámetro que indica dispersión transmural de la repolarización ventricular,

también está asociado con incremento de riesgo de muerte cardiaca repentina (Panikkath, Reinier et al. 2011). Como referencia, en el Apéndice II se incluyen algunas de las gráficas de los resultados de estos trabajos.

Veglio y colaboradores (Veglio, Bruno et al. 2002) reportaron, con respecto a una población de sujetos sin alteraciones en el electrocardiograma (ECG), que la prevalencia de la prolongación del segmento QT es más alta en pacientes con DM1 (16%) y DM2 (26%); además, el QTd está incrementado también en un 8% y 33% en la DM1 y DM2 respectivamente. Clemente y colaboradores, por su parte (Clemente, Pereira et al. 2012), realizaron un estudio en un grupo de pacientes con DM2 y reportaron que parámetros electrocardiográficos de repolarización ventricular como el QTc, QTd y Tpeak-Tend fueron mayores que los obtenidos en sujetos sanos, lo que demuestra una mayor vulnerabilidad en los pacientes diabéticos de generación de arritmias ventriculares.

Más recientemente, Miki y colaboradores (Miki, Tobisawa et al. 2014) realizaron un análisis retrospectivo en pacientes con DM2 para estudiar la influencia que tiene el control de glucemia sobre las repolarización ventricular anormal en estos pacientes y determinaron que esta no disminuye inmediatamente las anomalías electrocardiográficas. Este estudio reportó, en los pacientes con DM2, la prolongación de intervalo QTc, el aumento de la dispersión de QT y del  $T_{peak}-T_{peak}$  con respecto al grupo control, que indican un incremento en la heterogeneidad de la repolarización ventricular. Estas alteraciones permanecieron después de un periodo de hasta más de 3 años y medio de tratamiento hipoglucemiante intensivo.

Existen evidencias, así, de que la DM causa un aumento de la dispersión espacial normal de la repolarización cardiaca lo que puede contribuir al aumento de la heterogeneidad eléctrica ventricular y a la generación de arritmias (Clemente, Pereira et al. 2012; Giunti, Gruden et al. 2012; Miki, Tobisawa et al. 2014).

Aun cuando las características de las corrientes iónicas varían considerablemente de especie a especie, la repolarización del tejido cardiaco en los mamíferos está dada principalmente por las corrientes selectivas de potasio que llevan el potencial de membrana de vuelta al potencial de reposo (Tomaselli and Marban 1999; Nerbonne and Kass 2005). En el miocardio, los cambios en la expresión de los canales de potasio por una remodelación patológica tienen efectos dramáticos en la forma del potencial de acción, propagación y ritmicidad de la contracción cardiaca, lo que puede generar focos de arritmias (Nerbonne and Guo 2002).

En un estudio de Shimoni y colaboradores (Shimoni, Ewart et al. 1998) registraron las corrientes de  $K^+$  en cardiomiocitos del ventrículo cardiaco derecho de modelos animales de DM1 y DM2. Utilizaron ratas tratadas con estreptozotocina (STZ) para generar el modelo de DM1 y ratas sometidas a una dieta rica en fructosa (66% de las calorías totales) para el modelo de DM2. En sus resultados, Shimoni y colaboradores reportaron que en su modelo de DM1, la corrientes  $I_{to}$  e  $I_{ss}$  disminuyeron entre +10 y +50 mV y entre los 0 y +50 mV, respectivamente. En su modelo de DM2 la disminución de  $I_{to}$  no fue significativa, mientras que la  $I_{ss}$  aumentó significativamente a los +40 y +50mV, siendo esta la diferencia más marcada. La corriente  $I_{K1}$  no presentó cambios en ninguno de los dos modelos. En cuanto a la duración del potencial de acción (DPA) ( $11.9 \pm 1.4$  ms a 0mV y  $40.5 \pm 3.2$  ms a -50mV en grupo control), esta estuvo aumentada significativamente sólo en el modelo de DM1 ( $91.1 \pm 8.9$  ms a 0mV y  $200.3 \pm 13.7$  a -50mV) y disminuyó en su modelo de DM2 ( $9.4 \pm 2.6$  ms a 0mV y  $32.4 \pm 11.8$  a -50mV). De acuerdo a Shimoni y colaboradores, la prolongación del potencial de acción observado se debe a la disminución de las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{ss}$  en el modelo de DM1 y, en el caso de DM2, la ausencia de reducción de  $I_{to}$  y el exceso de  $I_{ss}$  son los causantes de la disminución de la duración del potencial de acción.

Un estudio realizado en ratas Wistar con DM inducida por STZ (Casis, Gallego et al. 2000), reportó que hay una disminución del 50% en la corriente  $I_{to}$  y de un 40% en la corriente  $I_{ss}$  en cardiomiocitos ventriculares aislados del ventrículo derecho, subepicardio del ápex del ventrículo izquierdo y subendocardio de la base del ventrículo izquierdo. Casis y colaboradores reportaron, además que la corriente  $I_K$  disminuye de manera variable en estas porciones ventriculares (entre el 10 y 48%), demostrando, así, que existen diferencias regionales en la afectación ventricular de estas corrientes en la DM1.

En un trabajo de Lengyel y colaboradores (Lengyel, Virag et al. 2007), se analizaron, en corazones caninos, los efectos de la diabetes experimental tipo 1 (inducida por aloxán) en la repolarización ventricular, las corrientes iónicas que la fundamentan y las proteínas de sus canales. Utilizando las técnicas de electrocardiograma y fijación de voltaje en células completas, determinaron que el intervalo QTc y la duración del potencial de acción en los perros diabéticos estaban moderadamente prolongados con respecto a su grupo control. Utilizaron los músculos papilares del ventrículo derecho para registrar potencial de acción y cardiomiocitos aislados de mediomiocardio ventricular izquierdo para registrar las corrientes iónicas. Reportaron una reducción significativa en la densidad de la corriente  $I_{to}$  (reducción al 54.5%) e  $I_{Ks}$  (al 69.3%) sin alteraciones en la dependencia de voltaje de la activación e inactivación de los canales para estas corrientes. Lengyel y colaboradores reportaron que no observaron diferencias en

la densidad de la corriente  $I_{K1}$ ,  $I_{Kr}$  e  $I_{Ca}$ . Además, complementaron su estudio con análisis de Western Blot y reportaron una reducción en la expresión de Kv4.3 (para subunidad alfa de  $I_{to}$ ) (al  $25\pm 21\%$ ) y Mink ( $I_{Ks}$ ) (al  $48\pm 9\%$ ) en el grupo de perros diabéticos, lo que puede explicar, en parte, la reducción de las corrientes  $I_{to}$  e  $I_{Ks}$  en su estudio.

Torres-Jacome y colaboradores, por su parte, (Torres-Jacome, Gallego et al. 2013) realizaron un estudio registrando potenciales de acción y corrientes de  $K^+$  en cardiomiocitos ventriculares aislados de ratones y conejos con DM1 inducida por STZ y aloxán. Demostraron que la diabetes tipo 1 reduce la amplitud de las corrientes  $I_{to,fast}$ ,  $I_{to,s}$  e  $I_{Ks}$  en estas células, pero no encontraron alteraciones en las corrientes  $I_{ss}$ ,  $I_{Kr}$  o  $I_{K1}$ . Además, mediante inmunofluorescencia, determinaron que hay una reducción de la expresión de proteínas del canal y que esto se debe a la activación de AMP-dependent protein kinase (AMP-K), secundaria al deterioro metabólico celular; concluyeron así, que esto explica la reducción de la densidad de las corrientes  $K^+$  en los miocitos ventriculares en la diabetes.

- **RATAS ZUCKER DIABETIC FATTY (ZDF) COMO MODELO ANIMAL DE DM2**

La mutación del gen *fa* en estas ratas fue descubierta por Zucker y Zucker entre 1961 y 1963, en ratas provenientes de la cruce de las ratas M (13M) de Sherman y Merck (Kava, Greenwood et al. 1990), a esta nueva cepa de rata se le dio el nombre de ratas Zucker Fatty (ZF) (Zucker and Zucker 1961). Fue de estas ratas en las que años después de desprendió la cepa Zucker Diabetic Fatty (ZDF), en la que se descubrió el desarrollo de DM2 en los machos, que presentaban altos niveles de glucosa sanguínea e intolerancia a la glucosa; así, la cepa de ratas ZDF ha sido usada por otros grupos como modelo animal de MD2 desde su primera descripción a finales de los años 80, ya que muestra características de esta enfermedad (Clark, Palmer et al. 1983). Este modelo ha sido utilizado para el estudio del desarrollo de la enfermedad y de sus complicaciones a largo plazo.

En las ratas ZDF machos, la evolución de la enfermedad hacia diabetes ha sido caracterizada previamente por otros grupos; conforme avanza su edad, desarrollan resistencia a la insulina progresiva e intolerancia a la glucosa (semana 3 a 8), y a partir de la decima semana después del nacimiento, el animal es diabético (Srinivasan and Ramarao 2007; Daniels, Linz et al. 2012; Joost, Al-Hasani et al. 2012; Katsuda, Ohta et al. 2014).

Existen dos fenotipos de esta cepa, el obeso que en este trabajo denominamos como "ZDF", es portador de una mutación en el gen "fa" que codifica para el receptor de leptina (Chua, Chung et al. 1996; Takaya, Ogawa et al.

1996; Joost, Al-Hasani et al. 2012). Esta mutación es recesiva y al presentarla en homocigosis la rata expresa el receptor a leptina no funcional (Arias-Diaz and Balibrea 2007), lo que causa un defecto en la interacción entre este y la leptina, interrumpiendo entre otras cosas, la señal de saciedad en el hipotálamo. De esta manera, las ratas ZDF son hiperfágicas, comparadas con sus compañeras de camada, ratas Lean, desde el día 17 de edad (Kava, Greenwood et al. 1990), lo que facilita el desarrollo de obesidad a partir de la tercera semana de su nacimiento (Johnson, Zucker et al. 1971; Peterson, Shaw et al. 1990; Takaya, Ogawa et al. 1996; Arias-Diaz and Balibrea 2007). A las 13 semanas de edad el tejido graso alcanza alrededor del 40% de la composición corporal (Zucker and Antoniades 1972). Es importante mencionar que para garantizar las características de la rata ZDF, se recomienda que su dieta se mantenga con alimento Purina 5008 (Peterson, Shaw et al. 1990).

Otra consecuencia de la pérdida en la regulación mediada por el receptor a leptina es que las ratas ZDF presentan grandes cantidades circulantes de esta hormona respecto a sus controles Lean. De acuerdo a Hardie y colaboradores, (Hardie, Rayner et al. 1996), los niveles de leptina circulante en las ratas Lean, de entre 10 a 12 semanas de edad, es de aproximadamente 4 ng/ml, mientras que en la rata ZDF de la misma edad alcanza los 25 ng/ml.

El otro fenotipo de esta cepa de ratas es al que en este trabajo nos referimos como "Lean", a diferencia de las ZDF, estas ratas son delgadas como las de la cepa Long Evans, no desarrollan obesidad con la edad y, es importante decirlo, tampoco diabetes (Johnson, Zucker et al. 1971; Schafer, Huber et al. 2006; Arias-Diaz and Balibrea 2007; Daniels, Linz et al. 2012; Joost, Al-Hasani et al. 2012). Sin embargo, los animales son portadores del gen mutado del receptor a leptina, pero solo en un alelo. La mutación es recesiva y requiere de ambos alelos para expresar la mutación del receptor, por lo cual en estas ratas, si hay expresión de un receptor a leptina funcional.

Además de la obesidad que caracteriza a las ratas ZDF, estos animales presentan diversas alteraciones endócrinas. Las ratas macho de esta cepa, además de la resistencia a la insulina, presentan poliuria, hiperglucemia, hiperinsulinemia temprana, dislipidemia, intolerancia a la glucosa y aumento en la HbA1 a partir de la sexta semana de edad (Stern, Johnson et al. 1972; Clark, Palmer et al. 1983; Peterson, Shaw et al. 1990; Friedman, de Vente et al. 1991; Peterson 2003; Fredersdorf, Thumann et al. 2004; Daniels, Linz et al. 2012); además tienen una disminución en el transporte de glucosa basal y estimulado por insulina (Kava, Greenwood et al. 1990). Esta última es detectable a las 3 semanas de edad y persiste durante toda la vida de los animales.

A partir de la sexta semana de edad los niveles de glucosa, por ejemplo, incrementan y alcanzan hasta los 500 mg/dl en ratas de más de tres meses de edad. La insulina, por otro lado, alcanza niveles significativamente mayores comparadas con sus controles y posteriormente disminuye alrededor de la semana 12 hasta el valor de 1ng/ml, valor que se mantiene a lo largo del tiempo. (Clark, Palmer et al. 1983; Peterson, Shaw et al. 1990).

En este modelo animal de DM2, los cambios tempranos en el páncreas son una hipertrofia de los islotes y una degranulación de las células  $\beta$ , que son causados por el desarrollo de hiperinsulinemia. La morfología de los islotes pancreáticos difieren entre las ratas ZDF y sus controles desde las 7 semanas de edad (prediabéticas) y estas diferencias se vuelven más pronunciadas en semanas posteriores. Además, hay una buena correspondencia entre los incrementos en los contenidos de DNA en los islotes y los niveles séricos de insulina, lo que sugiere que la hiperplasia de los islotes juega un papel determinante en el desarrollo de la hiperinsulinemia en estas ratas (Katsuda, Ohta et al. 2014). Posteriormente, la hiperglicemia prolongada y desarrollo de diabetes induce cambios degenerativos como atrofia, apoptosis de células  $\beta$ , infiltración de células inflamatorias que finalmente conduce a una fibrosis y al remplazo de los islotes por tejido conectivo, lo que coincide con la disminución de la insulina (Shimabukuro, Zhou et al. 1998; Katsuda, Ohta et al. 2014). Las ratas ZDF, además, tienen una disminución de los transportador GLUT2 en las células pancreáticas que parece impedir una secreción efectiva de insulina estimulada por glucosa que pueda corregir la hiperglucemia (Orci, Ravazzola et al. 1990; Friedman, de Vente et al. 1991; Unger 1991; Peterson 2003).

A partir de la semana 10 y con la instauración de la DM, se inician a hacer evidentes las complicaciones sistémicas de esta enfermedad (Peterson 2003; Katsuda, Ohta et al. 2014). Estudios en este modelo animal de DM2, han reportado la presencia de disfunción ventricular y disminución de las tasas metabólicas de utilización de glucosa en el corazón, además de acumulación intramiocárdica de lípidos que se relaciona positivamente con una disfunción contráctil y remodelación patológica cardíaca (Sharma, Adroque et al. 2004; van den Brom, Bosmans et al. 2010). Puede mencionarse, además, los niveles bajos de testosterona en las ratas macho con respecto a sus controles por un defecto en la producción testicular de esta hormona (Peterson 2003); disminución de la sensibilidad central a la insulina (Latteman 1989); daño renal (Kasiske, O'Donnell et al. 1992; Coimbra, Janssen et al. 2000; Daniels, Linz et al. 2012; Raza, John et al. 2013); alteraciones vasculares como la disminución de la densidad capilar periférica (Lash, Sherman et al. 1989), neuropatía (Shimoshige, Ikuma et al. 2000;

Oltman, Coppey et al. 2005) y retinopatía (Danis and Yang 1993). La mayoría de estas alteraciones están presentes en la DM2 en el humano.

Se han reportado, además, que en las ratas ZDF existe una disminución de los niveles del transportador de glucosa GLUT4 muscular consistente con el desarrollo de resistencia a la insulina (Friedman, de Vente et al. 1991), que es una de las características del estado prediabético y de la DM2 (Ishikawa, Saito et al. 1998). También a nivel cardiaco, se ha encontrado una disminución de ese transportador (Sliker, Sundell et al. 1992).

Como se ha descrito, las complicaciones sistémicas en las ratas ZDF se presentan a lo largo de la vida del animal, por lo que gran parte de la variabilidad de resultados al usar a este como un modelo de DM2, se deben a que en los trabajos se utilizan animales de diferente edad (Wijekoon, Hall et al. 2005; Daniels, Linz et al. 2012) , encontrando por lo tanto características fenotípicas diversas.

La rata ZDF es un modelo animal ampliamente utilizado para el estudio de la DM2 y si bien, ningún modelo animal puede replicar completamente la DM2 humana, este modelo animal, como muchos otros, contribuye de manera específica al estudio de esta patología. Un modelo animal ideal de DM2 debe desarrollar las características de esta patología en el humano, como hiperglucemia con disminución de la función de las células  $\beta$  o pérdida de estas células y resistencia a la insulina, además de presentar las complicaciones típicas de un estado diabético, como patología cardiovascular, renal y nerviosa, tal como ocurre en las ratas ZDF.

## ANTECEDENTES

Existen evidencias clínicas de que la DM causa una remodelación eléctrica caracterizada por un retraso en la repolarización del potencial de acción cardiaco, que puede aumentar la dispersión espacial de la repolarización cardiaca, ya existente en condiciones normales, y que contribuyen al aumento de la heterogeneidad eléctrica ventricular y al riesgo de generación de arritmias (Christensen, Gall et al. 2000; Rozanski and Xu 2002; Clemente, Pereira et al. 2012; Giunti, Gruden et al. 2012; Fagher, Nilsson et al. 2014; Miki, Tobisawa et al. 2014). Por otro lado, en estudios realizados en modelos animales de DM1, se ha demostrado que la causa principal en el aumento de la duración del potencial de acción en células musculares cardiacas es la reducción de las corrientes repolarizantes (Shimoni, Ewart et al. 1998; Casis, Gallego et al. 2000; Veglio, Bruno et al. 2002; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013). Esta disminución, a su vez, es una explicación del aumento de la duración de su potencial de acción y, consecuentemente, del cambio en el intervalo QT del electrocardiograma observado en pacientes diabéticos y modelos animales de DM.

La duración del potencial de acción de las células musculares cardiacas determina el tiempo de repolarización del tejido cardiaco. Así, la prolongación en tiempo del potencial de acción produce retardos en la repolarización de este tejido. Estos cambios en la duración del potencial se deben, principalmente a alteraciones de la cinética de las corrientes repolarizantes (Tomaselli and Marban 1999). Al menos cuatro grandes corrientes de K<sup>+</sup> contribuyen a la repolarización y duración del potencial de acción en el miocardio ventricular ( $I_{to}$ ,  $I_{Ks}$ ,  $I_{Kr}$ ,  $I_{K1}$ ), cada una de diferente densidad y dependencia de voltaje y tiempo (Nerbonne 2000).

# JUSTIFICACIÓN

El aumento en la duración de los potenciales de acción aumenta la dispersión normal de la repolarización en los ventrículos y esto se ve reflejado en la prolongación del intervalo QT del electrocardiograma, como ocurre en la DM2 (Kumar, Fisher et al. 2004). Si los efectos, de disminución, en las corrientes de potasio con la consiguiente prolongación del potencial de acción no son uniformes, se produce un aumento en la heterogeneidad eléctrica del tejido cardiaco y, sumado esto a las alteraciones funcionales y mecánicas del tejido, pueden generarse las condiciones electrofisiológicas para la generación de una arritmia (Nerbonne and Guo 2002).

Las alteraciones estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo en la diabetes han sido ampliamente estudiadas pero existen pocos estudios sobre el impacto en el ventrículo derecho aun cuando la disfunción de este ventrículo es fuerte predictor de desarrollo de fibrilación atrial (Aziz, Kukin et al. 2010). Por otro lado, a pesar de la gran incidencia de la diabetes DM2 en la población mundial y de sus repercusiones en la salud pública, hasta el momento, son escasos los trabajos en los que se han estudiado los cambios que produce este tipo de diabetes en las características electrofisiológicas de las células musculares del tejido cardiaco (Shimoni, Ewart et al. 1998), aún cuando existen numerosos estudios clínicos que demuestran una alteración funcional relacionada a cambios en la dispersión y repolarización del tejido cardiaco y a un aumento en el riesgo de generar sustratos arritmogénicos por aumento en la duración del potencial de acción (Christensen, Gall et al. 2000; Veglio, Bruno et al. 2002; Giunti, Gruden et al. 2012; Widya, van der Meer et al. 2013; Miki, Tobisawa et al. 2014).

Las alteraciones funcionales y electrofisiológicas en el corazón han sido bien documentadas en modelos animales con diabetes mellitus inducida por streptozotocina o aloxán (DM1) (Norton, Candy et al. 1996; Shimoni, Ewart et al. 1998; Bidasee, Zhang et al. 2004; Singh, Le et al. 2008). Se sabe que en la DM1 existe una disminución de las corrientes repolarizantes de  $K^+$ , que hay una reducción de la expresión de proteínas del canal y que esto se debe a la activación de AMP-K, secundaria al deterioro metabólico celular (Casis, Gallego et al. 2000; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013).

En este trabajo estudiamos los cambios ocasionados por la DM2 sobre la actividad eléctrica del ventrículo derecho. Como modelo experimental usamos a las ratas Zucker o ZDF, la cuales han sido ampliamente utilizadas como modelo animal de diabetes DM2 (Takaya, Ogawa et al. 1996; Daniels, Linz et al. 2012; Joost, Al-Hasani et al. 2012; Katsuda, Ohta et al. 2014). Con ello nos propusimos determinar si este tipo de diabetes induce cambios en la morfología del potencial de acción del endocardio derecho y si dichos cambios se deben a alteraciones en las corrientes de potasio  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$ .

# HIPÓTESIS

En las ratas ZDF, un modelo animal de DM2, existe un aumento de la duración del potencial de acción de los cardiomiocitos del endocardio derecho por una disminución en las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$ , e  $I_{K1}$ .

# OBJETIVOS

- **Objetivo general**

- Analizar, en un modelo de rata de diabetes DM2, la alteración en la duración del potencial de acción y las corrientes repolarizantes  $I_K$ ,  $I_{K1}$  e  $I_{to}$ .

- **Objetivos específicos**

1.-Analizar mediante la técnica de patch clamp, si la diabetes DM2 genera alteraciones en la duración del potencial de acción cardiaco en los miocitos aislados del endocardio del ventrículo derecho proveniente de las ratas Long Evans, Lean Zucker Diabetic Fatty (Lean) y Obese Zucker Diabetic Fatty (ZDF).

A) Registrar los potenciales de acción de los cardiomiocitos aislados provenientes del endocardio derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF

B) Analizar la morfología del potencial de acción registrado en los cardiomiocitos de las tres condiciones

C) Determinar si existen diferencias significativas entre los potenciales de acción registrados en las tres condiciones, sobre todo, en las fases de repolarización.

2.- Determinar si existen cambios en las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$  en los miocitos aislados del endocardio del ventrículo derecho de las tres condiciones.

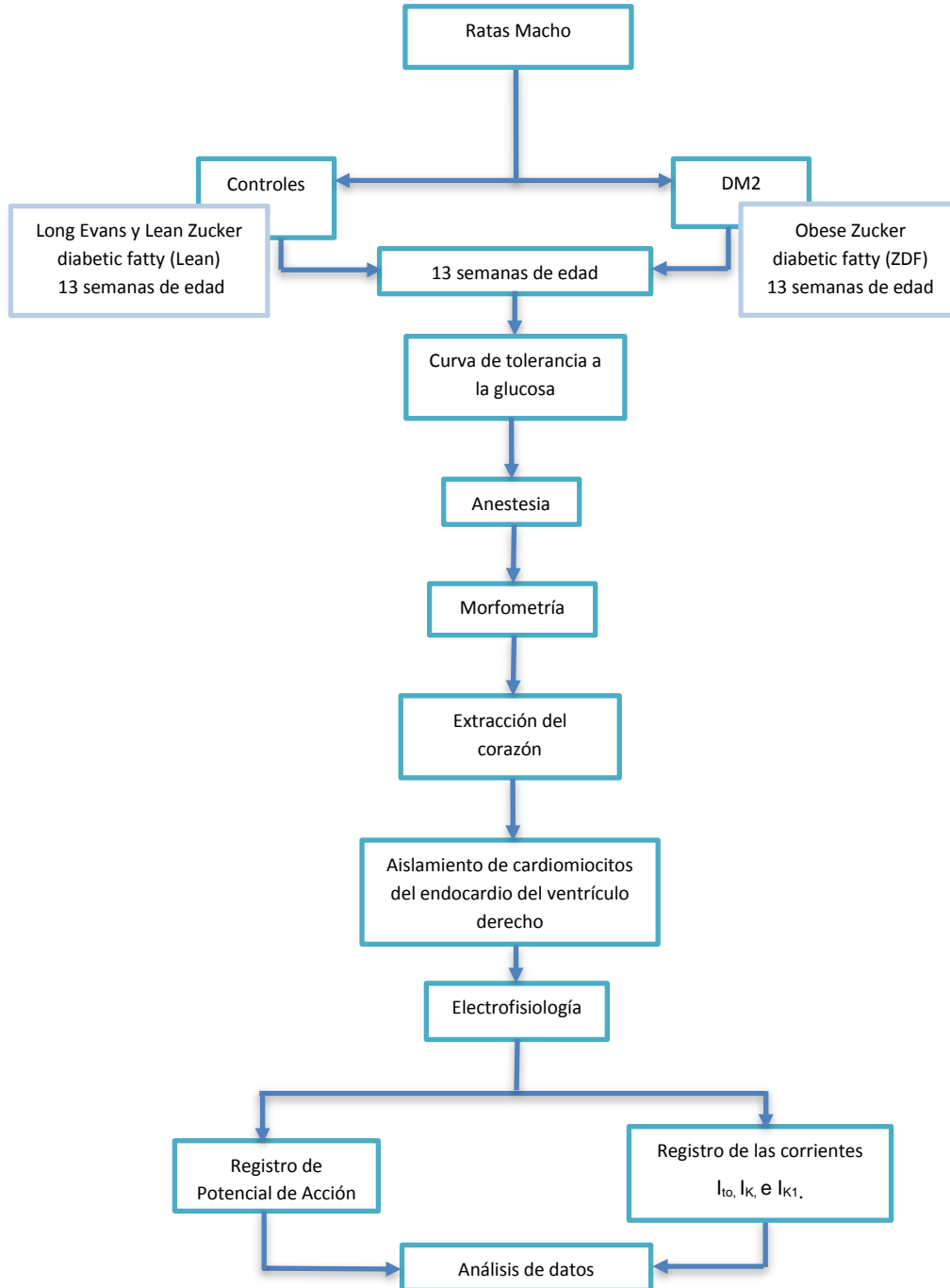
A) Registrar en los miocitos aislados del endocardio del ventrículo derecho las corrientes de potasio  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$ , en ratas Long Evans, Lean y ZDF

B) Analizar las propiedades biofísicas de las corrientes registradas en las tres condiciones y determinar si existen diferencias entre ellas.

3.-Determinar si existe una correlación positiva entre los cambios en la morfología del potencial de acción y las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$ .

# DIAGRAMA DE TRABAJO

Para cumplir con los objetivos antes propuestos seguimos el siguiente esquema de trabajo:



# MATERIAL Y MÉTODOS

- **MODELO ANIMAL**

Utilizamos las ratas ZDF macho adultas de 13 semanas de edad como un modelo animal de DM2. Como grupos controles utilizamos ratas Long Evans y Lean Zucker diabetic fatty (Lean) de la misma edad. Los tres grupos tuvieron libre acceso al agua y alimento LabDiet 5008. Los animales se obtuvieron del bioterio Claude Bernard de nuestra universidad y se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas con temperatura regulada de 23°C a 25°C.

Como se mencionó previamente, el modelo de DM2 en las ratas ZDF ha sido bien caracterizado en numerosos trabajos en los que se ha comprobado el desarrollo de la enfermedad en las ratas obesas macho a partir de la décima semana de edad, usando alguna de las pruebas diagnósticas recomendadas por la ADA para el diagnóstico de DM en el humano (ADA 2014). Aún así, decidimos comprobar que las ratas ZDF utilizadas en este proyecto, presentaran las características de la cepa. Aunque para el diagnóstico de la DM es suficiente que se cumpla uno de los criterios diagnósticos, en nuestro caso decidimos elegir dos de las cuatro pruebas establecidas por la ADA: la prueba de glucosa en plasma durante una curva de tolerancia a la glucosa y la prueba de glucosa en plasma en una toma de muestra aleatoria. Elegimos utilizar estos criterios debido a su practicidad, accesabilidad y bajo costo.

Un día antes del experimento las ratas se mantuvieron en observación y se realizó una curva de tolerancia a la glucosa (ContourTS Bayer): las ratas se sometieron a seis horas de ayuno, con libre acceso al agua. Al concluir este periodo se realizó la medición de los niveles de glucosa en ayuno y posteriormente se administraron 2 g de glucosa por kilogramo de peso por vía intraperitoneal. Se registraron los niveles de glucosa en sangre a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la aplicación (Lopez-Soldado, Niisuke et al. 2015). Antes de iniciar el ayuno se le realizó una prueba para determinar el nivel de glucosa espontáneo. La curva de tolerancia a la glucosa se inició entre las 10 am y 12 pm.

Para comprobar que las ratas ZDF cumplieran con las características morfológicas de la cepa realizamos diferentes mediciones en el animal. El día del experimento, justo antes del sacrificio, se midió la circunferencia abdominal y longitud hocico-ano. Del mismo modo, en paralelo con la obtención de corazón se cuantificó la cantidad de grasa visceral abdominal para determinar los cambios en la cantidad de tejido graso.

- **AISLAMIENTO DE MIOCITOS VENTRICULARES**

Para obtener los miocitos del endocardio derecho de las ratas de las tres condiciones, utilizamos un método de perfusión enzimática. Los animales fueron anestesiados con sevoflurano después de haberles administrado heparina via i.p. (1000 U/Kg) para prevenir la coagulación de la sangre y un posible infarto al miocardio. El corazón de cada espécimen fue extraído y canulado por la aorta en un sistema de perfusión de Langendorff, en el cual la temperatura de salida del sistema de perfusión fue mantenida en un rango de 36 a 37°C (Wolska and Solaro 1996; Lines, Sande et al. 2006; Louch, Mork et al. 2006).

El corazón fue perfundido inicialmente con solución Tyrode durante 10 minutos y posteriormente con solución nominal cero  $Ca^{2+}$  (Tyrode libre de calcio) (Muir 1967) por 10 minutos más. Después, para la digestión enzimática se hicieron perfundir Colagenasa tipo II y Proteasa tipo XIV disueltas en solución libre de calcio (Arechiga-Figueroa, Rodriguez-Martinez et al. 2010) a razón de 0.5 mg/ml y 0.025 mg/ml, respectivamente. En nuestro caso la perfusión enzimática fue durante un tiempo variable que se estableció de acuerdo a varios criterios como el peso del animal, edad y condición experimental, que conllevan a variaciones en el tamaño del corazón y diferencias en la matriz extracelular.

Después de la perfusión con enzimas, el corazón fue lavado con la solución de Kraft-Brüeh y colocado en una cámara de disección para disecar la pared libre del ventrículo derecho seleccionando el endocardio de la pared libre, para aislar cardiomiocitos de esta porción. La preparación fue entonces cortada en piezas pequeñas para realizar la dispersión mecánica por agitación. Las células se mantuvieron en solución de Kraft-Brüeh a 4°C hasta el momento de su uso.

En el Apéndice III se incluye un diagrama de trabajo para el aislamiento de cardiomiocitos; en el Apéndice IV se incluye una tabla con las especificaciones de la Solución Tyrode normal, Solución Tyrode Nominal Cero Calcio y Solución de Kraft-Brüeh, utilizadas para el aislamiento (Shibukawa, Chilton et al. 2005).

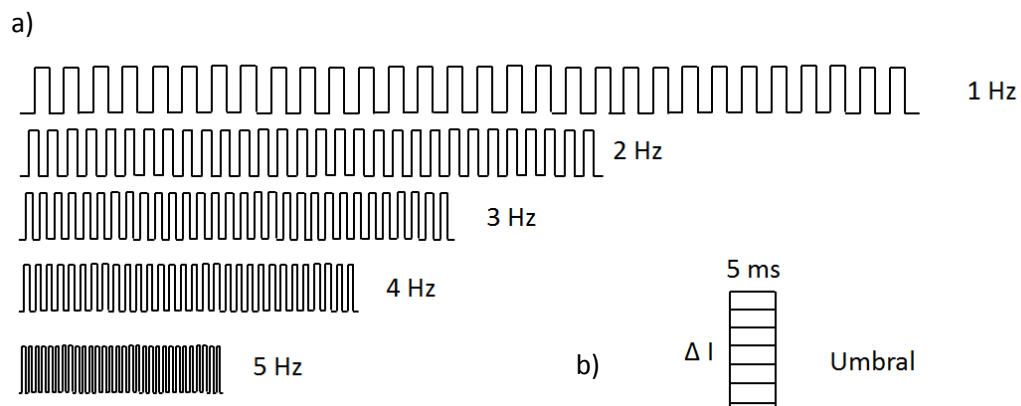
- **REGISTRO DE POTENCIAL DE ACCIÓN**

Para el registro del potencial de acción, en los miocitos aislados, usamos la técnica de patch clamp, en la modalidad de current clamp y configuración de célula completa con parche perforado (Anfotericina 200µM). Los miocitos fueron depositados en una cámara de perfusión montada sobre la platina de un

microscopio invertido y después de 10 minutos se inició la perfusión con solución externa a 36°C.

Para el registro se utilizaron cardiomiocitos provenientes del endocardio derecho, refringentes, con una membrana bien delimitada y con las estrías bien definidas. Los potenciales de acción fueron registrados usando electrodos de borosilicato llenos de solución intracelular y con una resistencia de entre 1.5 y 2.5 MΩ.

Para generar los potenciales de acción aplicamos pulsos cuadrados de 5 ms de duración y de amplitud creciente para determinar primero la corriente mínima necesaria para evocar un potencial de acción. Una vez que la obtuvimos, procedimos a aplicar trenes de estimulación a frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz. Ver **Figura 5**.



**Figura 5** Protocolos de estimulación usados para evocar los potenciales de acción. En a) se muestran los trenes de estimulación de 30 pulsos cada uno a 1, 2, 3, 4 y 5 Hz de frecuencia usados para evocar los potenciales de acción. La amplitud de los pulsos fue determinada con el protocolo que se muestra en b).

Las señales fueron adquiridas a una frecuencia de 25KHz, amplificadas (EPC 10, HEKA), digitalizadas y almacenadas en una computadora personal para su análisis Off-line con el programa Patchmaster versión V2x65 (HEKA Elektronik).

En el Apéndice IV se incluye una tabla con las especificaciones de la Solución Intracelular y Solución externa, utilizadas para registrar los potenciales de acción.

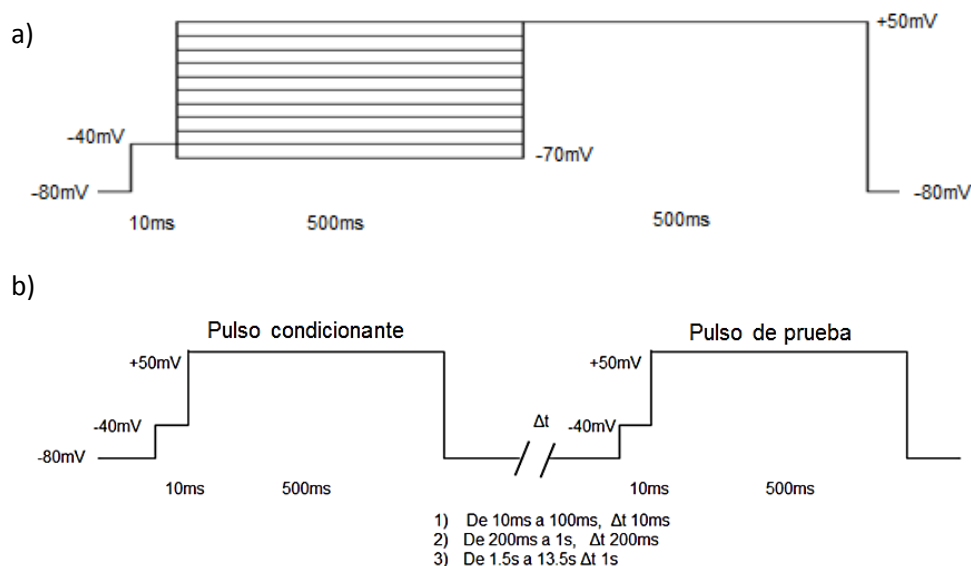
### • REGISTRO DE CORRIENTES DE POTASIO

Para el registro de las corrientes de potasio usamos la técnica de patch clamp en la modalidad de fijación de voltaje y configuración de célula completa

con parche perforado. Los electrodos estuvieron llenados con la misma solución usada para el registro del potencial de acción y sólo se cambió la solución extracelular por una solución baja en calcio y suplementada con cobalto 0.5 mM.

Los protocolos que usamos para evocar la  $I_{to}$  partieron de un potencial de mantenimiento de  $-80\text{mV}$ , se dio un pulso de  $10\text{ ms}$  a  $-40\text{ mV}$ , para inactivar la corriente de sodio, y posteriormente pasos despolarizantes desde  $-70$  hasta  $+50\text{mV}$  en incrementos de  $10\text{ mV}$ , durante  $500\text{ms}$ . Posteriormente se mantuvo un pulso a  $+50\text{mV}$  por  $500\text{ms}$  para finalmente regresar al potencial de mantenimiento, de  $-80\text{mV}$ . Este protocolo fue utilizado para obtener las curvas IV, de activación y de inactivación en estado estacionario de la  $I_{to}$ ; **Figura 6 a).**

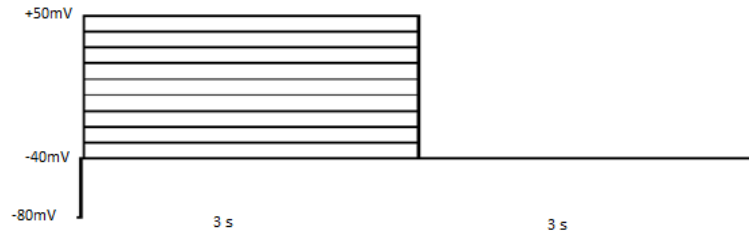
Para poder calcular la recuperación de la inactivación de esta corriente, utilizamos tres protocolos de doble pulso. El pulso condicionante partió de  $-80\text{mV}$ , posteriormente el voltaje se mantuvo a  $-40\text{ mV}$  durante  $10\text{ ms}$  para inactivar la corriente  $I_{Na}$  para después dar un pulso de prueba a  $+50$  durante  $500\text{ ms}$ . El pulso de prueba fue igual al condicionante y sé corrió  $10\text{ ms}$  después de éste. El intervalo entre ambos pulsos se incrementó en  $\Delta t$  de  $10\text{ms}$  hasta llegar a  $100\text{ ms}$ , en el primer protocolo; en  $\Delta t$  de  $200\text{ ms}$  hasta llegar a  $1\text{ s}$  en el segundo, y en  $\Delta t$  de  $1\text{ s}$  hasta llegar a  $13.5\text{ s}$  en el tercer protocolo; **Figura 6b; incisos 1), 2), 3).**



**Figura 6. Representación de protocolos para registro de  $I_{to}$ .** a) Protocolo utilizado para obtener las curvas IV, de activación y de inactivación en estado estacionario. b) Protocolos de doble pulso utilizado para calcular la recuperación de la inactivación.

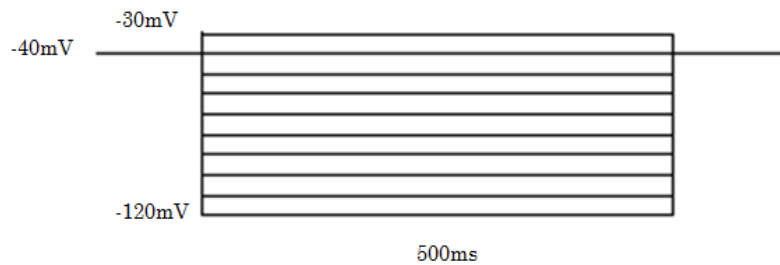
Para generar la  $I_K$ , partimos de un potencial de mantenimiento de  $-80\text{mV}$ , se dio un pulso de  $10\text{ ms}$  a  $-40\text{ mV}$ , para inactivar la corriente  $I_{Na}$ , y posteriormente se

dio una serie de pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta +50 mV, de 3 s de duración y con una delta de 10 mV para después regresar al potencial de reposo de -40mV; **Figura 7.**



**Figura 7.** Representación de protocolo para registro de  $I_k$

Finalmente, para evocar la corriente  $I_{K1}$ , el protocolo de voltaje partió desde -40mV para después iniciar una serie de pasos de voltaje desde -30mV y hasta -120mV que duraron 500ms; **Figura 8.**



**Figura 8.** Representación de protocolo para registro de  $I_{K1}$

En el Apéndice IV se incluye una tabla con las especificaciones de la solución extracelular baja en Calcio (Ca-Co), utilizada para registrar las corrientes de potasio.

### • ESTADÍSTICA

Los resultados se muestran como el valor medio  $\pm$  error estándar de la media a menos que se mencione otra cosa. Para determinar si existía una diferencia significativa, entre los parámetros analizados de cada una de las condiciones, se aplicó una prueba ANOVA de una vía junto con prueba de Tukey utilizando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ .

# RESULTADOS

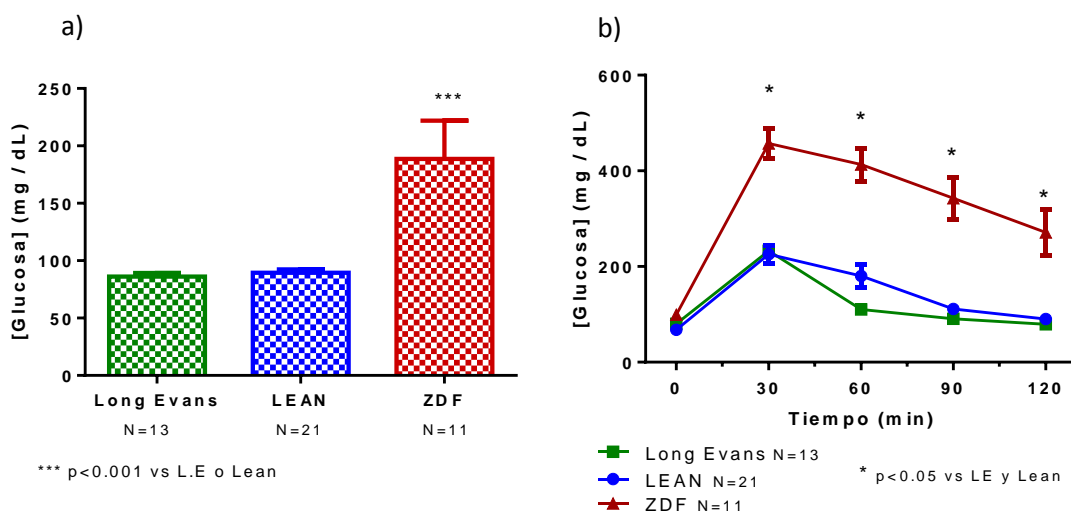
## • RESULTADOS EN EL MODELO ANIMAL

### -Glucosa espontánea y curva de tolerancia a la glucosa

Para asegurarnos que los animales utilizados en este trabajo como grupo problema (ZDF) cumplieran con las características metabólicas presentes en su cepa y en la DM2, y tal como hemos mencionado en el apartado correspondiente, medimos los niveles instantáneos de glucosa en las ratas de las tres condiciones justo antes de iniciar el ayuno previo a la curva de tolerancia a la glucosa.

En los datos obtenidos, mostrados en la **Figura 9 a)**, puede observarse que los niveles espontáneos de glucosa en sangre para el grupo ZDF ( $188.6 \pm 33.41$  mg/dl) son significativamente mayores a los registrados para los grupos Lean ( $89.50 \pm 2.99$  mg/dl) y Long Evans ( $86.15 \pm 3.05$  mg/dl), esto fue confirmado por el análisis estadístico aplicado (ANOVA;  $p < 0.001$ ).

Además, durante la prueba de tolerancia a la glucosa se registraron los niveles de glucosa en sangre a los 30, 60, 90 y 120 minutos después de la aplicación. Los datos obtenidos para cada grupo, Long Evans, Lean y ZDF se muestran en la **Figura 9 b)**. Puede observarse que los niveles de glucosa en sangre para el grupo ZDF son mayores a los registrados para los grupos Lean y Long Evans desde los 30 minutos después de la aplicación de la solución de glucosa (2g/Kg) y durante todo el resto de la prueba. De acuerdo a nuestra estadística este aumento es significativo ( $p < 0.05$ ).

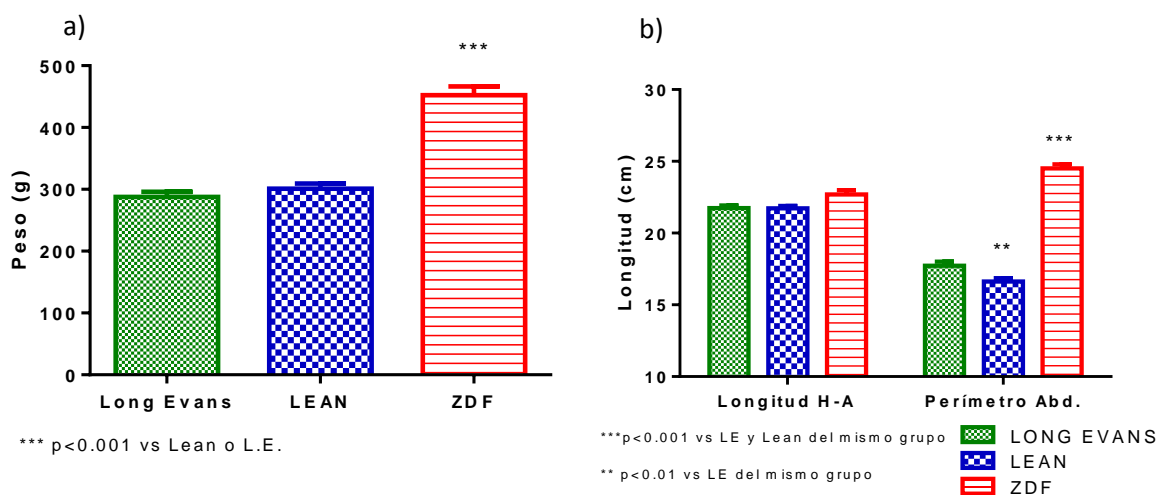


**Figura 9** Glucosa espontánea y curva de tolerancia a la glucosa en las ratas Long Evans, Lean y ZDF a) Glucosa espontánea b) Curva de Tolerancia a la glucosa.

### -Parámetros morfométricos

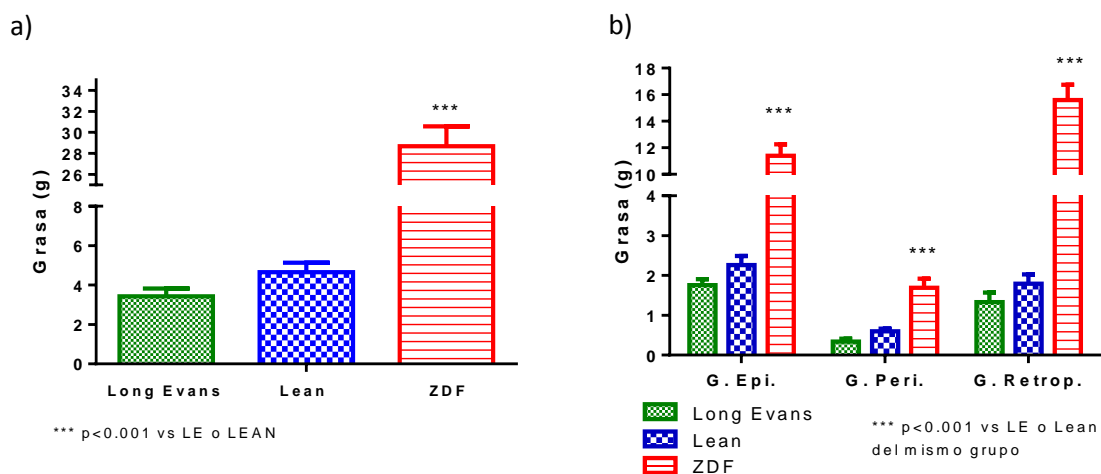
En el apéndice VI se incluyen fotografías de ejemplos de los especímenes utilizados para este proyecto donde pueden apreciarse una diferencia de volumen en las ratas del grupo ZDF al compararlas con las ratas del grupo Lean y Long Evans. Realizamos el análisis estadístico para determinar si existía una diferencia significativa en los pesos correspondientes a las ratas de los tres grupos; **Figura 10**. Como puede apreciarse en la gráfica correspondiente al peso, **Figura 10 a**), existe un aumento significativo de este parámetro en las ratas ZDF ( $452.1 \pm 14.38$  g) al compararlas contra las ratas Lean ( $301 \pm 8.36$  g) y Long Evans ( $287.8 \pm 8$  g) ( $p < 0.001$ ).

Como lo hemos descrito en el apartado de metodología, justo antes del sacrificio de los animales se midieron la longitud hocico-ano y perímetro abdominal. En la **Figura 10 b** se muestran los datos obtenidos para las tres condiciones. Observamos un aumento del perímetro abdominal de las ratas ZDF ( $24.5 \pm 0.28$  cm) al compararlas con las ratas Lean ( $16.63 \pm 0.22$  cm) y Long Evans ( $17.71 \pm 0.28$  cm). La estadística indica que este aumento es significativo para ambas comparaciones ( $p < 0.001$ ). No encontramos diferencias significativas en la longitud hocico-ano entre las tres condiciones.



**Figura 10 Datos morfométricos obtenidos en las ratas utilizadas en este proyecto** a) Pesos finales, en g, de las ratas Long Evans, Lean y ZDF. b) Longitudes hocico-ano (H-A) y perímetro abdominal (Perímetro Abd.) de las ratas de las tres condiciones (\*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ).

Después de la extracción del corazón, en cada rata, obtuvimos el tejido adiposo peri pancreático, epididimal y retroperitoneal; procedimos a pesarlo y, sumando sus valores, obtuvimos el peso de la grasa visceral. En la **Figura 11** se incluyen los valores totales de grasa visceral para cada condición y, además, se incluye una gráfica con los datos obtenidos para cada tejido en las tres condiciones. Existe un aumento significativo de la grasa visceral total en las ratas ZDF ( $28.67 \pm 1.9$  g) al compararla con los grupos Lean ( $4.65 \pm 0.47$  g) y Long Evans ( $3.43 \pm 0.39$  g). No existe diferencia significativa en el valor total de la grasa visceral del grupo Lean con respecto al grupo Long Evans. Tanto la grasa epididimal como la peripancreática y la retroperitoneal, en las ratas ZDF, presentan un aumento significativo al compararla con los otros dos grupos.



**Figura 11 Tejido visceral de las ratas utilizadas en este proyecto** a) Grasa total visceral, en g, de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF. b) Peso, en g, del tejido adiposo epididimal, peripancreático y retroperitoneal de las tres condiciones (\*\*\*) $p < 0.001$ .

En el Apéndice VII, se muestran los valores numéricos para los datos de peso, longitud hocico-ano, perímetro abdominal y grasa visceral total y específica.

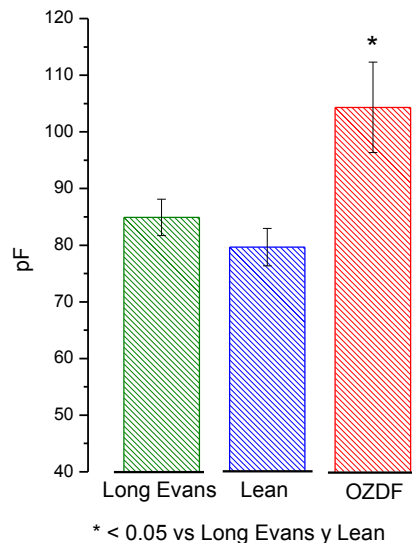
## • RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS, ENDOCARDIO DERECHO

### - Capacitancia celular

Calculamos la capacitancia celular ( $C_m$ ), expresada en pF, de los cardiomiocitos registrados en el endocardio derecho. Para ello utilizamos un protocolo de voltaje con un pulso hiperpolarizante de 10mV de amplitud a partir del voltaje de mantenimiento de -80mv, para obtener el trazo del capacitivo. La capacitancia la calculamos integrando el área debajo de la curva para determinar

la carga (Q) y dividirla entre la diferencia de voltaje utilizada en nuestro estímulo ( $\Delta V$ ) de acuerdo a la fórmula  $C_m = Q/\Delta V$ .

Tal como se muestra en la **Figura 12**, al realizar la estadística encontramos un aumento significativo de la capacitancia de los cardiomiocitos provenientes del endocardio derecho de las ratas ZDF ( $104.33 \pm 7.96$  pF) al compararlas con los cardiomiocitos de las ratas Long Evans ( $84.90 \pm 3.22$  pF) y Lean ( $79.6584.90 \pm 3.29$  pF); ver Apéndice VIII.



**Figura 12 Capacitancia de los cardiomiocitos del endocardio derecho.** Capacitancias de los cardiomiocitos de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF. \* $p < 0.05$ .

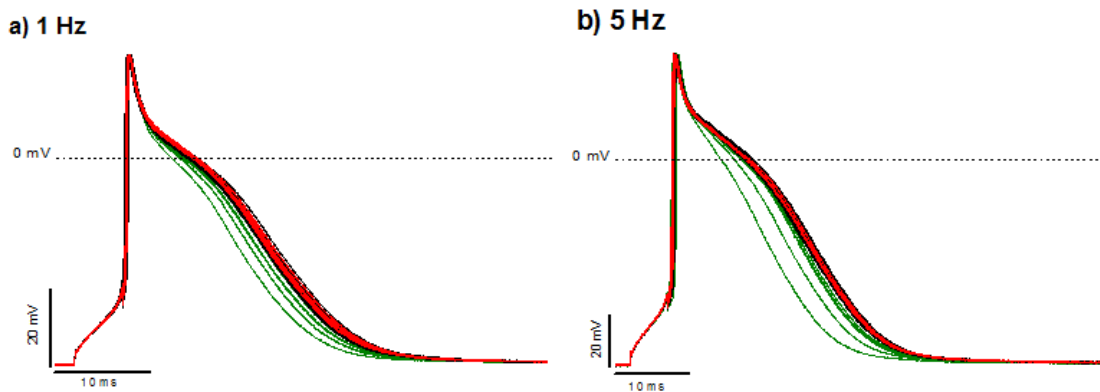
### ***-Potencial de acción del endocardio derecho***

#### ***Trazos obtenidos***

En cada célula se obtuvieron, para cada frecuencia, 30 potenciales de acción. Para dar mayor claridad a los resultados mostrados en este documento, hemos decidido hacer hincapié en los datos obtenidos a 1 y 5 Hz de estimulación pues el resto de los resultados son valores intermedios entre estas dos frecuencias. Las tablas de resultados y gráficas correspondientes a las frecuencias de 2, 3 y 4 Hz que no se incluyen en estas secciones se pueden consultar en la sección de apéndices.

Para 1 Hz de estimulación se obtuvieron registros de 25 células (n) de 6 ratas (N) de la condición control Long Evans, 16 células (n) de 6 ratas (N) ZDF obesas y 25 células (n) de 11 ratas (N) Lean. Para 5 Hz de estimulación se obtuvieron registros de 24 células (n) de 6 ratas (N) de la condición control Long

Evans, 13 células (n) de 6 ratas (N) ZDF obesas y 22 células (n) de 11 ratas (N) Lean. En la **Figura 13**, como ejemplo, se observan de manera sobrepuesta los 30 potenciales de acción obtenidos para una célula estimulada a 1 y 5 Hz.



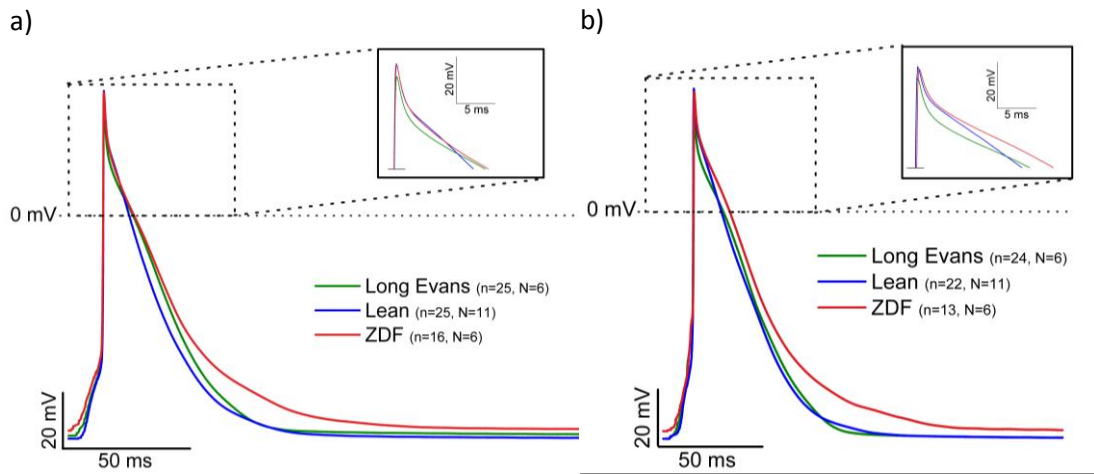
**Figura 13 Potenciales de acción de cardiomiocitos a 1 y 5 Hz de estimulación** Potenciales de acción, sobrepuestos y obtenidos mediante los protocolos establecidos, de una célula muscular del endocardio derecho para la condición control (Long Evans) a **a)** 1 Hz y **b)** 5Hz de estimulación. Note como en los primeros potenciales de acción evocados (color verde) la morfología es distinta a los últimos de cada protocolo (color rojo).

Se puede apreciar que la morfología del potencial de acción, para las dos frecuencias y en todos los casos, varía con el número de estímulos dados durante el protocolo. El cambio en la morfología del potencial de acción a lo largo del protocolo de estimulación tiene explicación en la acumulación de inactivación de los canales iónicos, sobre todo en los canales de la corriente  $I_K$ , que tienen participación importante en la fases 2 y 3, tal como se aprecia en la imagen.

Debido a esto para el análisis del potencial de acción se utilizaron sólo los últimos seis potenciales evocados en cada protocolo, los cuales consideramos como potenciales de acción en estado estacionario ya que la morfología permanece estable a diferencia de los primeros trazos de cada protocolo, **Figura 13**, trazos en color rojo.

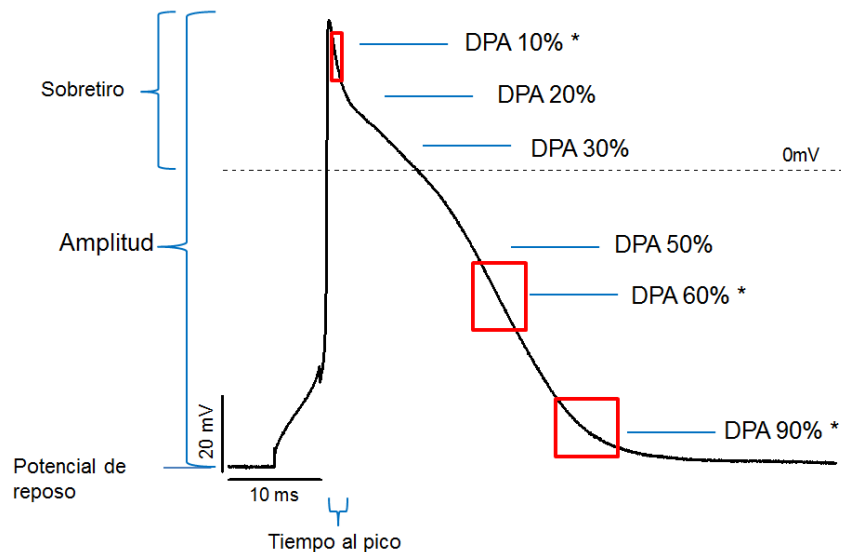
### ***Análisis del Potencial de acción en estado estacionario***

Inicialmente para un análisis cualitativo, en la **Figura 14** se aprecia la morfología del potencial de acción en estado estacionario de las tres condiciones. Para la frecuencia de 1 Hz (**Figura 14 a**) se observa una diferencia entre la morfología del potencial de acción registrado en los miocitos de las ratas ZDF y los de las ratas Long Evans y Lean, sobre todo en la fase tardía de repolarización. Los mismos cambios se pueden apreciar, de manera más marcada, en los trazos obtenidos para la frecuencia de 5 Hz de estimulación (**Figura 14 b**).



**Figura 14 Morfología del potencial de acción en estado estacionario del endocardio derecho.** Se muestran los potenciales de acción promedio registrados en cada uno de los fenotipos; los potenciales fueron evocados con pulsos cuadrados a 1 Hz (a) o a 5 Hz (b) de estimulación para las condiciones Long Evans, Lean y ZDF.

Los parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario fueron los siguientes: potencial de membrana diastólico, amplitud, sobretiro y duración del potencial de acción medido al 10, 20, 30, 50, 60 y 90%; **Figura 15.**



**Figura 15 Parámetros analizados en los potenciales de acción.** Se muestran los parámetros analizados para todas las frecuencias en las tres condiciones. Se muestra un potencial de acción obtenido de un cardiomiocito de la condición control (LE) a 5 Hz de estimulación.

En las **Tablas 1 y 2**, incluidas a continuación, se encuentran los resultados obtenidos en el análisis de los datos del potencial de acción en estado estacionario para 1 Hz y 5 Hz de estimulación. Se incluyen las medias para las tres condiciones junto con sus errores estándar y el valor de  $p$  determinado mediante la prueba de Tukey para cada caso.

Frecuencia: 1Hz	Long Evans (A) n=25, N=6			Lean (B) n=25, N=11			ZDF (C) n=16, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.45 ± 0.74		*	-80.53 ± 0.62		***	-77.80 ± 0.81		***
Amplitud al pico (mV)	118.21 ± 1.77		***	125.77 ± 1.43		*	121.85 ± 3.52		*
Sobretiro (mV)	38.76 ± 1.63		***	45.24 ± 1.09			44.06 ± 3.06		***
Tiempo al pico (ms)	2.62 ± 0.31		***	1.76 ± 0.24			1.85 ± 0.30		***
DPA 10% (ms)	2.49 ± 0.68		***	1.07 ± 0.10		***	2.27 ± 0.71		
DPA 20% (ms)	7.20 ± 1.70		**	5.07 ± 0.71		*	7.16 ± 1.73		
DPA 30% (ms)	14.09 ± 2.09		*	11.44 ± 1.40			13.30 ± 2.51		
DPA 50% (ms)	23.78 ± 2.60		*	20.02 ± 2.15			23.59 ± 3.69		
DPA 60% (ms)	28.03 ± 2.75		*	23.83 ± 2.50		**	29.33 ± 4.34		
DPA 90% (ms)	43.04 ± 2.90		*	37.56 ± 3.38		***	48.77 ± 6.04		*

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

**Tabla 1 Parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario del endocardio derecho a 1Hz.** Se muestran las medias de parámetros analizados para la frecuencia de 1 Hz en las tres condiciones junto con sus errores estándar el valor de  $p$  de acuerdo a la prueba de Tukey. PMD: Potencial de membrana diastólico; DPA: Duración del potencial de acción.

Frecuencia: 5Hz	Long Evans (A) n=24, N=6			Lean (B) n=21, N=11			ZDF (C) n=13, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.56 ± 0.80			-79.61 ± 0.66		***	-76.98 ± 1.04		***
Amplitud al pico (mV)	117.01 ± 2.37		***	124.45 ± 1.64		*	120.37 ± 2.84		
Sobretiro (mV)	37.45 ± 2.08		***	44.85 ± 1.39			43.40 ± 1.98		***
Tiempo al pico (ms)	2.78 ± 0.46		***	1.55 ± 0.31			2.21 ± 0.78		
DPA 10% (ms)	3.99 ± 1.10		***	2.04 ± 0.32		**	3.91 ± 1.32		
DPA 20% (ms)	10.38 ± 2.04		**	7.57 ± 0.93		*	10.25 ± 2.21		
DPA 30% (ms)	18.08 ± 2.43			15.30 ± 1.45			18.16 ± 2.88		
DPA 50% (ms)	30.40 ± 2.85		*	25.82 ± 2.31		**	31.70 ± 4.19		
DPA 60% (ms)	35.88 ± 3.01		*	30.58 ± 2.79		**	38.53 ± 4.97		
DPA 90% (ms)	52.26 ± 3.35		*	45.60 ± 3.92		***	57.93 ± 6.54		

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

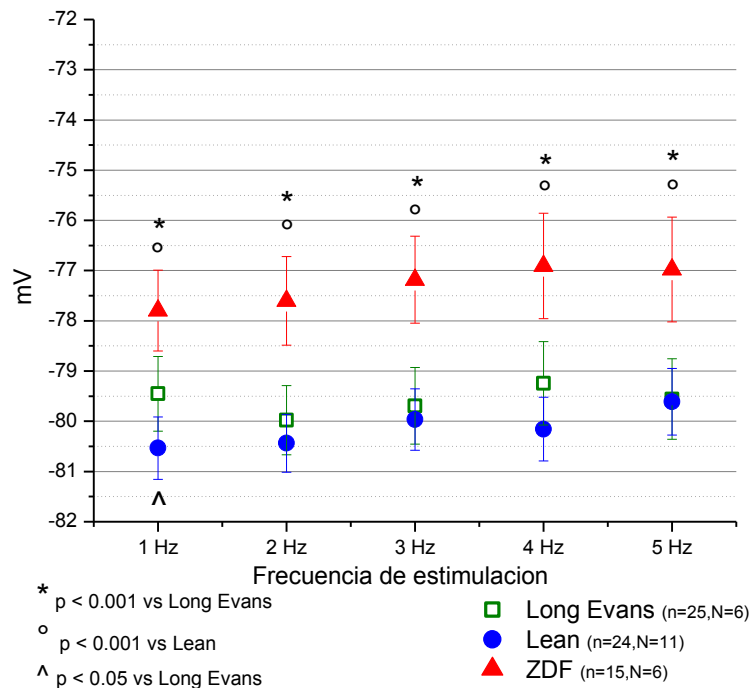
**Tabla 2 Parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario de cardiomiocitos del endocardio derecho a 5 Hz.** Se muestran las medias de parámetros analizados para la frecuencia de 5 Hz en las tres condiciones junto con sus errores estándar y el valor de  $p$  de acuerdo a la prueba de Tukey. PMD: Potencial de membrana diastólico; DPA: Duración del potencial de acción.

### ***Potencial de membrana diastólico en estado estacionario***

Analizamos el potencial de membrana en estado estacionario para cada una de las cinco frecuencias de estimulación. Los datos obtenidos se muestran en la **Figura 16**.

Se observa una diferencia significativa para este parámetro en todas las células de la condición ZDF con respecto a las otras dos condiciones, control y Lean (**Tablas 1 y 2**). Las diferencias corresponden a una despolarización en el potencial de membrana diastólico de la condición ZDF del 2.08%, 2.97%, 3.15%, 2.95% y 3.24% a 1, 2, 3, 4 y 5 Hz respectivamente con respecto al grupo control y del 3.40%, 3.52%, 3.48%, 4.05% y 3.31% con respecto a la condición Lean.

Sólo existió diferencia significativa entre las condiciones control (Long Evans) y Lean para el caso de 1 Hz de frecuencia, que corresponde a una hiperpolarización del 1.36% con respecto al grupo control.

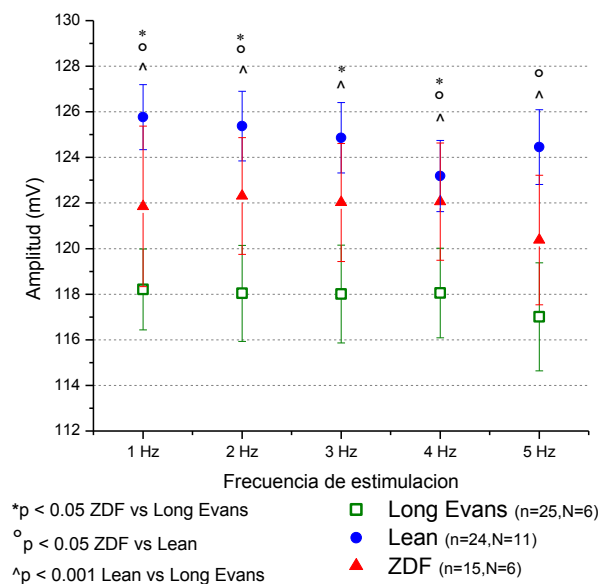


**Figura 16 Potencial de membrana diastólico en estado estacionario del endocardio derecho** Se muestran los resultados para las condiciones Long Evans, ZDF y Lean para las frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Amplitud del potencial de acción en estado estacionario***

Se determinó el valor de la amplitud del potencial de acción para las tres condiciones en cada frecuencia de estimulación. De acuerdo al análisis estadístico existe un aumento significativo del valor de este parámetro en las células de la condición ZDF con respecto a la condición control para las frecuencias de 1 a 4 Hz de estimulación (**Tablas 1 y 2**). Los valores corresponden a un aumento de la amplitud del potencial de acción de la condición ZDF del 3.08%, 3.62%, 3.41% y 3.40 % para cada frecuencia respectivamente; **Figura 17**.

De igual modo, existe un aumento significativo en la amplitud del potencial de acción en la condición Lean con respecto a la condición Long Evans para todas las frecuencias; el incremento es igual a 6.40% a 1 Hz, 6.22% a 2 Hz, 5.81% a 3Hz, 4.35% a 4 Hz y 6.36% a 5Hz. Además, existe una disminución significativa de este parámetro de la condición ZDF con respecto a la Lean para las frecuencias de 1, 2, 4 y 5 Hz, que corresponden a un 3.11%, 2.45%, 0.91% y 3.28% respectivamente; **Figura 17**.

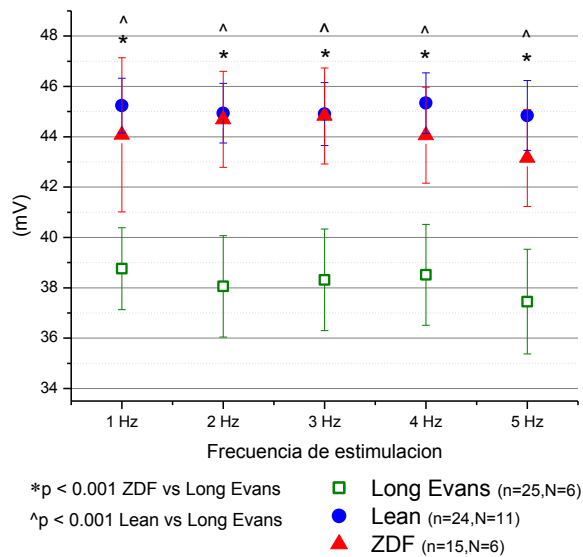


**Figura 17 Amplitud del potencial de acción en estado estacionario de los miocitos del endocardio derecho.** Amplitud del potencial de acción en estado estacionario para las condiciones Long Evans, ZDF y Lean para frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Sobretiro del potencial de acción en estado estacionario***

Por otro lado, se analizó el sobretiro del potencial de acción en estado estacionario de las tres condiciones y para cada frecuencia de estimulación. En los datos obtenidos observamos un aumento significativo (**Tablas 1 y 2**) en el

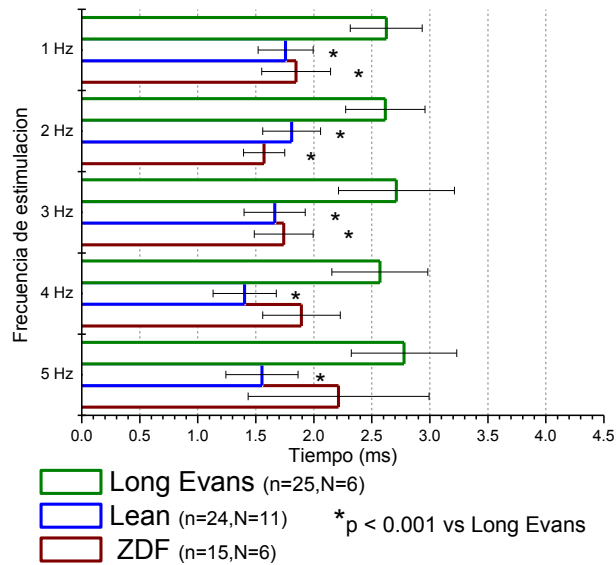
sobretiro del potencial de acción de las células de la condición ZDF y Lean con respecto a la condición control para todas las frecuencias. En este caso no existe una diferencia significativa entre las condiciones ZDF y Lean en ninguna frecuencia; **Figura 18**. Para el caso de la condición ZDF corresponde un aumento del 13.68% a 1Hz, de 17.50% a 2 Hz, de 17% a 3 Hz, de 14.80% a 4 Hz y de 15.90% a 5 Hz con respecto al grupo control. Para el caso del aumento del sobretiro de la condición Lean con respecto al grupo control, corresponde a un 16.72%, 18.1%, 17.20%, 17.70% y 19.70% para las frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz respectivamente.



**Figura 18 Sobretiro del potencial de acción de los miocitos del endocardio derecho.** Sobretiro del potencial de acción en estado estacionario para las condiciones Lons Evans, ZDF y Lean para frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Tiempo al pico en Estado Estacionario***

Se calculó el tiempo al pico de los potenciales de acción en estado estacionario y al realizar el análisis estadístico encontramos una disminución significativa en la condición ZDF con respecto a la condición Long Evans del 29.61%, 40%, 35.8% para las frecuencias de 1, 2, y 3 Hz. Además, encontramos una disminución significativa del tiempo al pico en la condición Lean con respecto a la condición Long Evans para todas las frecuencias, equivalentes al 33.10% para 1 Hz, 30.90% para 2 Hz, 38.70 para 3 Hz, 45.40% para 4 Hz y 44.1% para 5 Hz; **Figura 19**.



**Figura 19 Tiempo al pico del potencial de los miocitos del endocardio derecho.** Tiempo al pico del potencial de acción en estado estacionario para las condiciones Long Evans, Lean y ZDF para frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Duración del Potencial de Acción en Estado Estacionario***

Para todas las frecuencias se determinó la duración del potencial de acción (DPA) al 10, 20, 30, 50, 60 y 90% de la repolarización y se realizó el análisis estadístico para comparar las diferentes condiciones.

Se encontró que, a 1 Hz de estimulación, existe un aumento significativo en la DPA 90% en las ratas ZDF con respecto grupo control. Esta diferencia corresponde a un aumento del 13.30%. Al comparar, en esta frecuencia, la DPA en las ratas Lean con las ratas Long Evans, encontramos una disminución significativa al 10, 20, 30, 50, 60 y 90% de la DPA, que corresponden a una disminución del 57.07%, 29.65%, 18.79%, 15.81%, 14.99% y 12.72% respectivamente.

Además, nuestros datos arrojan que existen diferencias significativas en la DPA al comparar la condición ZDF con la condición Lean. La DPA al 10, 20, 60 y 90% en las ratas ZDF tienen un aumento del 112.39%, 41.43%, 23.09% y 29.82% respectivamente con respecto a las ratas Lean; **Figura 20 a).**

Adicionalmente, cuando los miocitos son estimulados a 5Hz, una frecuencia cercana a la frecuencia cardiaca de la rata, se encontró un aumento significativo, en la condición ZDF, de la DPA al 10%, 20%, 50%, 60% y 90% que



### **Tablas de resumen de los resultados del potencial de acción del endocardio derecho**

Se muestran, a continuación, las tablas de resumen que incluyen las diferencias significativas halladas en los diferentes parámetros del potencial de acción entre los grupos Long Evans, Lean y ZDF.

<b>Potencial de acción. Endocardio Derecho</b>				
	<b>Long Evans vs</b>			
	<b>1 HZ</b>		<b>5 Hz</b>	
<b>Parámetro/Condición</b>	<b>Lean</b>	<b>OZDF</b>	<b>Lean</b>	<b>OZDF</b>
<b>PMD</b>	↑	↓	---	↓
<b>Amplitud al pico</b>	↑	↑	↑	---
<b>Sobretiro</b>	↑	↑	↑	↑
<b>Tiempo al pico</b>	↓	↓	↓	---
<b>DPA 10%</b>	↓	---	↓	---
<b>DPA 20%</b>	↓	---	↓	---
<b>DPA 30%</b>	↓	---	---	---
<b>DPA 50%</b>	↓	---	↓	---
<b>DPA 60%</b>	↓	---	↓	---
<b>DPA 90%</b>	↓	↑	↓	---

**Tabla 3** Se muestran las diferencias significativas de los parámetros del potencial de acción analizados al comparar las condiciones Lean y ZDF con respecto a la condición Long Evans. Se indica un aumento (↑) o una disminución (↓) según corresponda ( $p < 0.05$ ).

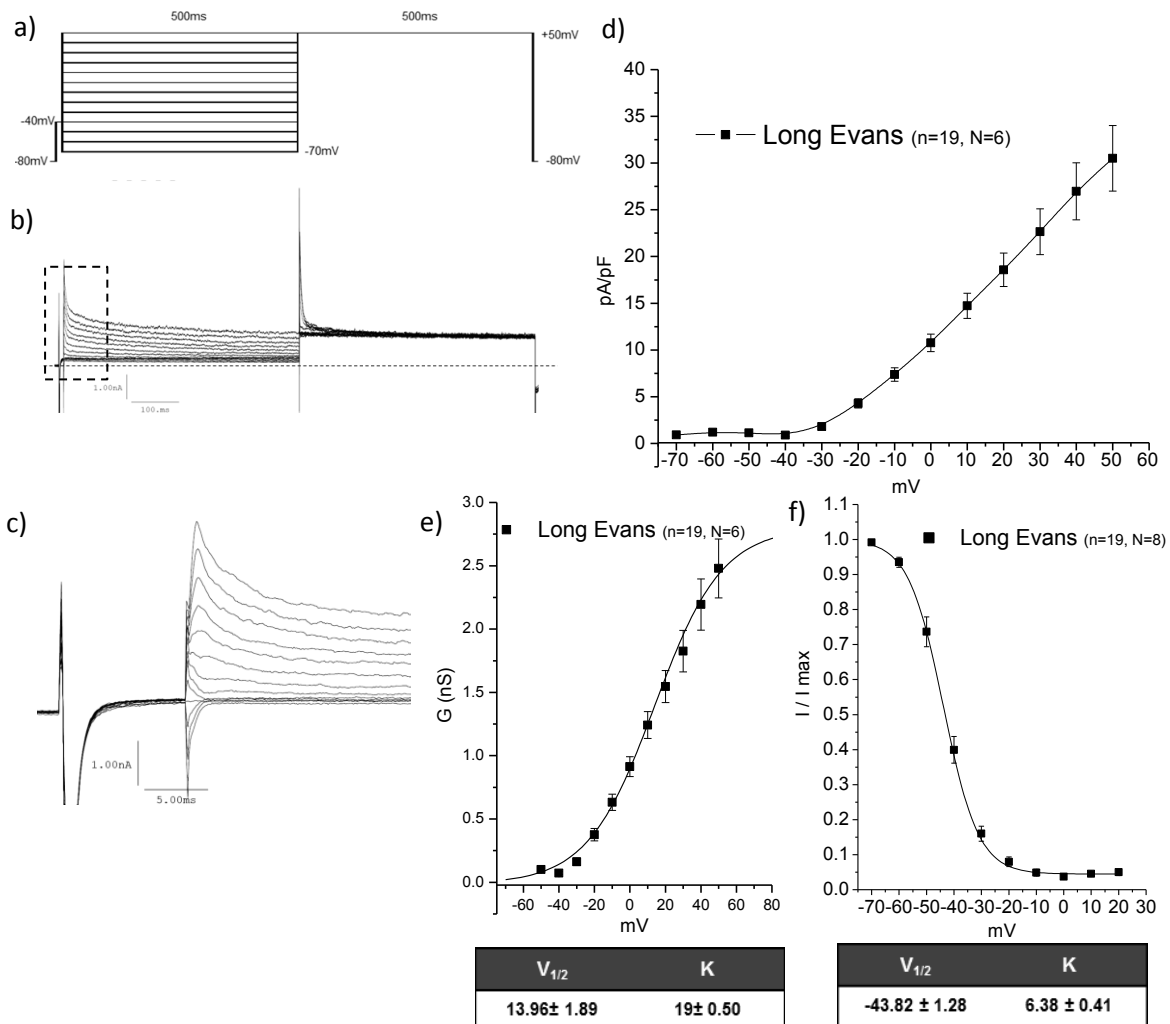
<b>Potencial de acción. Endocardio Derecho</b>				
	<b>Lean vs</b>			
	<b>1 HZ</b>		<b>5 Hz</b>	
<b>Parámetro/Condición</b>	<b>Long Evans</b>	<b>OZDF</b>	<b>Long Evans</b>	<b>OZDF</b>
<b>PMD</b>	↓	↓	---	↓
<b>Amplitud al pico</b>	↓	↓	↓	↓
<b>Sobretiro</b>	↓	---	↓	---
<b>Tiempo al pico</b>	↑	---	↑	---
<b>DPA 10%</b>	↑	↑	↑	↑
<b>DPA 20%</b>	↑	↑	↑	↑
<b>DPA 30%</b>	↑	---	---	---
<b>DPA 50%</b>	↑	---	↑	↑
<b>DPA 60%</b>	↑	↑	↑	↑
<b>DPA 90%</b>	↑	↑	↑	↑

**Tabla 4** Se muestran las diferencias significativas de los parámetros del potencial de acción analizados al comparar las condiciones Long Evans y ZDF con respecto a la condición Lean. Se indica un aumento (↑) o una disminución (↓) según corresponda ( $p < 0.05$ ).

**-Corrientes repolarizantes del endocardio derecho**

**Corriente  $I_{to}$**

Una vez obtenidos los trazos de la corriente  $I_{to}$  con el protocolo antes establecido, para hacer la curva I/V sustrajimos la corriente sostenida, al final del pulso, de la corriente al pico evocada al inicio de cada pulso. La corriente resultante fue normalizada para cada célula según la capacitancia celular para obtener la densidad de corriente (pA/pF) y graficada con respecto al voltaje. La corriente obtenida en los cardiomiocitos de la condición Long Evans presentó las características de esta corriente, es decir, es de tipo transitoria, saliente e inicia a observarse claramente alrededor de los -30mV para posteriormente incrementar a potenciales más positivos de manera constante; **Figura 21 b, c y d.**



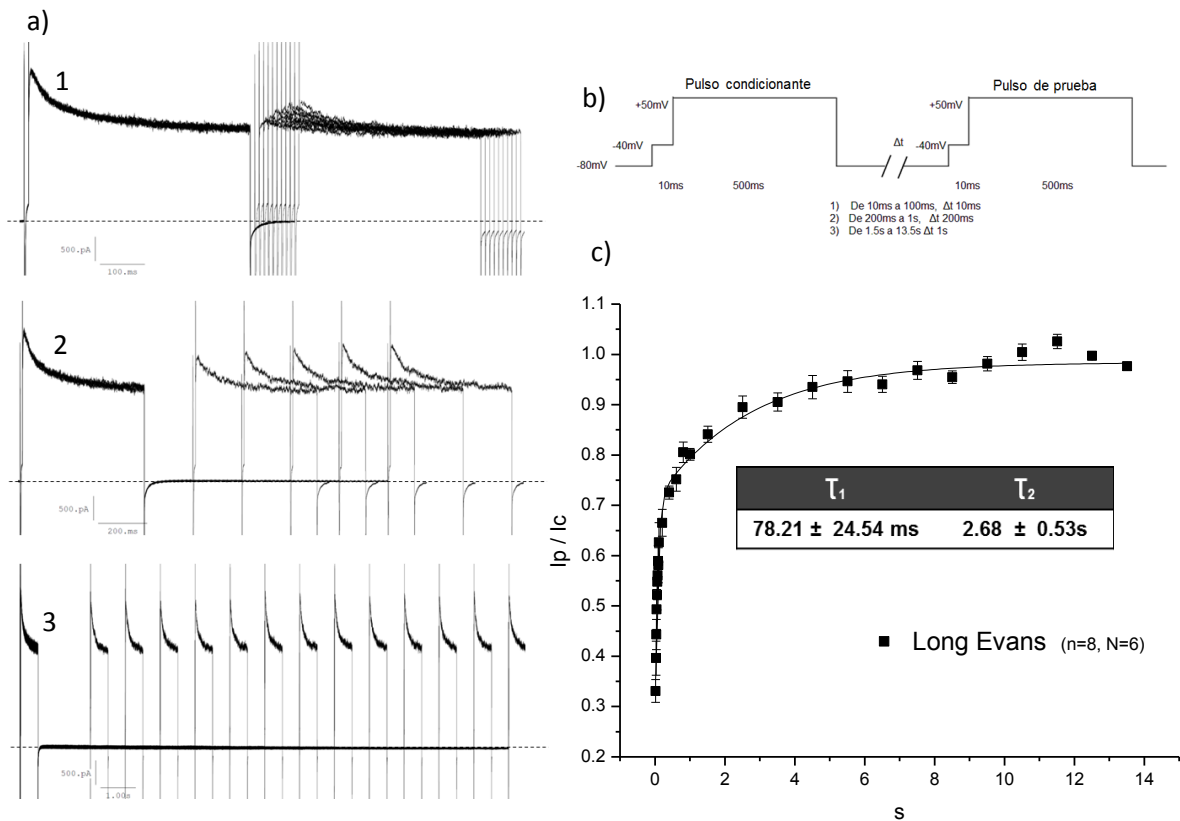
**Figura 21 Registro de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.** a) Protocolo de voltaje usado para evocar la corriente  $I_{to}$  b) Ejemplo de una corriente  $I_{to}$  registrada en los miocitos cardiacos de la rata Long Evans. c) Acercamiento del trazo para mostrar la corriente al pico. d) Curva de corriente contra voltaje (I/V) de la corriente  $I_{to}$ , Long Evans. e) Curva de activación en estado estacionario de la corriente  $I_{to}$ . f) Curva de inactivación en estado estacionario de la corriente  $I_{to}$ , grupo Long Evans; se incluyen valores del  $V_{1/2}$  y K de ambas curvas.

Para establecer más características de la corriente  $I_{to}$  en la condición Long Evans decidimos construir la curva de activación en estado estacionario graficando la conductancia de la corriente (nS) con respecto al voltaje; **Figura 21 e**). El gráfico se ajustó a la ecuación de Boltzman y se obtuvo el voltaje medio de activación ( $V_{1/2}$ )  $13.96 \pm 1.89$  mV, y el factor pendiente ( $K$ ) que indica la dependencia de voltaje de la activación  $19 \pm 0.50$ .

Además de lo anterior, construimos la curva de inactivación en estado estacionario. Utilizamos el protocolo mostrado en la **Figura 21 a)**, en el cual el primer pulso despolarizante lleva a los canales de la corriente  $I_{to}$  de un estado cerrado a uno activo y posteriormente a inactivo, y el segundo pulso, también llamado de prueba, que lleva a los canales que se encuentren disponibles para ser abiertos (canales no inactivados) a un estado activado. La corriente generada en el segundo pulso depende de la cantidad de estos últimos canales y se define como corriente de cola. Así, medimos la amplitud de la corriente de cola obtenida en el segundo pulso correspondiente a cada voltaje y la normalizamos con su valor máximo para después graficarla en función del voltaje aplicado. El gráfico resultante se ajustó a la ecuación de Boltzman y se determinó el voltaje medio de inactivación ( $V_{1/2}$ ) y el factor pendiente ( $K$ ) que, en este caso, indica la dependencia de voltaje de la inactivación, resultando  $-43.82 \pm 1.28$  mV y  $6.38 \pm 0.41$  respectivamente para la condición Long Evans; **Figura 21 f**).

También analizamos el curso temporal de la recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$ . El protocolo de voltaje usado se muestra en la **Figura 22 b)** junto con un ejemplo de los trazos obtenidos, **Figura 22 a)**. La corriente evocada por el pulso de prueba dependerá de los canales que estén disponibles para ser abiertos después del pulso condicionante, es decir, de los canales que se hayan recuperado de la inactivación, justo antes del pulso de prueba que los activará. La cantidad de canales que estén disponibles para ser abiertos por el pulso de prueba dependerá de su velocidad, o velocidades para el caso de la  $I_{to}$ , de recuperación de la inactivación. De esta manera y para determinar el tiempo necesario para permitir que todos los canales se hayan recuperado de la inactivación entre el pulso de prueba y el condicionante, y que la corriente tuviera la misma amplitud, calculamos el cociente corriente de prueba/corriente condicionante ( $I_p/I_c$ ). Para ello sustrajimos la corriente sostenida, al final del pulso condicionante, de la corriente al pico evocada al inicio de este mismo pulso ( $I_c$ ); realizamos lo esto mismo para cada pulso de prueba ( $I_p$ ). Graficamos el cociente  $I_p/I_c$  con respecto al tiempo entre cada pulso condicionante y de prueba y posteriormente aplicamos un ajuste a una curva de dos exponenciales. Los valores de  $\tau_1$  y  $\tau_2$ , que indican la velocidad de recuperación de la inactivación de

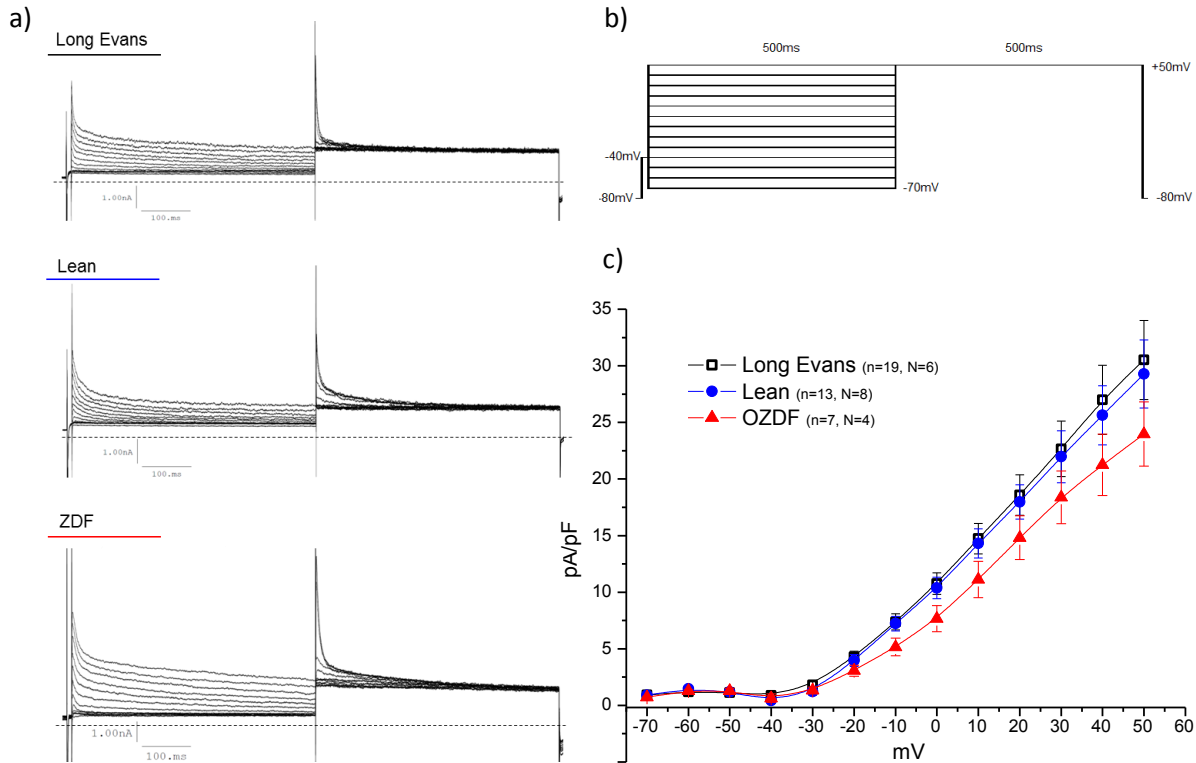
los canales, para las ratas Long Evans son de  $78.21 \pm 24.54$  ms y  $2.68 \pm 0.53$  s respectivamente; **Figura 22 c).**



**Figura 22 Recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.** a) Ejemplos de la corriente  $I_{to}$  registrada en los miocitos cardiacos de la rata Long Evans con el protocolo de voltaje que se muestra en b). c) Curva recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$ , Long Evans, se incluyen los datos obtenidos para la  $\tau_1$  y  $\tau_2$  para la recuperación de la inactivación de esta condición.

Con respecto a las condiciones Lean y ZDF, la corriente registrada también presentó las características de la corriente  $I_{to}$ . En la **Figura 23 a y c)** se muestran los trazos de las corrientes y la curva  $I/V$  ya normalizada por la capacitancia celular.

La prueba estadística aplicada indica que no existen diferencias significativas en la densidad de la corriente  $I_{to}$  entre las tres condiciones, a pesar de que lo observado en la gráfica  $I/V$  parece indicar una disminución en la corriente correspondiente a los cardiomiocitos de la condición ZDF con respecto a las otras dos. De esta forma podemos suponer que no hay cambios en la dependencia de voltaje de esta corriente en los cardiomiocitos de los grupos ZDF o Lean al compararlos con el grupo Long Evans.



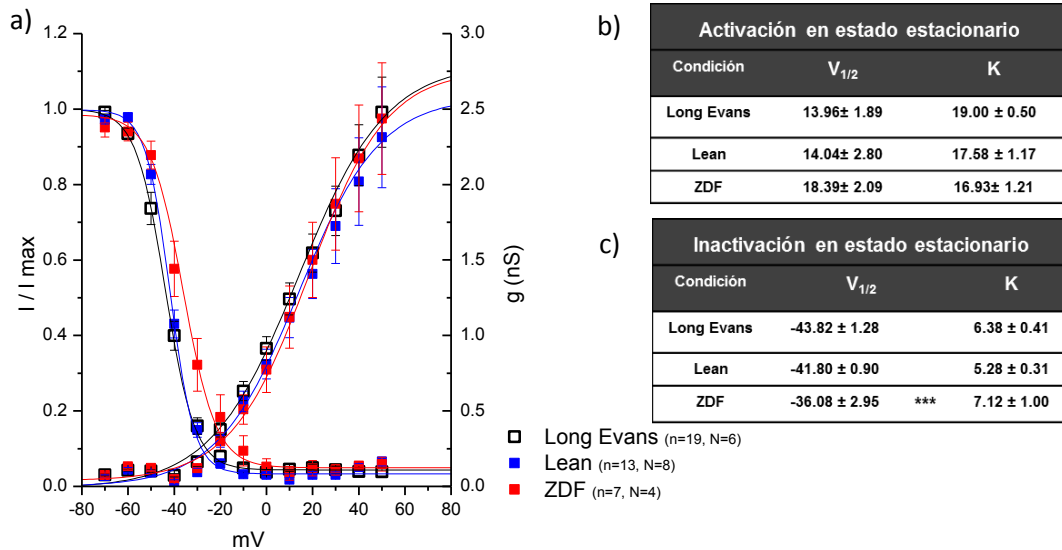
**Figura 23** Registro de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF.

a) Ejemplo de las corrientes  $I_{to}$  registrada en los miocitos cardiacos de las tres condiciones obtenidas con el protocolo de voltaje mostrado en b). C) Curvas de corriente contra voltaje (I/V) de las corrientes  $I_{to}$  de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF.

Construimos las curvas de activación y de inactivación en estado estacionario para las condiciones Lean y ZDF de la misma forma que se ha descrito previamente para la condición Long Evans; **Figura 24 a)**. Al ajustar la curva de activación en estado estacionario con la ecuación de Boltzman obtuvimos el voltaje medio de activación para las condiciones Lean y ZDF,  $14.04 \pm 2.80$  mV y  $18.39 \pm 2.09$  mV respectivamente y, además, el valor del factor pendiente  $K$   $17.58 \pm 1.17$  y  $16.93 \pm 1.21$ ; **Figura 24 b)**. Con el ajuste de la curva de inactivación en estado estacionario obtuvimos el valor del voltaje medio de inactivación y el factor pendiente  $K$ , resultando  $-41.80 \pm 0.90$  mV y  $5.28 \pm 0.31$  respectivamente para la condición Lean y  $-36.08 \pm 2.95$  mV y  $7.12 \pm 1$  para la condición ZDF; **Figura 24 c)**.

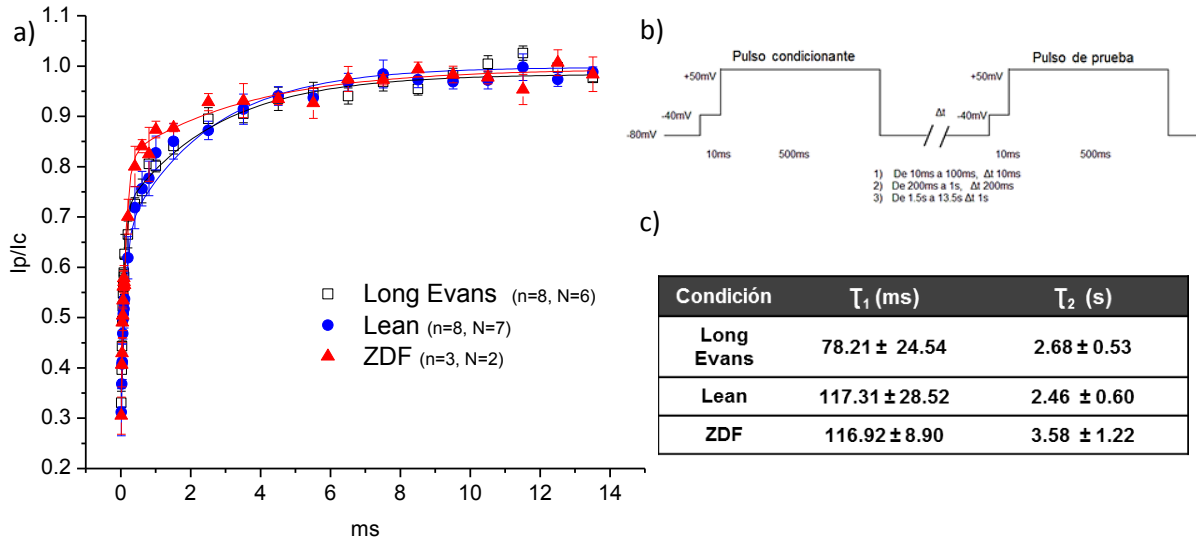
En la gráfica que incluye las curvas de inactivación de las tres condiciones puede apreciarse un desplazamiento de la curva de inactivación correspondiente al grupo ZDF hacia la derecha a voltajes más positivos; **Figura 24 a)**. La prueba estadística indica una diferencia significativa ( $p < 0.001$ ) al comparar los valores del  $V_{1/2}$  de inactivación de las condiciones ZDF ( $-36.08 \pm 2.95$  mV) y Long Evans ( $-43.82 \pm 1.28$  mV). No hubo diferencias en el factor pendiente  $K$  de inactivación al

hacer las comparaciones correspondientes entre los grupos. De acuerdo al análisis estadístico no existen diferencias significativas en el  $V_{1/2}$  de activación ni en el factor pendiente  $K$  de activación de la corriente  $I_{to}$  de las tres condiciones.



**Figura 24** Curvas de activación e inactivación de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF. a) Curvas de activación e inactivación en estado estacionario. b) Valores del  $V_{1/2}$  y pendiente para la activación en estado estacionario de la corriente  $I_{to}$ . c) Valores del  $V_{1/2}$  y pendiente para la inactivación en estado estacionario de las corrientes  $I_{to}$ . \*\*\* $p < 0.001$  vs Long Evans

Además, tal como se describió para el grupo control, obtuvimos la curva de recuperación de la inactivación para los grupos Lean y ZDF; **Figura 25 a)**. No encontramos diferencias significativas entre los valores de las  $\tau_1$  y  $\tau_2$  al comparar las tres condiciones; **Figura 25 a y c)**.

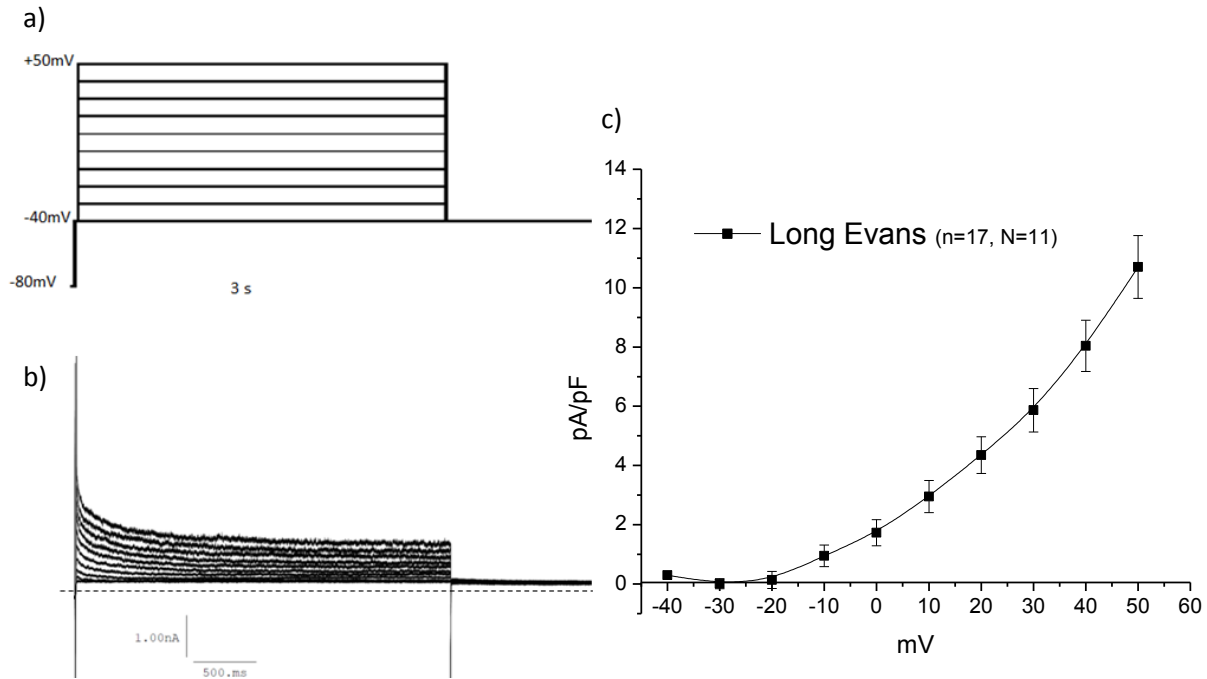


**Figura 25** Recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF a) Curva recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$  para las tres condiciones obtenida con el protocolo mostrado en b); c) Se incluyen los datos obtenidos para la  $\tau_1$  y  $\tau_2$  para la recuperación de la inactivación.

## Corriente $I_K$

Para evocar esta corriente usamos pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta más 50mV de 3 s de duración. De la corriente generada medimos solo el componente sostenido durante 20 ms antes del final del pulso; **Figura 26 a y b)**. Los valores fueron normalizados por la capacitancia celular para obtener la densidad de corriente (pA/pF) y graficados con respecto al voltaje; **Figura 26 c)**.

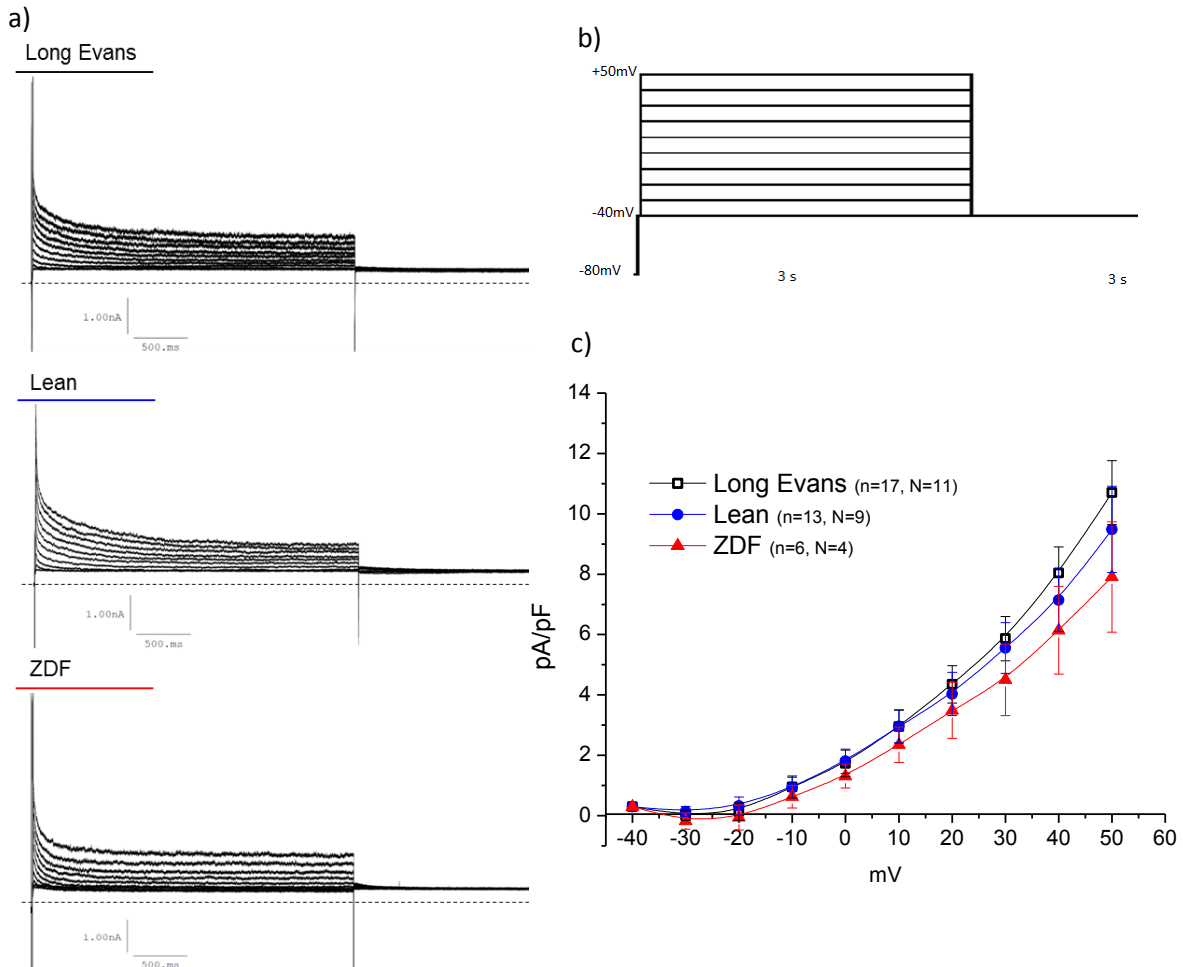
En la curva I/V se puede apreciar la relación entre la corriente  $I_K$  (pA/pF) y el potencial de membrana en los cardiomiocitos registrados en la condición Long Evans. Como se ha descrito para esta corriente (Lee, Tang et al. 2013), la  $I_K$  es una corriente saliente que activa a un potencial de membrana de -20mV y cuya amplitud de corriente incrementa a potenciales más positivos del potencial de membrana hasta +50mV; **Figura 26 c)**.



**Figura 26 Registro de la corriente  $I_K$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.** a) Protocolo de voltaje usado para evocar la corriente  $I_K$  b) Ejemplo de una corriente  $I_K$  registrada en los miocitos cardiacos del endocardio derecho de la rata Long Evans. c) Curva de corriente contra voltaje (I/V) de la corriente  $I_K$ , Long Evans.

La corriente  $I_K$  registrada en las cardiomiocitos de los grupo Lean y ZDF presentó las mismas características que en la rata control. Construimos la curva I/V tal como hemos escrito anteriormente; **Figura 27 a y c)**. Como se muestra en **Figura 27**, la amplitud de la corriente en todos los potenciales de membrana registrados en los tres grupos no mostró diferencias significativas entre las tres

condiciones. Es decir, no hay cambios en la dependencia de voltaje de esta corriente en los cardiomiocitos de los grupos ZDF o Lean al compararlos con el grupo Long Evans.

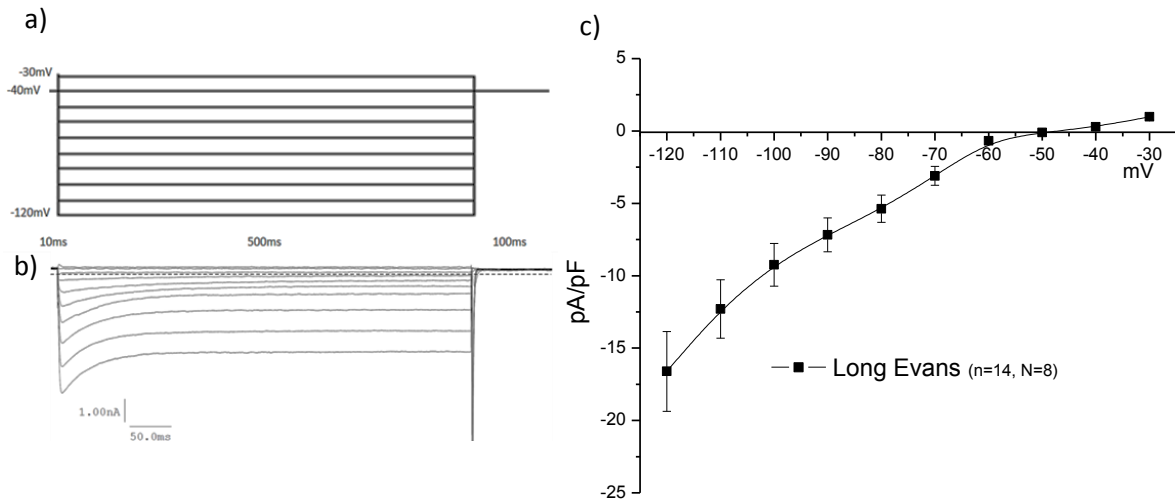


**Figura 27** Registro de la corriente  $I_K$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF. a) Ejemplos de las corriente  $I_K$  registrada en los miocitos cardiacos del endocardio derecho de la rata Long Evans, Lean y ZDF con el protocolo de voltaje mostrado en b). c) Curva de corriente contra voltaje (I/V) de la corriente  $I_K$  de las tres condiciones.

### Corriente $I_{K1}$

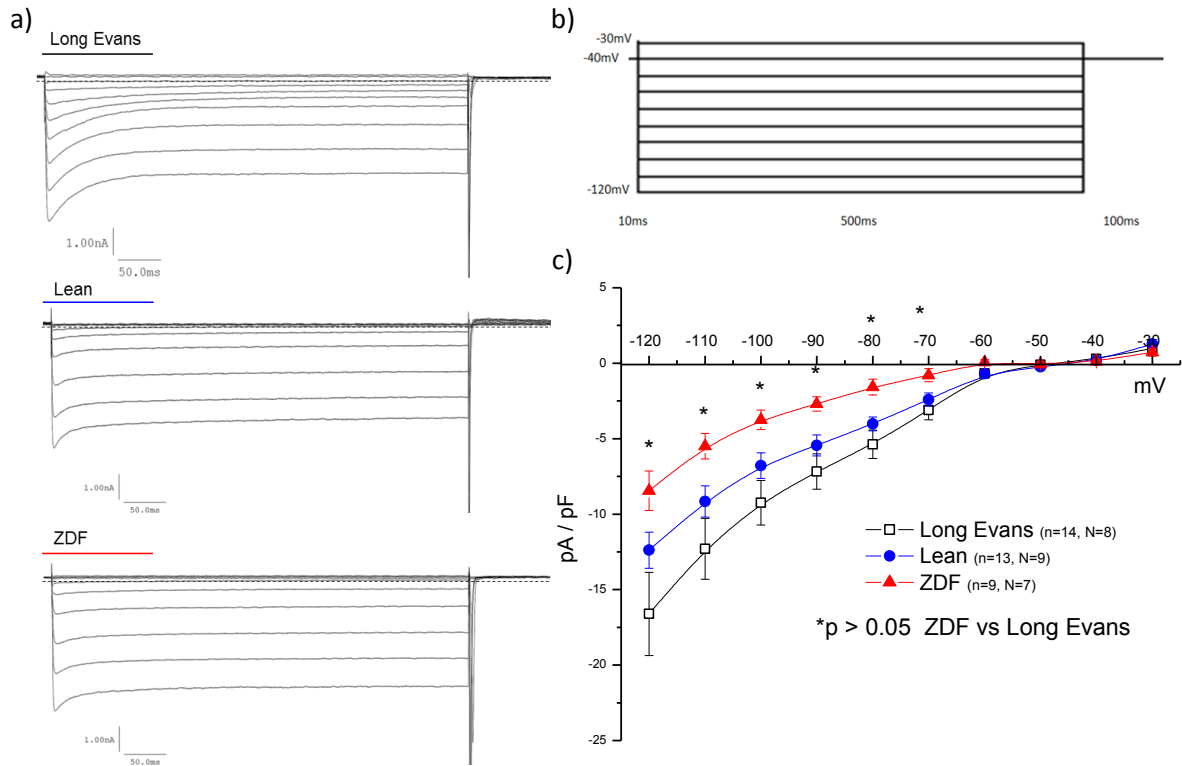
Para construir la curva I/V de la corriente  $I_{K1}$  en los miocitos del endocardio derecho de la condición Long Evans, utilizamos el protocolo mostrado en la **Figura 28 a)**. De la corriente evocada, sustrajimos la corriente sostenida, al final del pulso, de la corriente al pico al inicio de cada pulso. La corriente resultante fue normalizada para cada célula, según la capacitancia celular, para obtener la densidad de corriente (pA/pF) y graficada con respecto al voltaje; **Figura 28 c)**. La corriente obtenida en los cardiomiocitos de la condición Long Evans presentó las

características de la corriente  $I_{K1}$ , es decir entrante, incrementa a potenciales negativos al potencial de equilibrio del potasio y disminuye con la despolarización de la membrana; a potenciales positivos del potencial de equilibrio esta corriente se vuelve saliente; **Figura 28 b y c)** (Anumonwo and Lopatin 2010).



**Figura 28 Registro de la corriente  $I_{K1}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.** a) Protocolo de voltaje usado para evocar la corriente  $I_{K1}$ . b) Ejemplo de una corriente  $I_{K1}$  registrada en endocardio derecho de la rata Long Evans. c) Curva de corriente contra voltaje (I/V) de la corriente  $I_{K1}$ , Long Evans.

De la misma forma que en las ratas Long Evans, registramos la corriente  $I_{K1}$  en los cardiomiocitos provenientes del endocardio derecho de las ratas Lean y ZDF y después de obtener la densidad de corriente construimos la curva I/V; **Figura 29 a y c)**. Al realizar el análisis estadístico de los datos para la curva I/V, encontramos una disminución significativa de la corriente  $I_{K1}$  de los cardiomiocitos de las ratas ZDF, al compararlos con los datos obtenidos para las ratas Long Evans, desde los -120 mV a los -70 mV ( $p < 0.05$ ). No encontramos diferencias significativas al comparar la corriente  $I_{K1}$  de las ratas ZDF con las ratas Lean o entre estas últimas y las ratas Long Evans.



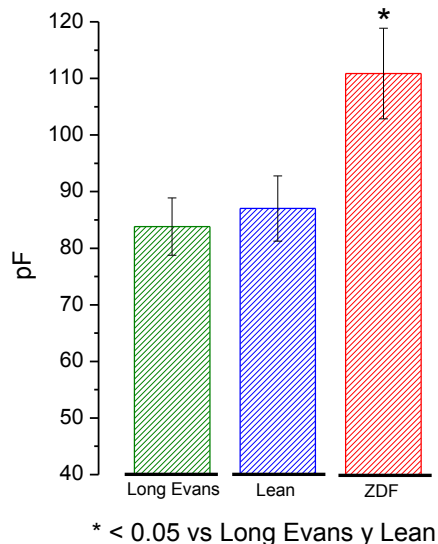
**Figura 29 Registro de la corriente  $I_{K1}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF.** a) Ejemplo de la corriente  $I_{K1}$  registrada en endocardio derecho de la rata Long Evans, Lean y ZDF con el protocolo mostrado en b). c) Curva de corriente contra voltaje (I/V) de la corriente  $I_{K1}$  de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF.

- **RESULTADOS ELECTROFISIOLÓGICOS,  
ENDOCARDIO IZQUIERDO**

Si bien en los objetivos de esta tesis se abarca solo el estudio del endocardio derecho, realicé una serie experimental en el endocardio izquierdo cuyos resultados presento a continuación.

**-Capacitancia celular**

La capacitancia de la célula fue calculada al integrar la corriente capacitiva evocada por un pulso hiperpolarizante y luego dividirla por la amplitud del pulso (Ver página 42). Como se muestra en la **Figura 30**, al comparar los valores obtenidos de los cardiomiocitos provenientes el endocardio izquierdo, los cardiomiocitos de la ratas ZDF presentaron una capacitancia mayor que los de las ratas Long Evans y Lean;  $110.86 \pm 8.02$  pF vs  $87.01 \pm 5.78$  pF y  $83.81 \pm 5.07$  pF, respectivamente; ver apéndice VIII.



**Figura 30 Capacitancia de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo** a) Capacitancias de los cardiomiocitos de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF. b) Se incluyen los tamaños de muestras, medias obtenidas, errores estándar y significancia del valor de p de acuerdo a la prueba de Tukey (\* $p < 0.05$ ).

**-Potencial de acción del endocardio izquierdo**

***Trazos obtenidos***

En cada célula se obtuvieron, para cada frecuencia, 30 potenciales de acción. Para dar mayor claridad a los resultados mostrados en este documento, hemos decidido hacer hincapié en los datos obtenidos a 1 y 5 Hz de estimulación, al igual que en los datos reportados para el endocardio izquierdo. Las tablas de

resultados y gráficas correspondientes a las frecuencias de 2, 3 y 4 Hz que no se incluyen en estas secciones se pueden consultar en la sección de apéndices.

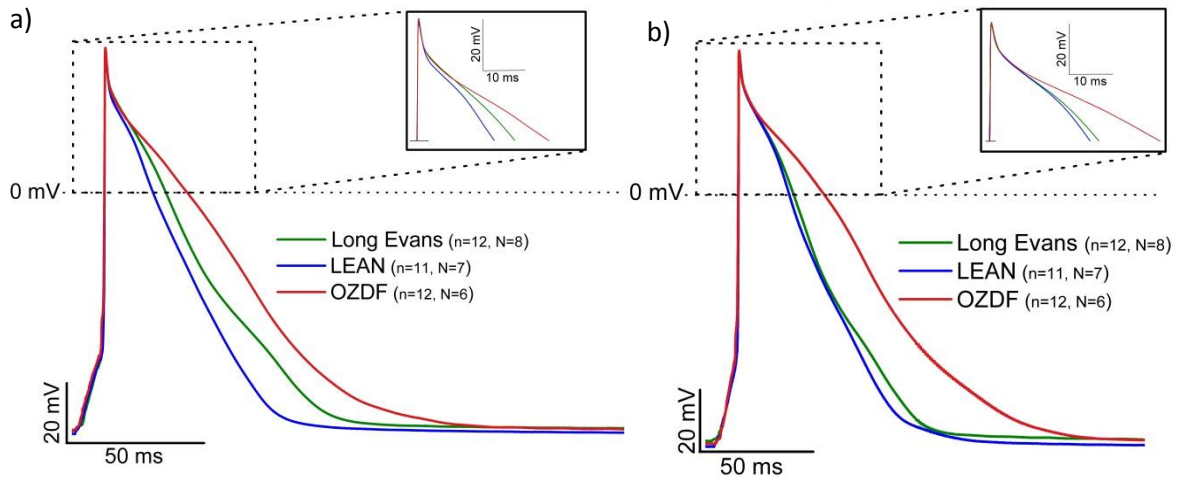
Para todas las frecuencias de estimulación (1 a 5 Hz) se obtuvieron registros de 12 células (n) de 8 ratas (N) de la condición control Long Evans, 12 células (n) de 6 ratas (N) ZDF obesas y 11 células (n) de 7 ratas (N) Lean.

Para el análisis del potencial de acción se utilizaron sólo los últimos seis potenciales evocados en cada protocolo, los cuales consideramos como potenciales de acción en estado estacionario ya que la morfología permanece estable a diferencia de los primeros trazos de cada protocolo.

### ***Análisis del Potencial de acción en estado estacionario***

En la **Figura 31** se aprecia la morfología del potencial de acción en estado estacionario registrado en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo de las tres condiciones. Para la frecuencia de 1 Hz; **Figura 31 a)** se observa una diferencia entre la morfología del potencial de acción registrado en los miocitos de las ratas ZDF y los de las ratas Long Evans y Lean, sobre todo durante la fase de repolarización. Esta diferencia se mantiene en los registros obtenidos a 5 Hz; de hecho es mayor entre los grupos ZDF y Long Evans, ya que en los miocitos de este último, la duración del potencial de acción disminuye hasta valores muy similares de los del grupo Lean; **Figura 31 b)**.

Para asegurarnos que estas diferencias fueran significativas, realizamos el análisis cuantitativo de diversos parámetros. Los parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario fueron los siguientes: potencial de membrana diastólico, amplitud, sobretiro y duración del potencial de acción medido al 10, 20, 30, 50, 60 y 90%; **Figura 15)**. Los resultados obtenidos al medir estos parámetros se muestran en las tablas 5 y 6; note como la DPA fue significativamente mayor en los miocitos de la rata ZDF que en las ratas Long Evans y Lean tanto a 1 como a 5 Hz de estimulación.



**Figura 31 Morfología del potencial de acción en estado estacionario del endocardio izquierdo.** Se muestran los potenciales de acción promedio registrados en cada uno de los fenotipos; los potenciales fueron evocados con pulsos cuadrados a 1 Hz (a) o a 5 Hz (b) de estimulación para las condiciones control Long Evans, Lean y ZDF.

ENDOCARDIO IZQUIERDO Frecuencia: 1Hz	Long Evans (A) n=12, N=8			Lean (B) n=11, N=7			ZDF (C) n=12, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-80.00 ± 0.59			-80.84 ± 0.78			-80.51 ± 0.60		
Amplitud al pico (mV)	126.26 ± 1.58		***	128.92 ± 1.25			129.15 ± 0.68		*
Sobretiro (mV)	46.27 ± 1.75		*	48.07 ± 1.22			48.64 ± 0.74		**
Tiempo al pico (ms)	2.74 ± 0.49		**	1.89 ± 0.29		***	3.03 ± 0.47		
DPA 10% (ms)	4.25 ± 1.19		**	2.09 ± 0.41		***	4.72 ± 1.41		
DPA 20% (ms)	14.08 ± 2.93		*	9.56 ± 1.82		***	18.07 ± 3.57		*
DPA 30% (ms)	22.66 ± 3.85			17.99 ± 2.76		***	29.95 ± 4.98		**
DPA 50% (ms)	33.84 ± 4.80			27.78 ± 3.77		***	46.84 ± 5.78		***
DPA 60% (ms)	39.08 ± 5.15		*	31.65 ± 4.20		***	54.57 ± 6.04		***
DPA 90% (ms)	55.87 ± 5.78		***	43.66 ± 4.88		***	80.51 ± 6.32		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

**Tabla 5 Parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo a 1 Hz.** Se muestran las medias de parámetros analizados para la frecuencia de 1 Hz en las tres condiciones junto con sus errores estándar y el valor de p de acuerdo a la prueba de Tukey. PMD: Potencial de membrana diastólico; DPA: Duración del potencial de acción.

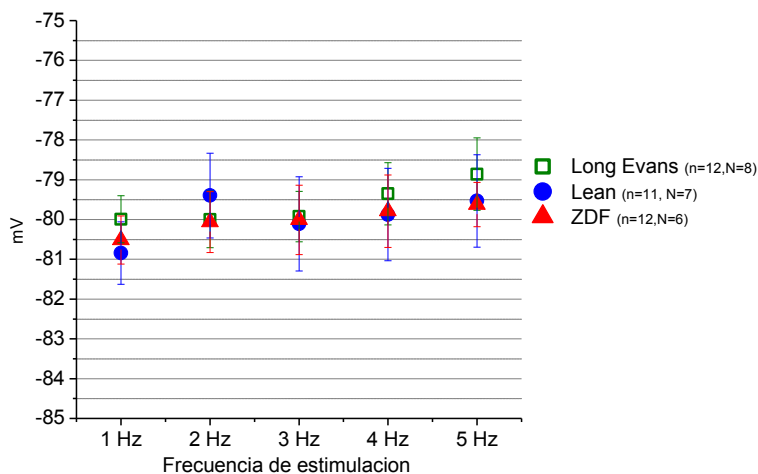
ENDOCARDIO IZQUIERDO Frecuencia: 5Hz	Long Evans (A) n=12, N=8			Lean (B) n=11, N=7			ZDF (C) n=12, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-78.86 ± 0.91			-79.53 ± 1.16			-79.62 ± 0.56		
Amplitud al pico (mV)	124.97 ± 1.75		**	127.71 ± 1.25			126.78 ± 0.89		
Sobretiro (mV)	46.10 ± 1.83			48.18 ± 1.74			47.16 ± 0.87		
Tiempo al pico (ms)	1.96 ± 0.33			1.51 ± 0.32		*	2.09 ± 0.38		
DPA 10% (ms)	5.10 ± 1.35			4.56 ± 1.27			6.18 ± 1.54		
DPA 20% (ms)	15.04 ± 2.74			15.02 ± 2.87		**	21.65 ± 4.26		**
DPA 30% (ms)	24.60 ± 3.44			24.85 ± 3.61		***	34.74 ± 5.86		***
DPA 50% (ms)	37.77 ± 4.37			36.88 ± 4.81		***	55.83 ± 6.87		***
DPA 60% (ms)	43.59 ± 4.81			41.76 ± 5.38		***	65.48 ± 7.30		***
DPA 90% (ms)	59.81 ± 5.69			55.13 ± 6.36		***	92.18 ± 7.87		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

**Tabla 6** Parámetros analizados en los potenciales de acción en estado estacionario de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo a 5 Hz. Se muestran las medias de parámetros analizados para la frecuencia de 5 Hz en las tres condiciones junto con sus errores estándar y el valor de p de acuerdo a la prueba de Tukey. PMD: Potencial de membrana diastólico; DPA: Duración del potencial de acción.

### Potencial de membrana diastólico en estado estacionario

A diferencia de los cardiomiocitos del ventrículos derecho en donde las ratas ZDF presentaban un potencial de membrana más despolarizado que las otras dos condiciones, en los miocitos del ventrículo izquierdo no encontramos diferencias significativa en el potencial de reposo entre los diferentes grupos y en ninguna de las frecuencias analizadas; **Figura 32**).

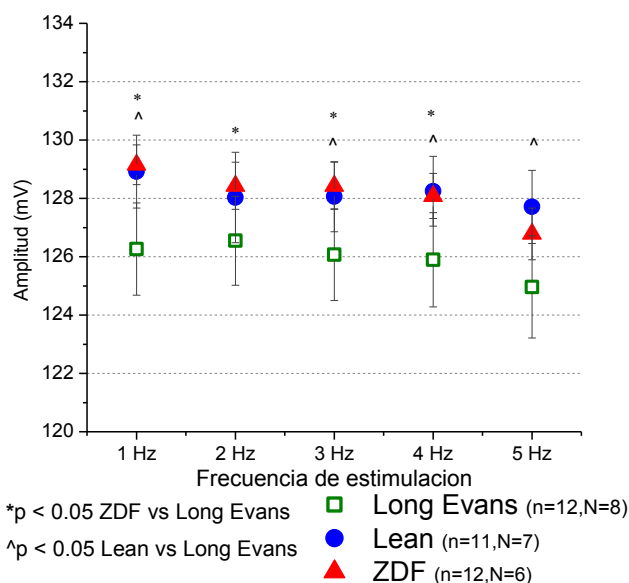


**Figura 32** Potencial de membrana diastólico en estado estacionario en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo. Se muestran los resultados para las condiciones Long Evans, ZDF y Lean para las frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Amplitud del potencial de acción en estado estacionario***

Cuando analizamos la amplitud del potencial de acción encontramos que existe un aumento significativo del valor de este parámetro en las células de la rata ZDF con respecto a la condición control para las frecuencias de 1 a 4 Hz de estimulación ( $p < 0.05$ ) (**Tablas 5 y 6**). Los valores corresponden a un aumento de la amplitud del potencial de acción de la condición ZDF del 2.29%, 1.49%, 1.87% y 2.49% para cada frecuencia respectivamente; **Figura 33**.

Para las frecuencias de 1, 3, 4 y 5 Hz, existe un aumento significativo de la amplitud del potencial de acción en los cardiomiocitos del grupo Lean al compararlos con los cardiomiocitos del grupo Long Evans ( $p < 0.05$ ). Este aumento corresponde a un 2.10%, 1.57%, 2.62% y 2.19% respectivamente; **Figura 33**.



**Figura 33 Amplitud del potencial de acción en estado estacionario de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo.** Amplitud del potencial de acción en estado estacionario para las condiciones Long Evans, ZDF y Lean para frecuencias de 1, 2, 3, 4 y 5 Hz.

### ***Duración del Potencial de Acción en Estado Estacionario***

Para todas las frecuencias se determinó la DPA al 10, 20, 30, 50, 60 y 90% de la repolarización y se realizó el análisis estadístico para comparar las diferentes condiciones.

Encontramos que, a 1 Hz de estimulación, existe un aumento significativo en la DPA en las ratas ZDF con respecto grupo Long Evans; **Figura 34**. Esta diferencia corresponde a un aumento en la DPA al 20, 30, 50, 60 y 90%, igual a un 28.33, 32.20, 38.43, 39.64 y 44.09% respectivamente con respecto al grupo Long



## **Tablas de resumen de resultados potencial de acción endocardio izquierdo**

A continuación se muestran las tablas de resumen de las diferencias significativas halladas en los diferentes parámetros del PA entre los grupos Long Evans, Lean y ZDF.

<b>Potencial de acción. Endocardio Izquierdo</b>				
	<b>Long Evans vs</b>			
	<b>1 HZ</b>		<b>5 Hz</b>	
<b>Parámetro/Condición</b>	<b>Lean</b>	<b>ZDF</b>	<b>Lean</b>	<b>ZDF</b>
<b>PMD</b>	---	---	---	---
<b>Amplitud al pico</b>	↑	↑	↑	---
<b>Sobretiro</b>	↑	↑	---	---
<b>Tiempo al pico</b>	↓	---	---	---
<b>DPA 10%</b>	↓	---	---	---
<b>DPA 20%</b>	↓	↑	---	↑
<b>DPA 30%</b>	---	↑	---	↑
<b>DPA 50%</b>	---	↑	---	↑
<b>DPA 60%</b>	↓	↑	---	↑
<b>DPA 90%</b>	↓	↑	---	↑

**Tabla 7** Se muestran las diferencias significativas de los parámetros del potencial de acción analizados al comparar las condiciones Lean y ZDF con respecto a la condición Long Evans en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo. Se indica un aumento (↑) o una disminución (↓) según corresponda (p<0.05).

<b>Potencial de acción. Endocardio Izquierdo</b>				
	<b>Lean vs</b>			
	<b>1 HZ</b>		<b>5 Hz</b>	
<b>Parámetro/Condición</b>	<b>Long Evans</b>	<b>ZDF</b>	<b>Long Evans</b>	<b>ZDF</b>
<b>PMD</b>	---	---	---	---
<b>Amplitud al pico</b>	↓	---	↓	---
<b>Sobretiro</b>	↓	---	---	---
<b>Tiempo al pico</b>	↑	↑	---	↑
<b>DPA 10%</b>	↑	↑	---	---
<b>DPA 20%</b>	↑	↑	---	↑
<b>DPA 30%</b>	---	↑	---	↑
<b>DPA 50%</b>	---	↑	---	↑
<b>DPA 60%</b>	↑	↑	---	↑
<b>DPA 90%</b>	↑	↑	---	↑

**Tabla 8** Se muestran las diferencias significativas de los parámetros del potencial de acción analizados al comparar las condiciones Long Evans y ZDF con respecto a la condición Lean en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo. Se indica un aumento (↑) o una disminución (↓) según corresponda (p<0.05).

## DISCUSIÓN DE RESULTADOS

En este proyecto decidimos estudiar el potencial de acción de los cardiomiocitos ventriculares aislados en las ratas ZDF, utilizadas como un modelo animal de DM2 (Takaya, Ogawa et al. 1996; Daniels, Linz et al. 2012; Joost, Al-Hasani et al. 2012; Katsuda, Ohta et al. 2014), para determinar si esta patología genera un aumento en la duración del potencial de acción de los cardiomiocitos ventriculares y si, de presentarse, está relacionado positivamente con una disminución en las corrientes repolarizantes de potasio  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$ .

Existen numerosos trabajos en los que se ha tomado al fenotipo delgado (Lean de la cepa Zucker), como grupo control o “sano”, bajo el entendido de que al ser una mutación de tipo recesivo, esta no se expresará al estar en heterocigocis (Johnson, Zucker et al. 1971; Sharma, Adroque et al. 2004; Wijekoon, Hall et al. 2005; Schafer, Huber et al. 2006; Adachi, Kikuchi et al. 2007; van den Brom, Bosmans et al. 2010; Daniels, Linz et al. 2012). Sin embargo, en este trabajo usamos también a la cepa de ratas Long Evans como grupo control por dos razones, la primera es que inicialmente no sabíamos si el hecho de que la ratas Lean fueran portadoras de la mutación provocaba algún cambio en el funcionamiento cardiaco, la segunda es porque la cepa ZDF se generó a partir de la cepa Long Evans.

Así, con el proposito de dar más claridad a los resultados obtenidos, hemos utilizado los fenotipos Lean (antes descrita) y Long Evans, para realizar las comparaciones con las ratas ZDF como grupo problema.

De acuerdo a los resultados morfométricos y metabólicos (glucosa instantánea y curva de tolerancia a la glucosa), las ratas ZDF utilizadas en este trabajo cumplen con las características de esta cepa, es decir, son obesas comparándolas con las ratas Long Evans y Lean y, además, presentan hiperglucemia e intolerancia a la glucosa (Johnson, Zucker et al. 1971; Takaya, Ogawa et al. 1996; Arias-Diaz and Balibrea 2007). Además, verificamos que las ratas utilizadas del grupo Lean, a diferencia de las ZDF, no presentaran obesidad, hiperglucemia ni intolerancia a la glucosa, como hemos mostrado en los resultados sobre el modelo animal, y tal como se ha descrito en trabajos previos sobre esta cepa (Johnson, Zucker et al. 1971; Schafer, Huber et al. 2006; Arias-Diaz and Balibrea 2007; Daniels, Linz et al. 2012; Joost, Al-Hasani et al. 2012).

Por lo que respecta las ratas ZDF, el aumento de volumen visible al compararlas con las Lean y Long Evans (**Apéndice VI**) tiene explicación en el aumento significativo del peso. Además, estas ratas presentan un aumento en la circunferencia abdominal que corresponde con un aumento también significativo,

de la cantidad de grasa visceral al compararlas con las ratas Lean y ZDF. En cuanto a los niveles de glucemia, las ratas Lean presentaron niveles muy similares a la rata Long Evans tanto en la medición en ayuno como sin ayuno (glucosa espontánea). De igual modo, sus curvas de tolerancia a la glucosa prácticamente se sobrepusieron en todos los puntos; **Figura 9**. En cambio, para la rata ZDF, tanto los niveles basales de glucosa,  $188.60 \pm 33.41$  mg/dL como el área bajo la curva de tolerancia a la glucosa,  $41941 \text{ mg}/2\text{Hr}$ , así como los niveles de glucosa al final de esta prueba,  $271 \pm 48.72$  mg/dL, fueron significativamente superiores; **Figura 9**. Es decir, solo las ratas ZDF presenta hiperglucemia e intolerancia a la glucosa.

Resulta interesante notar que el nivel de glucosa en sangre de las ratas ZDF, en una medición espontánea, es significativamente mayor al compararlas con las ratas Long Evans y Lean, mientras que en la primera medición de la curva de tolerancia a la glucosa, minuto cero, los niveles de glucosa de la rata ZDF son similares a las otras dos condiciones. Para explicar este fenómeno debe considerarse primero que las condiciones metabólicas en las ratas, para ambas mediciones, son diferentes ya que la medición de glucosa espontánea se realizó en una muestra de sangre obtenida antes del ayuno, mientras que la primera medición de la curva de tolerancia a la glucosa fue después de someter al animal a un ayuno de 6 horas. Se debe destacar que la medición de glucosa espontánea tiene relevancia ya que estos son los niveles a los que están sometidas las ratas de manera constante y este estado de hiperglucemia tiene repercusiones sobre el organismo.

Se deben considerar, además, al menos tres mecanismos que provocan que los niveles de glucosa en la rata ZDF disminuyan durante el periodo de ayuno. Uno de ellos se debe a la excreción de glucosa a través de la orina durante el ayuno, considerando que las ratas ZDF presentan poliuria y, además, glucosuria (Peterson 2003; Clerk, Vincent et al. 2007; Liu, Aronson et al. 2007). Otro mecanismo que pudiera estar disminuyendo los niveles de glucosa en estas ratas puede estar relacionado con la regulación de la glucosa por el glucagón. El glucagón, secretado por las células  $\alpha$  del páncreas, juega un papel importante en el mantenimiento de los niveles de glucosa en sangre durante condiciones de ayuno prolongado al estimular la producción de glucógeno en hígado. En condiciones normales, cuando los niveles de glucosa en plasma disminuyen durante la privación de ingesta de alimentos, la secreción de glucagón incrementa, aumentando la glucogenólisis y favoreciendo que los niveles de glucosa plasmática se mantengan (Jiang and Zhang 2003). Como se ha descrito previamente, en las ratas ZDF existe daño pancreático general que inicia desde la séptima semana de edad y que empeora con el tiempo, lo que produce una

disminución en la secreción de glucagón, y que representa un impedimento para el mantenimiento de los niveles de glucosa durante el ayuno. Esto puede explicar, parcialmente, la disminución de la concentración de glucosa en las ratas ZDF en la primera medición después de periodo de ayuno. Otra explicación de la disminución de glucosa en las ratas ZDF durante el ayuno, puede recaer en la participación del cortisol en la regulación de la insulina. El cortisol ha sido reconocido como una importante hormona del estrés y, además, se ha demostrado que el aumento de cortisol circulante aumenta la secreción de insulina favoreciendo la función de las células  $\beta$  del páncreas (Delaunay, Khan et al. 1997; King and Hegadoren 2002). Debe considerarse que el ayuno al que son sometidas las ratas durante la prueba de la curva de tolerancia a la glucosa representa un periodo de estrés para los animales. Así, durante este periodo, los niveles de cortisol pueden aumentar lo que favorecería el aumento de secreción de insulina por parte del tejido pancreático residual aún funcional en las ratas ZDF, lo que produciría una disminución de los niveles de glucosa circulante.

En seguimiento de nuestro primer objetivo específico, de analizar si la DM2 genera alteraciones en la DPA en los miocitos del endocardio derecho en las ratas ZDF, registramos los potenciales de acción de estas células en los grupos ZDF, Lean y Long Evans.

A manera recordatoria, hemos presentado los resultados obtenidos en el estudio de los potenciales de acción para las condiciones ZDF, que son ratas con una mutación homocigota en el receptor a leptina y que desarrollan DM2; Lean, con la mutación heterocigota para el receptor a leptina y que no desarrollan DM2, y Long Evans, que no presenta la mutación y tampoco desarrollan DM2.

Al realizar el análisis de los diversos parámetros del potencial de acción resultó interesante encontrar que el potencial de acción de los cardiomiocitos de la rata Lean no es igual al del fenotipo Wild Type (Long Evans). Esto supone que al comparar los resultados de las ratas ZDF tenemos que considerar a ambas cepas como grupos control y por lo tanto, cambios en el mismo sentido entre las ratas ZDF y Lean podrían deberse a la alteración genética presente en ambas, pero cambios en direcciones opuestas pueden considerarse como un efecto de la DM2, al igual que los cambios encontrados entre la rata ZDF y la Long Evans.

Por ejemplo, encontramos un aumento significativo en la amplitud al pico y el sobretiro de las ratas Lean y ZDF con respecto al grupo control, para todas las frecuencias; además de una disminución significativa del tiempo al pico para ambas condiciones en la mayoría de las frecuencias; **Figuras 17, 18 y 19**. Así, parece que estas diferencias pueden tener explicación en el trasfondo genético de estas ratas y no necesariamente son debidas a la DM2.

Por otro lado, la DPA en la ratas ZDF aumento solo al 90% con respecto al grupo de las Long Evans, pero en el caso de las ratas Lean, la DPA al 10, 20, 60 y 90% disminuyó. Si comparamos la duración del potencial de acción de la rata ZDF contra la Lean, encontraremos una diferencia significativa entre ambos grupos. Por lo tanto asumimos que los cambios encontrados en la DPA de la rata Lean pueden ser debidos a la mutación, pero el aumento en la DPA de la rata ZDF, es debido al efecto de la DM2, presente sólo en estas ratas.

La alteración más marcada entre las ratas ZDF y los grupos Lean y Long Evans, es la despolarización del potencial de membrana diastólico en los cardiomiocitos provenientes del endocardio derecho. Esta diferencia de alrededor de 3 mV se mantuvo en todas las frecuencias de estimulación. Por lo antes mencionado, proponemos que este cambio puede estar relacionado positivamente con la DM2.

Como se ha expuesto en las secciones correspondientes, y de acuerdo a los antecedentes reportados en trabajos con modelos animales de DM1, esperábamos encontrar un aumento significativo de la DPA de los cardiomiocitos de la cepa ZDF con respecto a la condición Long Evans. Nuestros datos muestran que existe un aumento significativo al 90% de la DPA a 1Hz y 4Hz entre estas dos cepas que corresponden a un 13.30% y un 16.9% respectivamente.

Al realizar la comparación de la DPA entre la rata ZDF y el grupo Lean, que en otros estudios se ha considerado el grupo control de esta cepa, encontramos diferencias significativas en todas las frecuencias y para la mayoría de los porcentajes de DPA. La diferencia encontrada es un aumento significativo al 10, 20, 60 y 90% de la DPA que corresponden a un 112.39%, 41.43%, 23.09% y 29.82% respectivamente con respecto al grupo Lean para 1Hz. Para la frecuencia de 5 Hz encontramos aumentos del 91.8%, 35.5%, 22.8%, 26% y 27% al 10, 20, 50, 60 y 90% de la DPA respectivamente. Encontramos también aumento significativo la DPA para las frecuencias de 2, 3 y 4 Hz al comparar la cepa ZDF con respecto a la Lean, datos que se pueden observan en las tablas incluidas en los apéndices.

Cabe destacar que al aplicar la estadística encontramos un aumento del error estándar en los datos correspondientes a la DPA de los cardiomiocitos del endocardio derecho de las ratas ZDF, lo que podría deberse al tamaño de la muestra o a un aumento de la dispersión de los datos debido a la presecencia de más de una población en esta condición. Para confirmar esto, aplicamos una prueba básica estadística para comprobar si nuestros datos se ajustaban a una población normal. De acuerdo a los resultados de la prueba indican que los datos de la DPA al 10, 20 y 90% en la condición ZDF no se ajustan a una población

normal, pero en los histogramas construidos al aplicar esta prueba no eran evidentes dos o más poblaciones. Debido a esto decidimos realizar un análisis de gráficas por cocientes donde pudimos incluir más de dos porcentajes de la DPA como variables para determinar si era posible distinguir y clasificar nuestros datos en dos o más poblaciones. A pesar de que parecían observarse más de un grupo para las tres condiciones (graficando el cociente 20%/10% con respecto al 90% de la DPA), la clasificación de los datos por este método nos parecía arbitraria. De tal modo, aplicamos una prueba estadística de bootstrapping, con el objetivo de que al ser un método de remuestreo de gran potencia nos permitiera diferenciar objetivamente las poblaciones. Los resultados de esta prueba nos confirmaron los hallazgos de la prueba de normalidad, los datos de la DPA al 10 y 20%, tanto a 1 como a 5 Hz, de las tres condiciones no se ajustan a una distribución normal; esto mismo ocurre al 90% de la DPA pero sólo en las ratas ZDF. A pesar de esto, no logramos determinar intervalos que nos permitan distinguir y clasificar los datos para poder realizar un análisis más profundo.

Aun así, de manera general, el aumento de la DPA que encontramos en la condición ZDF coincide con lo reportado por estudios anteriores, realizados en modelos de DM1, en los que se demuestra que la DM provoca un aumento en la duración del potencial de acción cardiaco (Shimoni, Ewart et al. 1998; Lengyel, Virag et al. 2007). Diversos estudios han demostrado también que en la DM1 este aumento de la DPA de las células cardiacas se debe principalmente a una reducción de las corrientes repolarizantes (Shimoni, Ewart et al. 1998; Casis, Gallego et al. 2000; Veglio, Bruno et al. 2002; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013). Por lo cual, y de acuerdo a nuestro segundo objetivo, determinamos si existían cambios en las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$  e  $I_{K1}$  que pudieran explicar el aumento de la DPA en nuestro modelo animal de DM2.

De acuerdo a los datos obtenidos en el análisis del potencial de acción al 10% de la DPA y ya que esta corriente juega un rol importante en la fase de repolarización temprana (Tomaselli and Marban 1999; Nerbonne and Kass 2005; Bassani 2006), esperábamos encontrar una disminución significativa de la corriente  $I_{to}$  en los cardiomiocitos del endocardio provenientes de la condición Lean, con respecto a los grupos Long Evans y ZDF o un aumento de esta misma corriente en las ratas ZDF al compararlo con el grupo Lean. Como muestran nuestros resultados del registro y análisis de esta corriente, no encontramos una diferencia significativa en la densidad de la  $I_{to}$  al comparar las tres condiciones.

Al realizar el análisis de la curva de activación en estado estacionario de la corriente  $I_{to}$  no encontramos cambios significativos entre las tres condiciones. Por otro lado, el análisis de la curva de inactivación en estado estacionario de la

corriente  $I_{to}$ , nos indica una diferencia significativa en el  $V_{1/2}$  de esta corriente al comparar la condición ZDF con la condición Long Evans, no así al compararla con la condición Lean; **Figura 24**. Esta diferencia corresponde a un corrimiento del  $V_{1/2}$  a voltajes positivos en la condición ZDF ( $-38.08 \pm 2.95$  mV) con respecto a la Long Evans ( $-43.82 \pm 1.28$  mV).

El hecho de encontrar diferencias significativas en el parámetro  $V_{1/2}$  en la curva de inactivación en estado estacionario de la condición ZDF con respecto a la Long Evans nos lleva a pensar que existen cambios en las propiedades biofísicas de los canales de la corriente  $I_{to}$  en el grupo ZDF, específicamente en la dependencia de voltaje para la inactivación; **Figura 24**. El corrimiento del  $V_{1/2}$  de inactivación en la condición ZDF puede implicar un aumento de la corriente de ventana de la  $I_{to}$  con respecto a la condición Long Evans. Ya que no encontramos cambios significativos en la densidad de esta corriente en la condición ZDF, proponemos que puede existir una diferencia en la expresión de los canales de la  $I_{to}$  en los cardiomiocitos de esta condición que evita que las alteraciones biofísicas del canal no se reflejen en una disminución de la corriente y que por consiguiente la DPA al 10% no aumente. Este fenómeno puede significar un efecto compensatorio en la DM2, pero ya que con los datos obtenidos en este trabajo no nos permiten confirmar esto, no debemos descartar la opción que sea un efecto directo de la DM2.

Como se ha descrito en la sección de metodología y resultados, determinamos las  $\tau$  lenta y rápida en la recuperación de inactivación en estado estacionario de la  $I_{to}$  mediante el ajuste de los datos a una curva de dos exponenciales. Los valores de estos parámetros nos ayudaron a discriminar la presencia de los dos componentes de la corriente  $I_{to}$  ( $I_{to,f}$  e  $I_{to,s}$ ), ya que como se descrito antes, la  $I_{to,f}$  se debe a canales con una rápida recuperación de la inactivación (alrededor de 100 ms) y la  $I_{to,s}$  se debe a canales que se recuperan en algunos segundos. Como se muestra en la **Figura 24**, obtuvimos los valores de la  $\tau$  rápida, correspondiente a la  $I_{to,f}$ ,  $78.21 \pm 24.54$  ms,  $117.31 \pm 28.52$  ms y  $116.92 \pm 8.90$  ms para las condiciones Long Evans, Lean y ZDF, respectivamente. Y, además, obtuvimos la  $\tau$  lenta, que corresponde a  $I_{to,s}$ ,  $2686.49 \pm 529.79$  ms,  $2468 \pm 606.13$  ms y  $3584.56 \pm 1229.191$  ms respectivamente para las ratas Long Evans, Lean y ZDF. No encontramos diferencias significativas para las  $\tau$  lenta o rápida de la recuperación de la inactivación entre las tres condiciones.

Aun cuando se ha reportado que en la DM existe una disminución de la corriente  $I_{to}$ , al menos en trabajos realizados en modelos animales de DM1 (Casis, Gallego et al. 2000; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013), al comparar las características de esta corriente entre las condiciones ZDF y Long Evas, nosotros no encontramos diferencias significativas en la densidad

de corriente ni la pendiente  $K$  de la curva de inactivación en estado estacionario, o las  $T$  lenta y rápida en la recuperación de inactivación en estado estacionario de esta corriente, esto concuerda con los datos obtenidos en el análisis de la DPA al 10% en este trabajo al comparar estas dos condiciones donde no se encuentra una diferencia significativa de la DPA a este porcentaje.

Al no encontrar una diferencia significativa en la densidad de la corriente  $I_{to}$ , nuestros resultados coinciden con lo antes reportado en otro modelo de DM2, inducido por una dieta rica en fructuosa, donde se propone que la disminución de la  $I_{to}$  no es significativa con respecto a su grupo control (Shimoni, Ewart et al. 1998). Cabe destacar que en ese trabajo no se hace mención sobre la zona del ventrículo del cual fueron extraídas las células y recordemos que el corazón es un órgano altamente heterogéneo en cuanto a la expresión de canales iónicos, y que además, se reporta una disminución de la DPA, contrario a nuestros resultados.

De acuerdo a los resultados que obtuvimos al analizar la DPA al 60% y considerando que la corriente  $I_K$  participa de manera importante en la fase 3 del potencial de acción, no esperábamos encontrar diferencias significativas en la densidad de la corriente  $I_K$  de los cardiomiocitos de las ratas ZDF con respecto a las Long Evans; pero sí esperábamos encontrar aumento en esta corriente con respecto al grupo Lean. (Tomaselli and Marban 1999; Nerbonne and Kass 2005; Charpentier, Merot et al. 2010).

No encontramos diferencias significativas en la densidad de la corriente  $I_K$  al comparar las tres condiciones, como se muestra en la **Figura 27**, aún cuando una disminución de la corriente  $I_K$  ha sido previamente reportada por diversos estudios realizados en modelos animales de DM1 con aumento de la DPA (Shimoni, Ewart et al. 1998; Casis, Gallego et al. 2000; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013).

Finalmente, nos enfocamos en el análisis de la corriente entrante rectificadora de potasio,  $I_{K1}$ , puesto que esta contribuye en la fase terminal de repolarización, DPA 90% (Tomaselli and Marban 1999; Nerbonne and Kass 2005). Encontramos un aumento significativo en la DPA al 90%, a 1 y 4Hz, al comparar el potencial de acción de los cardiomiocitos del grupo ZDF con el grupo Long Evans. Además de esto, nuestros resultados indican un aumento de la DPA para todas las frecuencias, al 90%, al comparar la condición ZDF contra el grupo Lean. Además de su imprescindible participación en la fase terminal de repolarización del potencial de acción, la corriente  $I_{K1}$  mantiene el potencial de membrana en reposo (Tomaselli and Marban 1999; Nerbonne and Kass 2005). El análisis del potencial de acción en membrana en reposo muestra que existe una despolarización

significativa en los cardiomiocitos provenientes del grupo ZDF al compararlo con las otras dos condiciones, Long Evans y Lean; **Figura 16**.

En trabajos antes descritos con modelos animales de DM1, no se presentaron cambios de la densidad de corriente  $I_{K1}$  (Shimoni, Ewart et al. 1998; Lengyel, Virag et al. 2007; Torres-Jacome, Gallego et al. 2013). En nuestro caso, reportamos una disminución de la corriente  $I_{K1}$  en los cardiomiocitos provenientes de las ratas ZDF, modelo animal de DM2, aproximadamente del 58%, Figura 29. Esto puede explicar la despolarización estadísticamente significativa del potencial de membrana diastólico de estas células al compararlas con las condiciones Lean y Long Evans, y, además, explicar el aumento significativo de la DPA al compararlas con estos dos grupos.

Resulta interesante notar que de acuerdo a las curvas I/V de las corrientes  $I_{K1}$  obtenidas en nuestros registros, el voltaje de inversión de la corriente está entre los -50 y -60 mV, mientras que el voltaje de reposo de los cardiomiocitos resulta estar cerca de los -80 mV. Una posible explicación a esto es que en nuestros registros estemos obteniendo más de una corriente, es decir, que junto con la corriente  $I_{K1}$ , se evoque alguna corriente de fondo con el mismo protocolo, con lo que el voltaje de inversión en la curva I/V resulte positivo con respecto al valor esperado con nuestras soluciones de registro. Aún cuando la etapa experimental correspondiente a este trabajo ya había concluido, para verificar esto decidimos registrar esta misma corriente en presencia de  $BaCl_2$  con el fin de bloquear la corriente  $I_{K1}$  y comprobar la existencia de una corriente de fondo (Warren, Guha et al. 2003). En el **Apéndice XI** se incluye un ejemplo de los trazos obtenidos al graficar la corriente sensible a  $BaCl_2$ , es decir corriente  $I_{K1}$ , la cual fue obtenida al calcular la diferencia entre las corrientes en ausencia y presencia de  $BaCl_2$  en cardiomiocitos de diferentes regiones del ventrículo en las ratas Long Evans, Lean y ZDF. Al graficar la corriente sensible a  $BaCl_2$ ,  $I_{K1}$ , bajo esta condición, se observa que el voltaje de inversión se recorre hasta alrededor de los -80mV. Esto nos indica que en nuestros registros iniciales efectivamente se incluye una corriente de fondo que, hasta el momento, no nos ha sido posible definir y que influye en el voltaje de inversión de las gráficas que presentamos en la sección de resultados.

El último de nuestros objetivos para este trabajo fue determinar si existe una correlación positiva entre los cambios en la morfología del potencial de acción y las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$ , e  $I_{K1}$ . De acuerdo a los resultados ya expuestos, hemos mostrado que en el endocardio derecho no existe un aumento significativo al 10 o 60% de la DPA en las ratas ZDF (DM2) al compararlas con el grupo control Long Evans, así como tampoco encontramos cambios significativos en las corrientes  $I_{to}$  e  $I_K$ , lo que parece corresponderse. Por otra parte, existe un aumento significativo de la DPA al 90% en las ratas ZDF (DM2) al compararlas

con el grupo Long Evans (1 Hz), así como una disminución de la densidad de la corriente  $I_{K1}$  en las ratas ZDF bajo la misma comparación, lo que además parece tener una relación positiva con la despolarización del potencial de membrana que encontramos en estas mismas células.

Nuestros datos indican que existen diferencias en la DPA del potencial de acción de los cardiomiocitos del endocardio derecho entre las ratas ZDF y Lean. Proponemos que deben considerarse también estos resultados ya que, a diferencia de las ratas Long Evans, las ratas Lean comparten un trasfondo genético con las ratas ZDF. En cuanto a esto, encontramos un aumento significativo en la mayoría de los porcentajes de la DPA en las ratas ZDF (DM2) al compararlas con las ratas Lean. A pesar de esto no encontramos diferencias significativas en las corrientes  $I_{to}$ ,  $I_K$ , o  $I_{K1}$  entre estos dos grupos que pudieran explicar el aumento de la DPA en los cardiomiocitos de las ratas ZDF.

Aun cuando en los objetivos de este proyecto estaba contemplado el estudio de las alteraciones en el potencial de acción sólo en el endocardio derecho, presentamos también resultados sobre el endocardio izquierdo. Los resultados difieren de los que encontramos en el endocardio derecho.

Por ejemplo, a diferencia del endocardio derecho donde el potencial diastólico de los cardiomiocitos del grupo ZDF está significativamente despolarizado con respecto a los otros grupos, en el endocardio izquierdo no encontramos diferencia significativa de este parámetro entre las tres condiciones. Además, encontramos un aumento significativo de la amplitud del potencial de acción, para la mayoría de las frecuencias, en los cardiomiocitos de las ratas ZDF con respecto al grupo Long Evans.

En cuanto a la DPA, en el endocardio izquierdo encontramos un aumento significativo al 20, 30, 50, 60 y 90% en los cardiomiocitos de las ratas ZDF al compararlos con el grupo Long Evans. Esto difiere de lo encontrado en el endocardio derecho, donde sólo encontramos una diferencia significativa de la DPA al 90% (1 y 4 Hz) entre estos dos grupos.

Como hemos mencionado, en el endocardio derecho existe una disminución de la DPA de los cardiomiocitos del grupo Lean con respecto al grupo Long Evans. Mientras que para el endocardio izquierdo, la DPA entre las condiciones Lean y Long Evans no tienen diferencias significativas para la mayoría de las frecuencias (2 a 5 Hz), es decir, la repolarización del potencial de acción es similar en estas dos condiciones.

Proponemos registrar las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$ , e  $I_{K1}$  en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo de las tres condiciones para determinar si

existen diferencias significativas en estas corrientes que puedan explicar las marcadas diferencias del potencial de acción en el endocardio izquierdo. Además, es indispensable realizar el estudio del potencial de acción y de las corrientes iónicas en cardiomiocitos provenientes de las demás regiones ventriculares, mediocardio y epicardio en la condición ZDF, para verificar si la remodelación eléctrica encontrada en el endocardio ocurre en el resto del tejido ventricular, y si contribuye a explicar las alteraciones en la repolarización cardiaca reportada en la DM2.

Finalmente, además de las alteraciones eléctricas del tejido cardiaco en los pacientes con DM2, debe considerarse que se ha demostrado que el aumento de la masa ventricular, sobretodo del ventrículo izquierdo, son importantes factores de riesgo independientes de morbilidad y mortalidad cardiovascular. Como se ha expuesto en los resultados, nosotros encontramos un aumento significativo del área de membrana celular de los cardiomiocitos del endocardio derecho, así como del endocardio izquierdo, en las ratas con DM2 comparándolas con los grupos controles. Hasta ahora no existían reportes de hipertrofia ventricular derecha en las ratas ZDF.

Trabajos anteriores han reportado que existe hipertrofia cardiaca en las ratas ZDF, al menos en el ventrículo izquierdo. Por ejemplo, Huang y colaboradores (Huang, He et al. 2008) reportaron un aumento significativo del peso total del corazón, del peso del ventrículo izquierdo y del área en el plano transversal de los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo de las ratas ZDF de 13 semanas de edad, al compararlos con ratas Lean de la misma edad. Huang y colaboradores proponen que la hipertrofia en las ratas ZDF está favorecida por la presencia de obesidad en estas ratas y por efectos de los mecanismos de la angiotensina II sobre el receptor a angiotensina tipo I (AT1R), que estaba aumentado en las ZDF junto con el péptido natriurético cerebral (BNP) y atrial (ANP) en este tejido. Cabe resaltar que sólo estos autores reportan un aumento significativo de la presión arterial sistólica en las ratas ZDF con respecto al grupo control ( $133.7 \pm 4$  vs  $104.1 \pm 3.7$  mmHg), que puede explicar los efectos de la angiotensina II en estas ratas.

La angiotensina II, es el mayor efector del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAS por sus siglas en inglés), y es bien conocido por ser uno de los más importantes reguladores de la respuesta hipertrófica durante hipertensión. En cultivos primarios de cardiomiocitos de ratas neonatales, se ha demostrado que la angiotensina II induce directamente la hipertrofia por un aumento de síntesis de proteínas en estas células a través de la activación del receptor AT1R. Los efectos hipertróficos de la angiotensina II están medidos por diversos mecanismos intracelulares que incluyen la vía de la proteína quinasas activada por mitógeno

(MAPK) (Sadoshima and Izumo 1993). A pesar de la importancia de los efectos de la angiotensina II, además del trabajo de Huang y colaboradores (Huang, He et al. 2008) no existen otros reportes de que las ratas de nuestro modelo animal presenten hipertensión, por lo cual, la hipertrofia existente en el miocardio debe puede deberse a otra causa.

En pacientes con DM2, el estudio específico de la hipertrofia ventricular ha sido ignorado ya que suele contemplarse como un evento desencadenado sólo por la hipertensión. A pesar de esto, en estudios como los de Dawson y colaboradores (Dawson, Morris et al. 2005), se demuestra que la hipertensión sistólica o diastólica no es un predictor de la hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con DM2. Además, la patogénesis de la hipertrofia ventricular no hipertensiva de la DM2, se ha relacionado con la obesidad, resistencia a la insulina e hiperglucemia (Ding, Yu et al. 2013; Han, Wang et al. 2015; Levitt Katz, Gidding et al. 2015)

Existen numerosos trabajos clínicos que enfocan su estudio en las alteraciones estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo en pacientes con DM2. En ellos se reporta la presencia de hipertrofia ventricular izquierda excéntrica o concéntrica y disfunción ventricular izquierda y derecha independientes de hipertensión y enfermedad coronaria (Kosmala, Colonna et al. 2004; Nworah, Chike et al. 2011), y en algunos otros, además, la hipertrofia ventricular parece estar relacionada con un aumento significativo del IMC con respecto al grupo control (Dawson, Morris et al. 2005; Levitt Katz, Gidding et al. 2015).

Por ejemplo, el trabajo de Nworah y colaboradores (Nworah, Chike et al. 2011) evidencia la presencia de hipertrofia ventricular en pacientes diabéticos normotensos. Su estudio fue realizado en una población de mujeres con MD2, y reportaron que el 16.5% de las pacientes hipertensas y 13% de las pacientes normotensas presentaban hipertrofia ventricular izquierda. Además, determinaron que dentro de las anomalías cardiovasculares en las pacientes normotensas predominaban el flutter atrial y las arritmias, mientras que en las pacientes hipertensas predominaba el bloqueo bifascicular, bloqueo atrial izquierdo y aumento de ventrículo y aurícula derechos.

Por otro lado, Kosmala y colaboradores (Kosmala, Colonna et al. 2004) demostraron que existe insuficiencia diastólica en el ventrículo derecho en pacientes diabéticos sin hipertensión pulmonar o sistémica. Además, no hubo diferencia significativa en el grado de afectación de la función diastólica del ventrículo derecho entre los pacientes diabéticos hipertensos y normotensos.

En cuanto a los estudios realizados en el mismo modelo animal de este trabajo, Fredesdorf y colaboradores (Fredesdorf, Thumann et al. 2004), reportaron que en las ratas ZDF de 19 semanas, los cardiomiocitos del ventrículo izquierdo tienen el doble de volumen que los cardiomiocitos de las ratas Lean, que parece estar relacionado con un aumento en los niveles de mRNA del ANP ventricular. A diferencia del trabajo de Huang (Huang, He et al. 2008), no se reporta hipertensión en las ratas ni un aumento en el peso total del corazón. Demostraron la existencia de fibrosis perivascular y un aumento significativo en el espesor de la laminina perivascular en el miocardio de las ratas ZDF. Además, reportan un aumento en la fracción de eyección y del acortamiento de la pared ventricular izquierda que parece aumentar la función sistólica ventricular como un mecanismo compensatorio. De acuerdo a sus resultados, Fredesdorf y colaboradores proponen que la hipertrofia de los cardiomiocitos ventriculares en las ratas ZDF es favorecida por el estado inicial, durante el estado prediabético, de hiperinsulinemia en estas ratas. Estudios en vivo sugieren que la insulina, por activación de su receptor, es capaz de inducir la cascada JAK/STAT1 en el corazón, la cual favorece los mecanismos de crecimiento celular que promueve el desarrollo de hipertrofia (Velloso, Carvalho et al. 1998).

Por otro lado, se ha considerado que el estado continuo de hiperglucemia en la DM2 es uno de los factores más patogénicos para el tejido cardiaco y parece estar relacionado con la hipertrofia cardiaca. Ding y colaboradores (Ding, Yu et al. 2013), por ejemplo, demostraron que un aumento de la O-glicosilación, favorecida por la hiperglucemia, juega un rol importante en la hipertrofia cardiaca vía ERK1/1 y ciclina D2. En dicho trabajo se estudió el efecto en la O-glicosilación en cardiomiocitos neonatales de rata que fueron expuestos a altas concentraciones de glucosa (30 mM) y en el miocardio de ratas con diabetes inducida por STZ. Los cardiomiocitos expuestos a altas concentraciones de glucosa aumentaron su tamaño hasta dos veces más que los controles, además de presentar un aumento significativo de marcadores hipertróficos y en las proteínas sometidas a O-glicosilación. En las ratas diabéticas se observó una hipertrofia cardiaca concéntrica y cambios similares en los niveles de O-glicosilación. Para ambas series experimentales se observó un aumento en la activación de la cascada ERK1/2 y de la ciclina D2, asociadas a respuestas de crecimiento celular e hipertrofia cardiaca.

Han y colaboradores (Han, Wang et al. 2015) demostraron que existe hipertrofia cardiaca en fetos ratón de madres con diabetes inducida por STZ. De acuerdo a sus resultados esta hipertrofia se debe al aumento significativo de tamaño de los cardiomiocitos y no a un aumento en la proliferación celular o a una disminución de la apoptosis. El aumento de tamaño en los cardiomiocitos es

favorecido por la exposición a altas concentraciones de glucosa, como se observó en sus resultados de experimentos en cultivos celulares de H9c2 , una línea celular de mioblastos cardiacos de rata; en estos cultivos, las altas concentraciones de glucosa, 25 Y 55 mmol/l, disminuyeron significativamente la proliferación celular y aumentaron la apoptosis, mientras que el área celular aumentó significativamente con respecto a sus controles, 5.5 mmol/l.

La obesidad, la resistencia a la insulina e hiperglucemia en la DM2 parecen estar implicadas en la patogénesis de la hipertrófica ventricular no hipertensiva (Ding, Yu et al. 2013; Han, Wang et al. 2015; Levitt Katz, Gidding et al. 2015). Las ratas ZDF presentan obesidad e hiperglucemia a las 13 semanas de edad, además de haber padecido de resistencia a la insulina al menos durante el estado prediabético, lo que puede explicar el desarrollo de hipertrofia ventricular en estas ratas.

## CONCLUSIONES

- Existen diferencias significativas en la morfología del potencial de acción del endocardio entre las cepas Lean y Long Evans que deben considerarse en su uso como grupos controles de las ratas ZDF.
- Existe un aumento significativo del área de membrana celular en los cardiomiocitos del endocardio derecho e izquierdo de las ratas ZDF, un modelo animal de DM2, lo que sugiere hipertrofia ventricular en estas ratas.
- Existe un aumento de la DPA (90%) y una despolarización del potencial de membrana de los cardiomiocitos del endocardio derecho de las ratas ZDF, con DM2, que pueden estar explicadas por la disminución de la densidad de la corriente  $I_{K1}$ .
- En las ratas ZDF, un modelo experimental de DM2, existe un aumento de la DPA (20, 30, 50, 60 y 90%) de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo.
- La alteración morfológica del potencial de acción, encontrada en las ratas ZDF, difiere entre los cardiomiocitos del endocardio derecho e izquierdo.

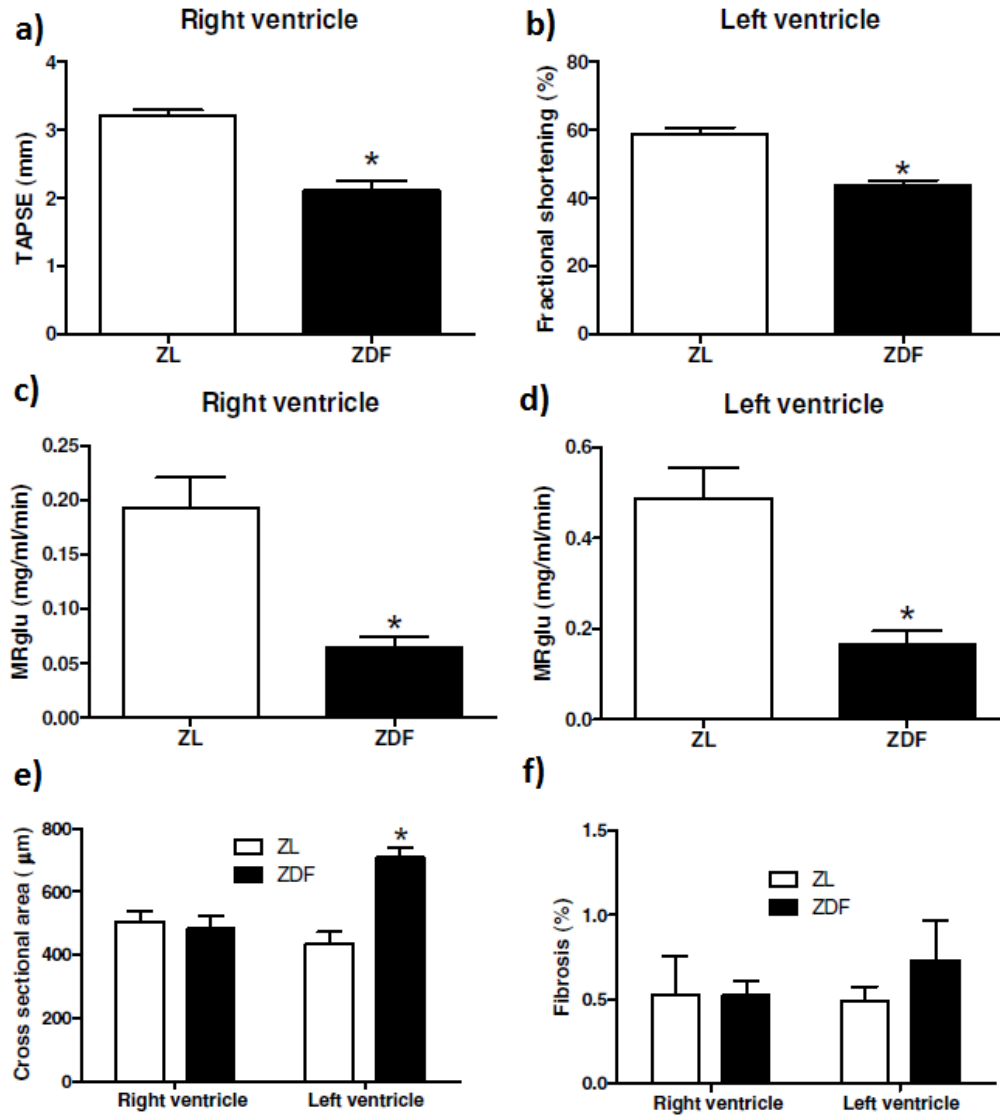
## PERSPECTIVAS

Proponemos registrar las corrientes repolarizantes  $I_{to}$ ,  $I_K$ , e  $I_{K1}$  en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo de las tres condiciones para determinar si existen diferencias significativas en estas corrientes que puedan explicar las marcadas diferencias del potencial de acción en el endocardio izquierdo.

Además, es indispensable realizar el estudio del potencial de acción y de las corrientes iónicas en cardiomiocitos provenientes de las demás regiones ventriculares, mediocardio y epicardio en la condición ZDF, para verificar si la remodelación eléctrica encontrada en el endocardio ocurre en el resto del tejido ventricular, y si contribuye a explicar las alteraciones en la repolarización cardíaca reportada en la DM2.

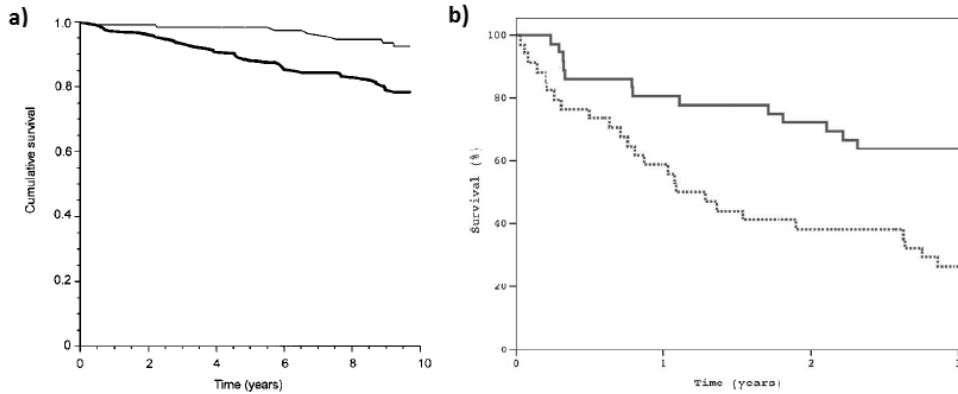
# APÉNDICES

## Apéndice I Alteraciones de la función y estructura cardiaca en ratas ZDF (van den Brom, Bosmans et al. 2010)



Alteraciones metabólicas y funcionales en el ventrículo derecho e izquierdo en las ratas ZDF macho de 14 semanas de edad. Se muestran los cambios relativos de la función sistólica (tricuspid annulus systolic plane excursion; TAPSE) del a) ventrículo derecho y b) ventrículo izquierdo (fracción de acortamiento), además de la tasa metabólica de utilización de glucosa (MRglu) en c) ventrículo derecho y d) ventrículo izquierdo de las ratas Lean (barras blancas) y ZDF (barras negras). En e) se muestra el área en el plano transversal de los cardiomiocitos del ventrículo derecho e izquierdo y en f) la cuantificación de la fibrosis en las ratas Lean (barras blancas) y ZDF (barras negras). \* $p < 0.05$  vs Lean (van den Brom, Bosmans et al. 2010).

## Apéndice II Aumento en el QTc y QTd como predictores de mortalidad cardiovascular en pacientes con DM2



c)

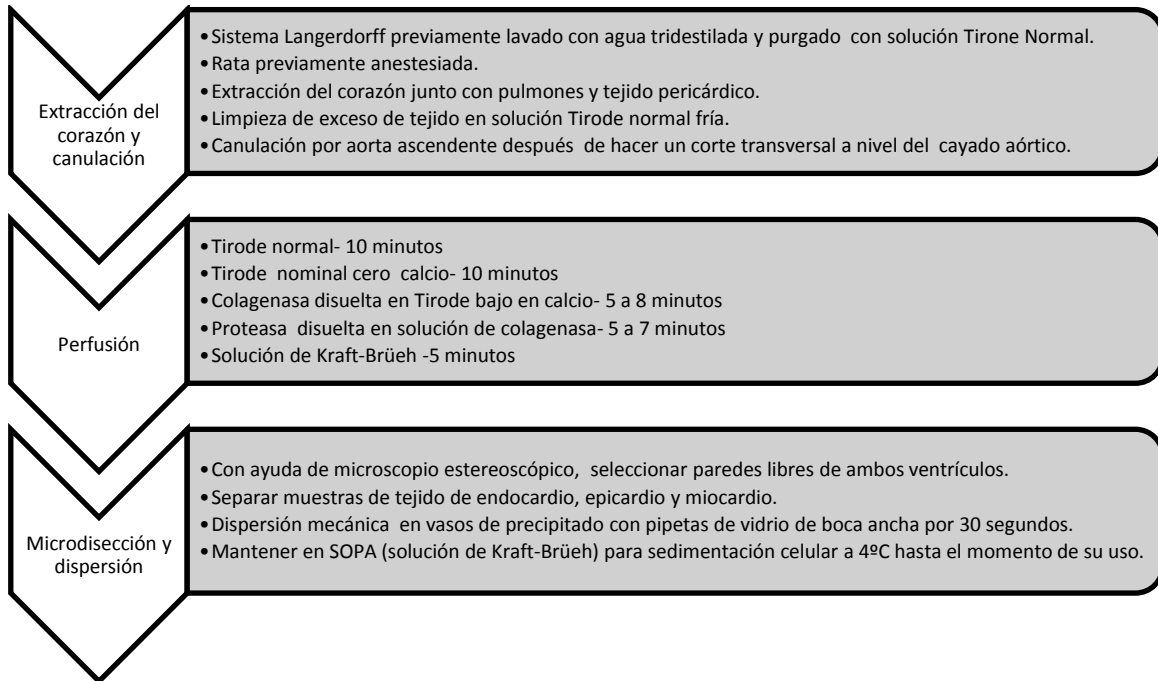
Table 1—Mortality rates and results of Cox regression analyses in the Casale Monferrato Study by QTc and QTd

	Number of deaths	Rate per 1,000 person-years (95% CI)	Model 1	Model 2	Model 3	Model 4
<b>All-cause mortality</b>						
QTc (s)						
≤0.44	589	67.5 (62.3–73.2)	1.00	1.00	1.00	1.00
>0.44	273	73.2 (65.0–82.4)	1.08 (0.93–1.24)	1.05 (0.91–1.21)	1.08 (0.93–1.26)	1.04 (0.89–1.23)
QTd (s)						
≤0.08	635	67.1 (62.1–72.6)	1.00	1.00	1.00	1.00
>0.08	227	75.4 (66.2–85.8)	1.11 (0.95–1.29)	1.06 (0.91–1.24)	1.10 (0.94–1.29)	1.06 (0.90–1.26)
<b>Cardiovascular mortality</b>						
QTc (s)						
≤0.44	300	34.5 (30.8–38.6)	1.00	1.00	1.00	1.00
>0.44	140	37.5 (31.8–44.3)	1.07 (0.88–1.31)	1.04 (0.85–1.28)	1.08 (0.88–1.34)	1.02 (0.81–1.27)
QTd (s)						
≤0.08	313	33.1 (29.6–37.0)	1.00	1.00	1.00	1.00
>0.08	127	42.2 (35.4–50.2)	1.26 (1.02–1.55)	1.21 (0.99–1.49)	1.27 (1.02–1.57)	1.23 (0.97–1.54)

Model 1: unadjusted; model 2: adjusted for age and sex; model 3: model 2 plus hypertension, apoB-to-apoA1 ratio, HbA<sub>1c</sub>, micro-/macroalbuminuria, and smoking; and model 4: model 3 plus coronary heart disease.

Se muestra en a) las curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, considerando la mortalidad cardiovascular, en 320 pacientes con DM2 con QTc >440ms (línea gruesa, n=213) y con QTc <440ms (línea delgada, n=107); p<0.01 (Christensen, Gall et al. 2000). En b) se observan las tasas de supervivencia de pacientes con DM2 con (línea punteada) y sin (línea continua) aumento en el QTc, > 440ms; p< 0.001 (Fagher, Nilsson et al. 2014) . c) Tasas de mortalidad y resultados del análisis de regresión de Cox en el Estudio de Casale Monferrato para los valores de QTc y QTd (Giunti, Gruden et al. 2012).

## Apéndice III Diagrama de trabajo para el aislamiento de cardiomiocitos.



## Apéndice IV Soluciones

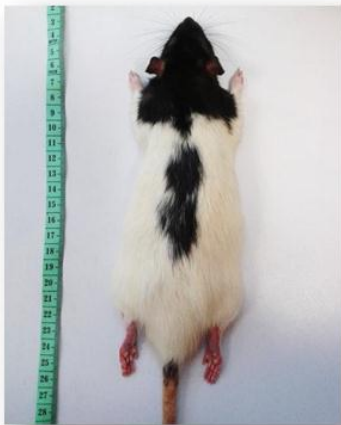
Soluciones de aislamiento de cardiomiocitos											
	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	HEPES	Glucosa	CaCl <sub>2</sub>	---	---	---	pH
Solución Tyrode Normal	140mM	5.4mM	1mM	1 mM	10 mM	10mM	1 mM	---	---	---	7.38 con NaOH
Solución Tyrode Nominal Cero Calcio	140mM	5.4mM	1mM	1 mM	10 mM	10mM	---	---	---	---	7.38 con NaOH
	KCl	HEPES	Glucosa	Glutamato de K <sup>+</sup>	Aspartato de K <sup>+</sup>	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub>	Taurina	Creatina	EGTA	pH
Solución de Kraft-Brüeh	25 mM	5 mM	20mM	100mM	10mM	10 mM	2 mM	20 mM	5 mM	0.5 mM	7.38 con KOH

Soluciones de registro electrofisiológico										
	L-ácido aspártico	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	Na-ATP	KCl	HEPES	EGTA	GTP	Fosfocreatina	pH
Solución Interna	80mM	10mM	1mM	3mM	50mM	5mM	10mM	0.2mM	5mM	7.35 con KOH
	NaCl	KCl	MgCl <sub>2</sub>	HEPES	CaCl <sub>2</sub>	Glucosa	CoCl <sub>2</sub>	---	---	pH
Solución externa	136mM	4mM	1mM	10mM	1.8mM	11mM	---	---	---	7.4 con NaOH
Solución extracelular baja en Calcio (Ca-Co)	136mM	4mM	1mM	10mM	0.1mM	11mM	0.5mM	---	---	7.4 con KOH

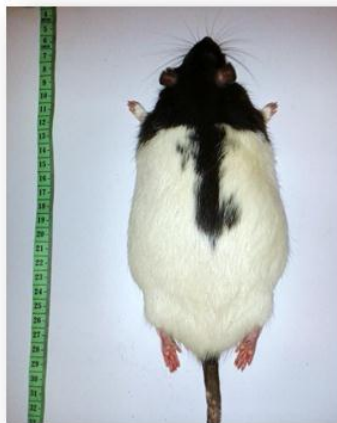
## Apéndice V Trasfondo genético del modelo animal

Grupo	Característica			
	Mutación en gen « <i>fa</i> » que codifica para el receptor a leptina		Receptor a leptina funcional	Desarrollo de DM2
	Heterocigota	Homocigota		
Long Evans			X	
Lean	X		X	
ZDF		X		X

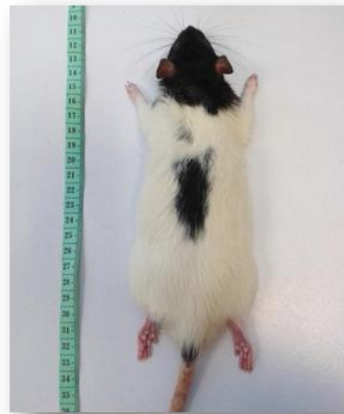
## Apéndice VI Fotografías de especímenes Long Evans, Lean y ZDF.



Long Evans



ZDF



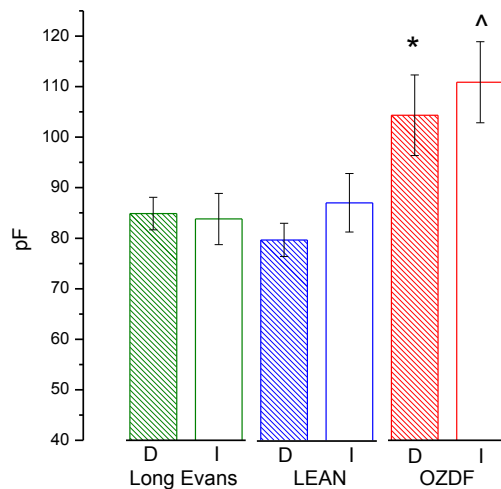
Lean

## Apéndice VII Parámetros metabólicos y morfométricos

PARÁMETRO	MODELO ANIMAL								
	Long Evans (A) N=13			Lean (B) N=21			ZDF (C) N=11		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
Peso (g)	287.80 ± 8.01			301.00 ± 8.37		***	452.10 ± 14.38		***
Longitud H-A (cm)	21.74 ± 0.19			21.72 ± 0.18			22.69 ± 0.29		
Circunferencia abdominal (cm)	17.71 ± 0.28		**	16.63 ± 0.23		***	24.50 ± 0.29		***
Grasa epididimal (g)	1.75 ± 0.15			2.26 ± 0.23		***	11.39 ± 0.86		***
Grasa peripancreática (g)	0.34 ± 0.07			0.60 ± 0.07		***	1.69 ± 0.23		***
Grasa retroperitoneal (g)	1.33 ± 0.24			1.79 ± 0.24		***	15.59 ± 1.15		***
Grasa Total (g)	3.43 ± 0.40			4.65 ± 0.48		***	28.67 ± 1.90		***
Glucosa espontánea (mg/dl)	86.15 ± 3.05			89.50 ± 2.99		***	188.60 ± 33.41		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

## Apéndice VIII Capacitancias celulares



\*  $p < 0.05$  vs Long Evans y Lean (Derecho)

^  $p < 0.05$  vs Long Evans y Lean (Izquierdo)

	CAPACITANCIA CELULAR (pF)														
	LE (A)				LEAN (B)				ZDF (C)						
	n	N	MEDIA	E.E.	A vs B	n	N	MEDIA	E.E.	B vs C	n	N	MEDIA	E.E.	C vs A
ENDOCARDIO DERECHO	51	12	84.90	± 3.22		49	18	79.65	± 3.29	**	25	7	105.88	± 7.06	*
ENDOCARDIO IZQUIERDO	20	9	83.46	± 5.31		20	9	92.35	± 6.40	*	18	7	112.57	± 8.34	*

Capacitancia de los cardiomiocitos del endocardio derecho e izquierdo de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF. Se incluyen los tamaños de muestras, medias obtenidas, errores estándar y significancia del valor de p de acuerdo a la prueba de Tukey; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$

## Apéndice IX Tablas de análisis del potencial de acción, endocardio derecho a 2, 3 y 4 Hz

ENDOCARDIO DERECHO Frecuencia: 2Hz	Long Evans (A) n=25, N=6			Lean (B) n=25, N=11			ZDF (C) n=16, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.98 ± 0.69			-80.44 ± 0.58		***	-77.60 ± 0.88		***
Amplitud al pico (mV)	118.04 ± 2.11		***	125.37 ± 1.53		*	122.31 ± 2.56		**
Sobretiro (mV)	38.06 ± 2.01		***	44.94 ± 1.19			44.70 ± 1.91		***
Tiempo al pico (ms)	2.62 ± 0.34		***	1.81 ± 0.25			1.57 ± 0.18		***
DPA 10% (ms)	3.33 ± 1.16		***	1.28 ± 0.14		**	2.90 ± 1.13		
DPA 20% (ms)	8.77 ± 2.00		***	5.72 ± 0.75			7.62 ± 1.99		
DPA 30% (ms)	16.35 ± 2.25		**	12.59 ± 1.42			13.69 ± 2.68		
DPA 50% (ms)	27.19 ± 2.72		***	21.71 ± 2.20			24.87 ± 3.94		
DPA 60% (ms)	32.00 ± 2.94		***	25.73 ± 2.57			31.10 ± 4.73		
DPA 90% (ms)	47.95 ± 3.42		***	39.63 ± 3.49		***	50.88 ± 6.52		

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

ENDOCARDIO DERECHO Frecuencia: 3Hz	Long Evans (A) n=25, N=6			Lean (B) n=25, N=11			ZDF (C) n=16, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.69 ± 0.77			-79.96 ± 0.61		***	-77.18 ± 0.87		***
Amplitud al pico (mV)	118.01 ± 2.14		***	124.86 ± 1.54			122.03 ± 2.59		**
Sobretiro (mV)	38.31 ± 2.02		***	44.90 ± 1.25			44.84 ± 1.93		***
Tiempo al pico (ms)	2.71 ± 0.50		***	1.66 ± 0.26			1.74 ± 0.25		***
DPA 10% (ms)	3.56 ± 1.12		***	1.51 ± 0.18		**	2.98 ± 1.11		
DPA 20% (ms)	9.19 ± 2.02		*	6.25 ± 0.77			7.99 ± 2.01		
DPA 30% (ms)	16.82 ± 2.28			13.49 ± 1.42			14.42 ± 2.75		
DPA 50% (ms)	28.21 ± 2.74			23.32 ± 2.25			26.51 ± 3.98		
DPA 60% (ms)	33.22 ± 2.94			27.70 ± 2.67		*	33.19 ± 4.73		
DPA 90% (ms)	49.13 ± 3.42			42.23 ± 3.65		***	53.36 ± 6.42		

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

ENDOCARDIO DERECHO Frecuencia: 4Hz	Long Evans (A) n=25, N=6			Lean (B) n=23, N=11			ZDF (C) n=14, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.24 ± 0.83			-80.16 ± 0.63		***	-76.91 ± 1.05		***
Amplitud al pico (mV)	118.05 ± 1.96		***	123.18 ± 1.56		**	122.06 ± 2.57		*
Sobretiro (mV)	38.51 ± 2.00		***	45.34 ± 1.21			44.21 ± 1.94		***
Tiempo al pico (ms)	2.57 ± 0.41		***	1.40 ± 0.27			1.89 ± 0.33		
DPA 10% (ms)	3.53 ± 1.05		***	1.59 ± 0.20		**	3.68 ± 1.37		
DPA 20% (ms)	9.25 ± 1.95		***	6.44 ± 0.78		*	9.27 ± 2.26		
DPA 30% (ms)	16.94 ± 2.25		*	13.88 ± 1.38			16.57 ± 2.88		
DPA 50% (ms)	28.60 ± 2.68		**	23.98 ± 2.16		***	30.54 ± 4.17		
DPA 60% (ms)	33.73 ± 2.89		**	28.38 ± 2.55		***	37.88 ± 5.03		
DPA 90% (ms)	49.73 ± 3.34		**	42.88 ± 3.51		***	58.13 ± 6.82		**

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

## Apéndice X Tablas de análisis del potencial de acción, endocardio izquierdo a 2, 3 y 4 Hz

ENDOCARDIO IZQUIERDO Frecuencia: 2Hz	Long Evans (A) n=12, N=8			Lean (B) n=11, N=7			ZDF (C) n=12, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-80.00 ± 0.71			-79.40 ± 1.06			-80.07 ± 0.77		
Amplitud al pico (mV)	126.55 ± 1.52			128.03 ± 1.55			128.43 ± 0.81		*
Sobretiro (mV)	46.55 ± 1.85			48.63 ± 1.85			48.37 ± 0.95		
Tiempo al pico (ms)	2.13 ± 0.32			1.68 ± 0.44		***	2.73 ± 0.52		*
DPA 10% (ms)	4.28 ± 1.13			2.90 ± 0.83		**	4.92 ± 1.32		
DPA 20% (ms)	14.39 ± 2.73			11.51 ± 2.46		***	18.15 ± 3.61		
DPA 30% (ms)	23.45 ± 3.62			20.11 ± 3.20		***	30.74 ± 5.09		**
DPA 50% (ms)	35.53 ± 4.48			30.64 ± 4.19		***	49.01 ± 6.00		***
DPA 60% (ms)	40.96 ± 4.87			34.87 ± 4.70		***	57.46 ± 6.36		***
DPA 90% (ms)	57.46 ± 5.71		*	47.66 ± 5.72		***	84.09 ± 6.77		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

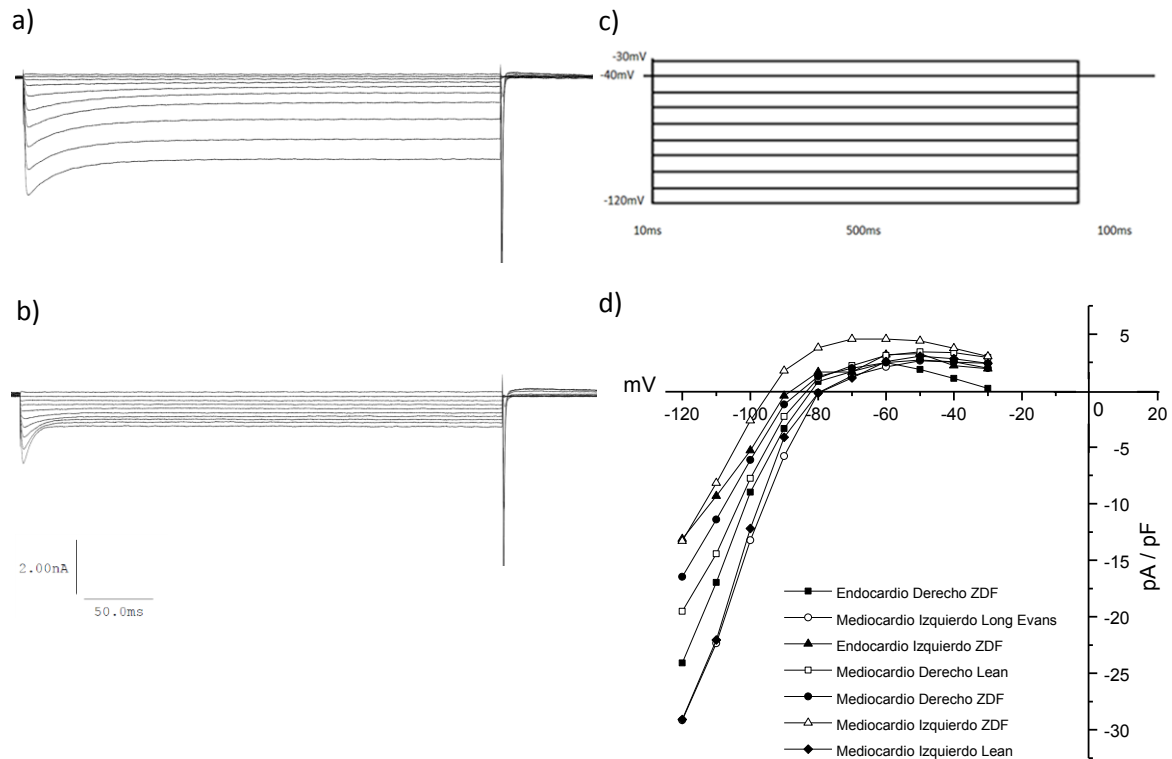
ENDOCARDIO IZQUIERDO Frecuencia: 3Hz	Long Evans (A) n=12, N=8			Lean (B) n=11, N=7			ZDF (C) n=12, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-79.93 ± 0.63			-80.11 ± 1.18			-80.01 ± 0.87		
Amplitud al pico (mV)	126.07 ± 1.57		*	128.06 ± 1.20			128.43 ± 0.81		**
Sobretiro (mV)	46.14 ± 1.72			47.95 ± 1.65			48.42 ± 0.88		*
Tiempo al pico (ms)	2.12 ± 0.42		*	1.50 ± 0.21		***	2.47 ± 0.40		
DPA 10% (ms)	4.51 ± 1.16			3.32 ± 0.78		*	4.78 ± 1.16		
DPA 20% (ms)	14.74 ± 2.67			12.55 ± 2.48		**	18.51 ± 3.52		
DPA 30% (ms)	24.03 ± 3.52			21.79 ± 3.25		***	31.22 ± 5.12		**
DPA 50% (ms)	36.54 ± 4.46			33.03 ± 4.29		***	50.08 ± 6.12		***
DPA 60% (ms)	42.17 ± 4.92			37.51 ± 4.82		***	58.98 ± 6.50		***
DPA 90% (ms)	58.54 ± 5.79			50.37 ± 5.78		***	85.54 ± 7.06		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

ENDOCARDIO IZQUIERDO Frecuencia: 4Hz	Long Evans (A) n=12, N=8			Lean (B) n=11, N=7			ZDF (C) n=12, N=6		
	Media	E.E	A vs B	Media	E.E	B vs C	Media	E.E	C vs A
PMD (mV)	-78.86 ± 0.91			-79.87 ± 1.16			-79.79 ± 0.91		
Amplitud al pico (mV)	124.97 ± 1.75		**	128.24 ± 1.19			128.08 ± 0.77		*
Sobretiro (mV)	46.10 ± 1.83			48.37 ± 1.65			48.29 ± 0.82		
Tiempo al pico (ms)	1.96 ± 0.33		***	1.36 ± 0.23		***	2.41 ± 0.34		
DPA 10% (ms)	5.10 ± 1.35			3.80 ± 0.85			5.15 ± 1.29		
DPA 20% (ms)	15.04 ± 2.74			14.17 ± 2.48		*	18.60 ± 3.56		*
DPA 30% (ms)	24.60 ± 3.44			24.05 ± 3.23		*	31.23 ± 5.14		**
DPA 50% (ms)	37.77 ± 4.37			35.80 ± 4.32		***	49.86 ± 6.18		***
DPA 60% (ms)	43.59 ± 4.81			40.51 ± 4.85		***	58.78 ± 6.49		***
DPA 90% (ms)	59.81 ± 5.69			53.62 ± 5.78		***	85.29 ± 6.91		***

\*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$

## Apéndice XI Registro de la corriente $I_{K1}$ en presencia de $BaCl_2$



Registro de la corriente  $I_{K1}$  en presencia de  $BaCl_2$ . Como ejemplo, se muestra en **a)** un registro con solución extracelular baja en calcio (Ca-Co) obtenido con el protocolo mostrado en **c)**. En **b)** se observa el registro obtenido con el mismo protocolo utilizando la solución Ca-Co bajo adicionada con  $BaCl_2$   $50 \mu M$  con el fin de bloquear la corriente  $I_{K1}$ . En **d)** se muestran la curva I/V de la corriente sensible a  $BaCl_2$ , es decir corriente  $I_{K1}$ , la cual fue obtenida al calcular la diferencia entre las corrientes en ausencia y presencia de  $ClBa_2$  en cardiomiocitos de diferentes regiones ventriculares en las ratas Long Evans, Lean y ZDF.

# ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Corazón
- Figura 2 Diagrama esquemático del sistema de conducción del corazón
- Figura 3 Fases del potencial de acción y las corrientes iónicas asociadas
- Figura 4 Actividad eléctrica en el miocardio.
- Figura 5 Protocolos de estimulación usados para evocar los potenciales de acción
- Figura 6 Representación de protocolos para registro de  $I_{to}$
- Figura 7 Representación de protocolo para registro de  $I_k$
- Figura 8 Representación de protocolo para registro de  $I_{K1}$
- Figura 9 Glucosa espontánea y curva de tolerancia a la glucosa en las ratas Long Evans, Lean y ZDF en las ratas Long Evans, Lean y ZDF
- Figura 10 Datos morfométricos
- Figura 11 Tejido visceral
- Figura 12 Capacitancia de los cardiomiocitos del endocardio derecho
- Figura 13 Potenciales de acción de cardiomiocitos a 1 y 5 Hz de estimulación
- Figura 14 Morfología del potencial de acción en estado estacionario del endocardio derecho
- Figura 15 Parámetros analizados en los potenciales de acción
- Figura 16 Potencial de membrana diastólico en estado estacionario del endocardio derecho
- Figura 17 Amplitud del potencial de acción en estado estacionario de los miocitos del endocardio derecho.
- Figura 18 Sobretiro del potencial de acción de los miocitos del endocardio derecho
- Figura 19 Tiempo al pico del potencial de los miocitos del endocardio derecho
- Figura 20 Duración del potencial de los cardiomiocitos del endocardio derecho.
- Figura 21 Registro de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans
- Figura 22 Recuperación de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.
- Figura 23 Registro de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF
- Figura 24 Curvas de activación e inactivación en estado estacionario de la corriente  $I_{to}$
- Figura 25 Recuperación de la inactivación de la corriente  $I_{to}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF
- Figura 26 Registro de la corriente  $I_k$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans.
- Figura 27 Registro de la corriente  $I_k$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF
- Figura 28 Registro de la corriente  $I_{K1}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans
- Figura 29 Registro de la corriente  $I_{K1}$  en miocitos del ventrículo derecho de las ratas Long Evans, Lean y ZDF
- Figura 30 Capacitancia de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo
- Figura 31 Morfología del potencial de acción en estado estacionario del endocardio izquierdo
- Figura 32 Potencial de membrana diastólico en estado estacionario en los cardiomiocitos del endocardio izquierdo
- Figura 33 Amplitud del potencial de acción en estado estacionario de los cardiomiocitos del endocardio izquierdo
- Figura 34 Duración del potencial en estado estacionario de los cardiomiocitos obtenidos del endocardio izquierdo de las condiciones Long Evans, Lean y ZDF.

# BIBLIOGRAFÍA

- ADA (2014). "American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus." Diabetes Care **37**(January): S81-S90.
- ADA (2015). "American Diabetes Association. Classification and Diagnosis of Diabetes." Diabetes Care **38**(Supplement 1): S8-S16.
- Adachi, T., N. Kikuchi, et al. (2007). "Fibre type distribution and gene expression levels of both succinate dehydrogenase and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha of fibres in the soleus muscle of Zucker diabetic fatty rats." Exp Physiol **92**(2): 449-455.
- Anderson, E. J., A. P. Kypson, et al. (2009). "Substrate-specific derangements in mitochondrial metabolism and redox balance in the atrium of the type 2 diabetic human heart." J Am Coll Cardiol **54**(20): 1891-1898.
- Antzelevitch, C. and J. Fish (2001). "Electrical heterogeneity within the ventricular wall." Basic Res Cardiol **96**(6): 517-527.
- Anumonwo, J. M. and A. N. Lopatin (2010). "Cardiac strong inward rectifier potassium channels." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 45-54.
- Arechiga-Figueroa, I. A., M. Rodriguez-Martinez, et al. (2010). "Multiple effects of 4-aminopyridine on feline and rabbit sinoatrial node myocytes and multicellular preparations." Pflugers Arch **459**(3): 345-355.
- Arias-Diaz, J. and J. Balibrea (2007). "[Animal models in glucose intolerance and type-2 diabetes]." Nutr Hosp **22**(2): 160-168.
- Arumugan, S. K., V Thandavarayan, R Pitchaimani, V Sone, H. and K. Watanabe (2013). "Diabetes Oxidative Stress and Dietary Antioxidants." Academic Press Diabetic Cardiomyopathy and Oxidative Stress: 25-32.
- Aziz, E. F., M. Kukin, et al. (2010). "Right ventricular dysfunction is a strong predictor of developing atrial fibrillation in acutely decompensated heart failure patients, ACAP-HF data analysis." J Card Fail **16**(10): 827-834.
- Balkau, B., X. Jouven, et al. (1999). "Diabetes as a risk factor for sudden death." Lancet **354**(9194): 1968-1969.
- Barthelemy, O., S. Jacqueminet, et al. (2008). "Intensive cardiovascular risk factors therapy and prevalence of silent myocardial ischaemia in patients with type 2 diabetes." Arch Cardiovasc Dis **101**(9): 539-546.
- Bassani, R. A. (2006). "Transient outward potassium current and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the heart: beyond the action potential." Braz J Med Biol Res **39**(3): 393-403.
- Baudino, T. A., W. Carver, et al. (2006). "Cardiac fibroblasts: friend or foe?" Am J Physiol Heart Circ Physiol **291**(3): H1015-1026.
- Belke, D. D., E. A. Swanson, et al. (2004). "Decreased sarcoplasmic reticulum activity and contractility in diabetic db/db mouse heart." Diabetes **53**(12): 3201-3208.
- Bers, D. (2001). "Bers DM. Excitation-Contraction Coupling and Cardiac Contractile Force. ." Kluwer Academic Publishers 2nd Ed.
- Bidasee, K. R., Y. Zhang, et al. (2004). "Diabetes increases formation of advanced glycation end products on Sarco(endo)plasmic reticulum Ca<sup>2+</sup>-ATPase." Diabetes **53**(2): 463-473.
- Borradaile, N. M. and J. E. Schaffer (2005). "Lipotoxicity in the heart." Curr Hypertens Rep **7**(6): 412-417.
- Bowers, S. L. and T. A. Baudino (2012). "Cardiac myocyte-fibroblast interactions and the coronary vasculature." J Cardiovasc Transl Res **5**(6): 783-793.

- Bugger, H. and C. Bode (2014). "The vulnerable myocardium. Diabetic cardiomyopathy." Hamostaseologie **35**(1).
- Casis, O., M. Gallego, et al. (2000). "Effects of diabetic cardiomyopathy on regional electrophysiologic characteristics of rat ventricle." Diabetologia **43**(1): 101-109.
- Clark, J. B., C. J. Palmer, et al. (1983). "The diabetic Zucker fatty rat." Proc Soc Exp Biol Med **173**(1): 68-75.
- Clemente, D., T. Pereira, et al. (2012). "Ventricular repolarization in diabetic patients: characterization and clinical implications." Arq Bras Cardiol **99**(5): 1015-1022.
- Clerk, L. H., M. A. Vincent, et al. (2007). "Skeletal muscle capillary responses to insulin are abnormal in late-stage diabetes and are restored by angiotensin-converting enzyme inhibition." Am J Physiol Endocrinol Metab **293**(6): E1804-1809.
- Coimbra, T. M., U. Janssen, et al. (2000). "Early events leading to renal injury in obese Zucker (fatty) rats with type II diabetes." Kidney Int **57**(1): 167-182.
- Concha, S., J. L. Samuel, et al. (2000). "Extracellular matrix and growth factors during heart growth." Heart Fail Rev **5**(2): 119-130.
- Curtis, M. W. and B. Russell (2011). "Micromechanical regulation in cardiac myocytes and fibroblasts: implications for tissue remodeling." Pflugers Arch **462**(1): 105-117.
- Charpentier, F., J. Merot, et al. (2010). "Delayed rectifier K(+) currents and cardiac repolarization." J Mol Cell Cardiol **48**(1): 37-44.
- Christensen, P. K., M. A. Gall, et al. (2000). "QTc interval length and QT dispersion as predictors of mortality in patients with non-insulin-dependent diabetes." Scand J Clin Lab Invest **60**(4): 323-332.
- Chua, S. C., Jr., W. K. Chung, et al. (1996). "Phenotypes of mouse diabetes and rat fatty due to mutations in the OB (leptin) receptor." Science **271**(5251): 994-996.
- Daniels, A., D. Linz, et al. (2012). "Long-term severe diabetes only leads to mild cardiac diastolic dysfunction in Zucker diabetic fatty rats." Eur J Heart Fail **14**(2): 193-201.
- Danis, R. P. and Y. Yang (1993). "Microvascular retinopathy in the Zucker diabetic fatty rat." Invest Ophthalmol Vis Sci **34**(7): 2367-2371.
- Davì, G., F. Santilli, et al. (2012). "Diabetes Mellitus." Platelets Academic Press 3ed: 711-732.
- Dawson, A., A. D. Morris, et al. (2005). "The epidemiology of left ventricular hypertrophy in type 2 diabetes mellitus." Diabetologia **48**(10): 1971-1979.
- de las Fuentes, L., A. D. Waggoner, et al. (2005). "Plasma triglyceride level is an independent predictor of altered left ventricular relaxation." J Am Soc Echocardiogr **18**(12): 1285-1291.
- de los Nietos, C. (2007). "Nociones básicas de anatomía, fisiología y patología cardíaca: bradiarritmias y taquiarritmias." Enfermería en Cardiología(40): 7-20.
- de Simone, G., R. B. Devereux, et al. (2010). "Diabetes and incident heart failure in hypertensive and normotensive participants of the Strong Heart Study." J Hypertens **28**(2): 353-360.
- de Souza, R. R. (2002). "Aging of myocardial collagen." Biogerontology **3**(6): 325-335.
- Delaunay, F., A. Khan, et al. (1997). "Pancreatic beta cells are important targets for the diabetogenic effects of glucocorticoids." J Clin Invest **100**(8): 2094-2098.
- Diamant, M., H. J. Lamb, et al. (2005). "Diabetic cardiomyopathy in uncomplicated type 2 diabetes is associated with the metabolic syndrome and systemic inflammation." Diabetologia **48**(8): 1669-1670.
- Ding, F., L. Yu, et al. (2013). "O-GlcNAcylation involvement in high glucose-induced cardiac hypertrophy via ERK1/2 and cyclin D2." Amino Acids **45**(2): 339-349.
- Dixon, J. E., W. Shi, et al. (1996). "Role of the Kv4.3 K+ channel in ventricular muscle. A molecular correlate for the transient outward current." Circ Res **79**(4): 659-668.

- Dobrzynski, H., R. Anderson, et al. (2013). "Structure, function and clinical relevance of the cardiac conduction system, including the atrioventricular ring and outflow tract tissues. ." Pharmacology&Therapeutics **139**: 260-288.
- Elbein, S., K. Chiu, et al. (2002). "Type 2 Diabetes Mellitus." In The Genetic Basis of Common Diseases, 2nd ed.Oxford University Press, Inc.: 457-480.
- ENSANUT (2012). "Encuesta Nacional de Salud y Nutrición Resultados Nacionales 2012." Instituto Nacional de Salud Pública.
- Fagher, K., A. Nilsson, et al. (2014). "Heart rate-corrected QT interval prolongation as a prognostic marker for 3-year survival in people with Type 2 diabetes undergoing above-ankle amputation." Diabet Med.
- Fang, Z. Y., J. B. Prins, et al. (2004). "Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications." Endocr Rev **25**(4): 543-567.
- Finck, B. N., X. Han, et al. (2003). "A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(3): 1226-1231.
- Fredersdorf, S., C. Thumann, et al. (2004). "Myocardial hypertrophy and enhanced left ventricular contractility in Zucker diabetic fatty rats." Cardiovasc Pathol **13**(1): 11-19.
- Friedman, J. E., J. E. de Vente, et al. (1991). "Altered expression of muscle glucose transporter GLUT-4 in diabetic fatty Zucker rats (ZDF/Drt-fa)." Am J Physiol **261**(6 Pt 1): E782-788.
- From, A. M., C. L. Leibson, et al. (2006). "Diabetes in heart failure: prevalence and impact on outcome in the population." Am J Med **119**(7): 591-599.
- Frustaci, A., J. Kajstura, et al. (2000). "Myocardial cell death in human diabetes." Circ Res **87**(12): 1123-1132.
- Fuster, V. W., RA and R. Harrington (2011). "Hurst's the Heart." Mc-Graw-Hill Medical **13e**.
- Gaikwad, A. B., S. G. Sayyed, et al. (2010). "Renal failure increases cardiac histone h3 acetylation, dimethylation, and phosphorylation and the induction of cardiomyopathy-related genes in type 2 diabetes." Am J Pathol **176**(3): 1079-1083.
- Giunti, S., G. Gruden, et al. (2012). "Increased QT interval dispersion predicts 15-year cardiovascular mortality in type 2 diabetic subjects: the population-based Casale Monferrato Study." Diabetes Care **35**(3): 581-583.
- Goldsmith, E. C. and T. K. Borg (2002). "The dynamic interaction of the extracellular matrix in cardiac remodeling." J Card Fail **8**(6 Suppl): S314-318.
- Guariguata, L., D. R. Whiting, et al. (2014). "Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035." Diabetes Res Clin Pract **103**(2): 137-149.
- Guyton and J. Hall (2011). "Tratado de fisiología médica." Elsevier Health Sciences **12e**.
- Han, S. S., G. Wang, et al. (2015). "Investigating the Mechanism of Hyperglycemia-Induced Fetal Cardiac Hypertrophy." PLoS One **10**(9): e0139141.
- Hardie, L. J., D. V. Rayner, et al. (1996). "Circulating leptin levels are modulated by fasting, cold exposure and insulin administration in lean but not Zucker (fa/fa) rats as measured by ELISA." Biochem Biophys Res Commun **223**(3): 660-665.
- Hayat, S. A., B. Patel, et al. (2004). "Diabetic cardiomyopathy: mechanisms, diagnosis and treatment." Clin Sci (Lond) **107**(6): 539-557.
- Holubarsch, C., R. P. Goulette, et al. (1985). "The economy of isometric force development, myosin isoenzyme pattern and myofibrillar ATPase activity in normal and hypothyroid rat myocardium." Circ Res **56**(1): 78-86.
- Huang, T. H., L. He, et al. (2008). "Salacia oblonga root decreases cardiac hypertrophy in Zucker diabetic fatty rats: inhibition of cardiac expression of angiotensin II type 1 receptor." Diabetes Obes Metab **10**(7): 574-585.

- Ishii, K., T. Yamagishi, et al. (1994). "Cloning and functional expression of a cardiac inward rectifier K<sup>+</sup> channel." FEBS Lett **338**(1): 107-111.
- Ishikawa, Y., M. N. Saito, et al. (1998). "Actions of the novel oral antidiabetic agent HQL-975 in insulin-resistant non-insulin-dependent diabetes mellitus model animals." Diabetes Res Clin Pract **41**(2): 101-111.
- Jiang, G. and B. B. Zhang (2003). "Glucagon and regulation of glucose metabolism." Am J Physiol Endocrinol Metab **284**(4): E671-678.
- Johnson, P. R., L. M. Zucker, et al. (1971). "Cellularity of adipose depots in the genetically obese Zucker rat." J Lipid Res **12**(6): 706-714.
- Joost, H., H. Al-Hasani, et al. (2012). "Animal Models in Diabetes Research." Humana Press: 103-124.
- Kanno, S. and J. E. Saffitz (2001). "The role of myocardial gap junctions in electrical conduction and arrhythmogenesis." Cardiovasc Pathol **10**(4): 169-177.
- Kasiske, B. L., M. P. O'Donnell, et al. (1992). "The Zucker rat model of obesity, insulin resistance, hyperlipidemia, and renal injury." Hypertension **19**(1 Suppl): I110-115.
- Katsuda, Y., T. Ohta, et al. (2014). "Diabetic complications in obese type 2 diabetic rat models." Exp Anim **63**(2): 121-132.
- Kava, R., M. Greenwood, et al. (1990). "Zucker (fa/fa) Rat." IJAR Journal **32**(3): 4-8.
- Kava, R., M. Greenwood, et al. (1990). "Zucker (fa/fa) Rat." IJAR Journal **32**(3): 4-8.
- King, S. L. and K. M. Hegadoren (2002). "Stress hormones: how do they measure up?" Biol Res Nurs **4**(2): 92-103.
- Kleber, A. G. and Y. Rudy (2004). "Basic mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias." Physiol Rev **84**(2): 431-488.
- Korzick, D. H. (2003). "Regulation of cardiac excitation-contraction coupling: a cellular update." Adv Physiol Educ **27**(1-4): 192-200.
- Kosmala, W., P. Colonna, et al. (2004). "Right ventricular dysfunction in asymptomatic diabetic patients." Diabetes Care **27**(11): 2736-2738.
- Kubo, Y., J. P. Adelman, et al. (2005). "International Union of Pharmacology. LIV. Nomenclature and molecular relationships of inwardly rectifying potassium channels." Pharmacol Rev **57**(4): 509-526.
- Kumar, R., M. Fisher, et al. (2004). "Diabetes and the QT interval: time for debate." British Journal of Diabetes & Vascular Disease **4**(3): 146-150.
- Lash, J. M., W. M. Sherman, et al. (1989). "Capillary basement membrane thickness and capillary density in sedentary and trained obese Zucker rats." Diabetes **38**(7): 854-860.
- Latarjet, M. and A. Ruiz (2004). "Anatomia Humana Volumen 2." Ed. Médica Panamereicana(4a Edición).
- Latterman, D. (1989). "Insulin sensitivity is decreased in vitro in the obese Zucker rat brain." Appetite **12**(3): 221.
- Lee, K. T., P. W. Tang, et al. (2013). "Differential effects of central and peripheral fat tissues on the delayed rectifier K<sup>+</sup> outward currents in cardiac myocytes." Cardiology **125**(2): 118-124.
- Lengyel, C., L. Virag, et al. (2007). "Diabetes mellitus attenuates the repolarization reserve in mammalian heart." Cardiovasc Res **73**(3): 512-520.
- Levitt Katz, L., S. S. Gidding, et al. (2015). "Alterations in left ventricular, left atrial, and right ventricular structure and function to cardiovascular risk factors in adolescents with type 2 diabetes participating in the TODAY clinical trial." Pediatr Diabetes **16**(1): 39-47.
- Lines, G. T., J. B. Sande, et al. (2006). "Contribution of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger to rapid Ca<sup>2+</sup> release in cardiomyocytes." Biophys J **91**(3): 779-792.

- Liu, Z., J. Aronson, et al. (2007). "A novel rat model for the study of deficits in bone formation in type-2 diabetes." Acta Orthop **78**(1): 46-55.
- Lopez-Soldado, I., K. Niisuke, et al. (2015). "Neuregulin improves response to glucose tolerance test in control and diabetic rats." Am J Physiol Endocrinol Metab: ajpendo 00226 02015.
- Louch, W. E., H. K. Mork, et al. (2006). "T-tubule disorganization and reduced synchrony of Ca<sup>2+</sup> release in murine cardiomyocytes following myocardial infarction." J Physiol **574**(Pt 2): 519-533.
- Mangoni, M. E. and J. Nargeot (2008). "Genesis and regulation of the heart automaticity." Physiol Rev **88**(3): 919-982.
- Mann, D. L. (2002). "Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling." J Card Fail **8**(6 Suppl): S379-386.
- Miake, J., E. Marban, et al. (2003). "Functional role of inward rectifier current in heart probed by Kir2.1 overexpression and dominant-negative suppression." J Clin Invest **111**(10): 1529-1536.
- Miki, T., T. Tobisawa, et al. (2014). "Does glycemic control reverse dispersion of ventricular repolarization in type 2 diabetes?" Cardiovasc Diabetol **13**: 125.
- Monfredi, O., H. Dobrzynski, et al. (2010). "The anatomy and physiology of the sinoatrial node--a contemporary review." Pacing Clin Electrophysiol **33**(11): 1392-1406.
- Movahed, M. R., M. Hashemzadeh, et al. (2007). "Increased prevalence of ventricular fibrillation in patients with type 2 diabetes mellitus." Heart Vessels **22**(4): 251-253.
- Muir, A. R. (1967). "The effects of divalent cations on the ultrastructure of the perfused rat heart." J Anat **101**(Pt 2): 239-261.
- Nagashima, M., N. Tohse, et al. (2001). "Alternation of inwardly rectifying background K<sup>+</sup> channel during development of rat fetal cardiomyocytes." J Mol Cell Cardiol **33**(3): 533-543.
- Nerbonne, J. M. (2000). "Molecular basis of functional voltage-gated K<sup>+</sup> channel diversity in the mammalian myocardium." J Physiol **525 Pt 2**: 285-298.
- Nerbonne, J. M. and W. Guo (2002). "Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias." J Cardiovasc Electrophysiol **13**(4): 406-409.
- Nerbonne, J. M. and R. S. Kass (2005). "Molecular physiology of cardiac repolarization." Physiol Rev **85**(4): 1205-1253.
- Norton, G. R., G. Candy, et al. (1996). "Aminoguanidine prevents the decreased myocardial compliance produced by streptozotocin-induced diabetes mellitus in rats." Circulation **93**(10): 1905-1912.
- Nworah, D. C., C. P. Chike, et al. (2011). "Prevalence of left ventricular hypertrophy in hypertensive and normotensive type 2 diabetic females in Port Harcourt." Niger J Physiol Sci **26**(1): 7-10.
- Oltman, C. L., L. J. Coppey, et al. (2005). "Progression of vascular and neural dysfunction in sciatic nerves of Zucker diabetic fatty and Zucker rats." Am J Physiol Endocrinol Metab **289**(1): E113-122.
- Orci, L., M. Ravazzola, et al. (1990). "Evidence that down-regulation of beta-cell glucose transporters in non-insulin-dependent diabetes may be the cause of diabetic hyperglycemia." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(24): 9953-9957.
- Panikkath, R., K. Reinier, et al. (2011). "Prolonged Tpeak-to-tend interval on the resting ECG is associated with increased risk of sudden cardiac death." Circ Arrhythm Electrophysiol **4**(4): 441-447.
- Pasek, M., J. Simurda, et al. (2006). "The functional role of cardiac T-tubules explored in a model of rat ventricular myocytes." Philos Trans A Math Phys Eng Sci **364**(1842): 1187-1206.
- Peterson, R. (2003). "The Zucker diabetic fatty (ZDF) Rat. ." Lessons from animal studies. CRC Press.

- Peterson, R. G., W. N. Shaw, et al. (1990). "Zucker Diabetic Fatty Rat as a Model for Non-insulin-dependent Diabetes Mellitus." Ijar Journal **32**(3): 16-19.
- Poornima, I. G., P. Parikh, et al. (2006). "Diabetic cardiomyopathy: the search for a unifying hypothesis." Circ Res **98**(5): 596-605.
- Raffel, L., M. Goodarzi, et al. (2013). "Diabetes Mellitus." Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics. Academic Press: 1-58.
- Raza, H., A. John, et al. (2013). "Increased metabolic stress in Zucker diabetic fatty rat kidney and pancreas." Cell Physiol Biochem **32**(6): 1610-1620.
- Rijzewijk, L. J., R. W. van der Meer, et al. (2008). "Myocardial steatosis is an independent predictor of diastolic dysfunction in type 2 diabetes mellitus." J Am Coll Cardiol **52**(22): 1793-1799.
- Roden, D. M. and T. Yang (2005). "Protecting the heart against arrhythmias: potassium current physiology and repolarization reserve." Circulation **112**(10): 1376-1378.
- Rozanski, G. J. and Z. Xu (2002). "A metabolic mechanism for cardiac K<sup>+</sup> channel remodeling." Clin Exp Pharmacol Physiol **29**(1-2): 132-137.
- Sadoshima, J. and S. Izumo (1993). "Molecular characterization of angiotensin II--induced hypertrophy of cardiac myocytes and hyperplasia of cardiac fibroblasts. Critical role of the AT1 receptor subtype." Circ Res **73**(3): 413-423.
- Scognamiglio, R., A. Avogaro, et al. (2004). "Early myocardial dysfunction in the diabetic heart: current research and clinical applications." Am J Cardiol **93**(8A): 17A-20A.
- Schafer, S., J. Huber, et al. (2006). "Impaired left ventricular relaxation in type 2 diabetic rats is related to myocardial accumulation of N(epsilon)-(carboxymethyl) lysine." Eur J Heart Fail **8**(1): 2-6.
- Sharma, S., J. V. Adrogue, et al. (2004). "Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart." FASEB J **18**(14): 1692-1700.
- Shibukawa, Y., E. L. Chilton, et al. (2005). "K<sup>+</sup> currents activated by depolarization in cardiac fibroblasts." Biophys J **88**(6): 3924-3935.
- Shimabukuro, M., Y. T. Zhou, et al. (1998). "Fatty acid-induced beta cell apoptosis: a link between obesity and diabetes." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(5): 2498-2502.
- Shimoni, Y., H. S. Ewart, et al. (1998). "Type I and II models of diabetes produce different modifications of K<sup>+</sup> currents in rat heart: role of insulin." J Physiol **507** ( Pt 2): 485-496.
- Shimoshige, Y., K. Ikuma, et al. (2000). "The effects of zenarestat, an aldose reductase inhibitor, on peripheral neuropathy in Zucker diabetic fatty rats." Metabolism **49**(11): 1395-1399.
- Singh, V. P., B. Le, et al. (2008). "Intracellular angiotensin II production in diabetic rats is correlated with cardiomyocyte apoptosis, oxidative stress, and cardiac fibrosis." Diabetes **57**(12): 3297-3306.
- Slieker, L. J., K. L. Sundell, et al. (1992). "Glucose transporter levels in tissues of spontaneously diabetic Zucker fa/fa rat (ZDF/drt) and viable yellow mouse (Avy/a)." Diabetes **41**(2): 187-193.
- Spooner, P. M. (2008). "Sudden cardiac death: influence of diabetes." Diabetes Obes Metab **10**(7): 523-532.
- Srinivasan, K. and P. Ramarao (2007). "Animal models in type 2 diabetes research: an overview." Indian J Med Res **125**(3): 451-472.
- Stamler, J., O. Vaccaro, et al. (1993). "Diabetes, other risk factors, and 12-yr cardiovascular mortality for men screened in the Multiple Risk Factor Intervention Trial." Diabetes Care **16**(2): 434-444.
- Stanley, W. C., G. D. Lopaschuk, et al. (1997). "Regulation of energy substrate metabolism in the diabetic heart." Cardiovasc Res **34**(1): 25-33.

- Stern, J., P. Johnson, et al. (1972). "Insulin resistance and pancreatic insulin release in the genetically obese Zucker rat." Proc Soc Exp Biol Med **139**: 66-69.
- Takaya, K., Y. Ogawa, et al. (1996). "Molecular cloning of rat leptin receptor isoform complementary DNAs--identification of a missense mutation in Zucker fatty (fa/fa) rats." Biochem Biophys Res Commun **225**(1): 75-83.
- Tomaselli, G. F. and E. Marban (1999). "Electrophysiological remodeling in hypertrophy and heart failure." Cardiovasc Res **42**(2): 270-283.
- Torres-Jacome, J., M. Gallego, et al. (2013). "Improvement of the metabolic status recovers cardiac potassium channel synthesis in experimental diabetes." Acta Physiol (Oxf) **207**(3): 447-459.
- Unger, R. H. (1991). "Diabetic hyperglycemia: link to impaired glucose transport in pancreatic beta cells." Science **251**(4998): 1200-1205.
- Unger, R. H. (1995). "Lipotoxicity in the pathogenesis of obesity-dependent NIDDM. Genetic and clinical implications." Diabetes **44**(8): 863-870.
- van den Brom, C. E., J. W. Bosmans, et al. (2010). "Diabetic cardiomyopathy in Zucker diabetic fatty rats: the forgotten right ventricle." Cardiovasc Diabetol **9**: 25.
- Veglio, M., G. Bruno, et al. (2002). "Prevalence of increased QT interval duration and dispersion in type 2 diabetic patients and its relationship with coronary heart disease: a population-based cohort." J Intern Med **251**(4): 317-324.
- Velloso, L. A., C. R. Carvalho, et al. (1998). "Insulin signalling in heart involves insulin receptor substrates-1 and -2, activation of phosphatidylinositol 3-kinase and the JAK 2-growth related pathway." Cardiovasc Res **40**(1): 96-102.
- Warren, M., P. K. Guha, et al. (2003). "Blockade of the inward rectifying potassium current terminates ventricular fibrillation in the guinea pig heart." J Cardiovasc Electrophysiol **14**(6): 621-631.
- Widya, R. L., R. W. van der Meer, et al. (2013). "Right ventricular involvement in diabetic cardiomyopathy." Diabetes Care **36**(2): 457-462.
- Wijekoon, E. P., B. Hall, et al. (2005). "Homocysteine metabolism in ZDF (type 2) diabetic rats." Diabetes **54**(11): 3245-3251.
- Wolska, B. M. and R. J. Solaro (1996). "Method for isolation of adult mouse cardiac myocytes for studies of contraction and microfluorimetry." Am J Physiol **271**(3 Pt 2): H1250-1255.
- Xu, H., J. E. Dixon, et al. (1996). "Developmental analysis reveals mismatches in the expression of K<sup>+</sup> channel alpha subunits and voltage-gated K<sup>+</sup> channel currents in rat ventricular myocytes." J Gen Physiol **108**(5): 405-419.
- Zucker, L. M. and H. N. Antoniades (1972). "Insulin and obesity in the Zucker genetically obese rat "fatty"." Endocrinology **90**(5): 1320-1330.
- Zucker, L. M. and T. F. Zucker (1961). "Fatty, a new mutation in the rat." J. Heredity **52**: 275-287.