



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Doctorado en Ciencias Biomédicas
Instituto de Fisiología Celular

Efectos del síndrome metabólico sobre actividad eléctrica del nodo
seno auricular de corazón de rata

Tesis que para optar por el grado de doctor en ciencias

Presenta:

Alondra Albarado Ibañez

Director de Tesis

Dra. Marcia Hiriart Urdanivia
Instituto de Fisiología Celular

Comité Tutor

Dra. Verónica Guarner Lans
Instituto Nacional de cardiología Ignacio Chávez
Dr. Stefan Mihaelescu Lucian
Facultad de Medicina UNAM

[México DF, 2015]



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos

Esta tesis se realizó en cumplimiento para obtener el grado de Doctorado de Ciencias Biomédicas de Alondra Albarado Ibañez en la Universidad Nacional Autónoma de México con apoyos a los siguientes proyectos, CONACyT CB2009-131647, DGAPA PAPIIT: IN215611 para MH, en colaboración con el donativo PIFI-VIEP2014 para JT. Además del apoyo a Conacyt por otorgarme la beca número 290541 y la beca apoyo a ayudante SNI nivel III otorgado por la Dra. Marcia Hiriart.

Agradezco el apoyo técnico de la Bióloga Carmen Sánchez soto, de Félix Sierra y de la Dra. Myrian Velasco Torres, al Bioterio por proporcionar los organismos, a las Unidades de Microscopía Histología y Cómputo del Instituto de Fisiología Celular, UNAM.

DEDICATORIA

Dedico este trabajo a mi familia quienes siempre estuvieron presentes y acrecentaron la fe en mí.

A mis tutores la Dra. Marcia Hiriart y el Dr. Julián Torres, por darme su apoyo para realizar este proyecto

A mi comité tutorial la Dra. Verónica Guarner Lans, Dr. Stefan Mihaelescu Lucian, por su apoyo y aportaciones a este trabajo

A mis compañeros y amigos de trabajo del laboratorio tanto de Fisiopatología Cardiovascular como el de Neurodesarrollo y Fisiología que hicieron mi estancia de trabajo leve, divertida y maravillosa.

A los colaboradores administrativos y académicos del Instituto de Fisiología y Fisiología celular por su apoyo en esta etapa de vida además por enseñarme a disfrutar cada momento de ella.

A todos mis amigos que a pesar del tiempo y la distancia siguen siendo mis hermanos

A todos mis profesores que me dedicaron un poco de su tiempo además de compartir lo más valioso de ellos, su conocimiento

INDICE

<u>AGRADECIMIENTOS</u>	2
<u>ABREVIATURAS</u>	6
<u>RESUMEN</u>	7
<u>ABSTRACT</u>	8
<u>INTRODUCCIÓN</u>	9
<u>SISTEMA CARDIOVASCULAR</u>	9
ACOPLAMIENTO ENTRE LA EXCITACIÓN Y LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO CARDÍACO	9
RITMO CARDIACO	9
ELECTROCARDIOGRAMA	10
DIVERSIDAD DE LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN EL TEJIDO CARDÍACO	12
ACTIVIDAD ELÉCTRICA O POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO	12
LA MORFOLOGÍA DEL PA ES DEPENDIENTE DEL TIPO Y LA DENSIDAD DE CANALES IÓNICOS:	13
CANALES QUE PARTICIPAN EN LA MORFOLOGÍA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN MARCAPASO	13
NODO SENO AURICULAR DE RATA	13
DEFINICIÓN DE SÍNDROME METABÓLICO	15
DIAGNÓSTICO DEL SÍNDROME METABÓLICO	15
FACTORES DEL SM QUE INCREMENTAN EL RIESGO A PADECER ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES	16
MODELOS ANIMALES CON SÍNDROME METABÓLICO	17
<u>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</u>	18
<u>HIPÓTESIS</u>	19
<u>OBJETIVO GENERAL</u>	19
<u>OBJETIVOS PARTICULARES</u>	19
<u>MATERIALES Y MÉTODOS</u>	20
MODELO ANIMAL	20
ALTERACIONES QUE PRODUCE EL SÍNDROME METABÓLICO EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN EL ANIMAL COMPLETO	20
ELECTROCARDIOGRAMA	20
VARIABILIDAD EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL CORAZÓN	20
ALTERACIONES QUE PRODUCE EL SÍNDROME METABÓLICO EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN EL TEJIDO NODAL	20
DISECCIÓN DEL NODO SENO AURICULAR EN RATA WISTAR	20
REGISTRO MULTICELULAR DEL POTENCIAL DE ACCIÓN	21
INMUNOHISTOQUÍMICA DE HIDROXILASA DE TIROSINA (TH)	21
TINCIÓN DE LÍPIDOS EN EL NODO SENO AURICULAR	21
TINCIÓN PARA COLÁGENO EN EL NODO SENO AURICULAR	21
ALTERACIONES QUE PRODUCE EL SÍNDROME METABÓLICO EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN CÉLULA ÚNICA	22
REGISTRO DE CORRIENTES DE LOS POTENCIALES DE ACCIÓN DEL NODO SENO AURICULAR	22
<u>ANÁLISIS ESTADÍSTICO</u>	22
<u>RESULTADOS</u>	23
RATAS CON 8 SEMANAS DE TRATAMIENTO	23
MODELO ANIMAL	23
MEDICIONES MORFOMÉTRICAS	23
PARÁMETROS BIOQUÍMICOS	23
CURVA DE TOLERANCIA A LA GLUCOSA	24
CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN EL CORAZÓN EN EL ANIMAL INTEGRO	24
ELECTROCARDIOGRAMA	24

VARIABILIDAD EN EL INTERVALO RR DEL ELECTROCARDIOGRAMA	25
ACTIVIDAD ELÉCTRICA DEL NODO SENO AURICULAR EN RATA TESTIGO	26
ALTERACIONES POR EL SÍNDROME METABÓLICO SOBRE EL POTENCIAL DE ACCIÓN DEL NODO SA	28
ALTERACIONES EN LAS CORRIENTES MARCAPASO	29
DINÁMICA DEL DISPARO DEL POTENCIAL DE ACCIÓN DEL NODO SENO AURICULAR COMPLETO DE RATA	30
CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR DEL NODO SENOAURICULAR	30
<u>MODELO ANIMAL CON 24 SEMANAS DE TRATAMIENTO</u>	<u>32</u>
MEDICIONES MORFOMÉTRICAS DEL MODELO ANIMAL CON SÍNDROME METABÓLICO	32
PARÁMETROS BIOQUÍMICAS QUE PRESENTARON LOS ANIMALES A LAS 24 SEMANAS	33
ALTERACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS EN EL MODELO DE RATA DE 24 SEMANAS	34
ELECTROCARDIOGRAMA	34
VARIABILIDAD DE RITMO CARDÍACO	35
REGISTRO MULTICELULAR DEL NODO SENO AURICULAR	36
CAMBIOS EN EL PA DE LAS CÉLULAS DEL NODO SA EN EL TEJIDO	36
CAMBIOS EN LA MATRIZ EXTRACELULAR POR EL SÍNDROME METABÓLICO	37
DINÁMICA DEL POTENCIAL DE ACCIÓN DEL NODO SENO AURICULAR	38
EL SÍNDROME METABÓLICO MODIFICA LAS CORRIENTES NODALES MARCAPASO Y LAS REPOLARIZANTES	39
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>40</u>
LA SACAROSA PRODUCE SÍNDROME METABÓLICO	40
EL SÍNDROME METABÓLICO PROVOCA ARRITMIAS CARDÍACAS	40
CAMBIOS EL RITMO SINUSAL POR EL SÍNDROME METABÓLICO	40
CAMBIOS EN LA ACTIVIDAD ELÉCTRICA EN CÉLULA ÚNICA	41
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>43</u>
<u>APÉNDICE</u>	<u>46</u>

Abreviaturas

SM	Síndrome metabólico
VLDL	Very low density lipoprotein
HDL-c	High density lipoprotein cholesterol
nodo SA	Nodo senoauricular
ECG	Electrocardiograma
PA	Potencial de acción
I_f	Corriente marcapaso
I_K	Corriente de potasio rectificadora
I_{ks}	Corriente de potasio rectificadora lenta
I_{kr}	Corriente de potasio rectificadora rápida
I_{sus}	Corriente de potasio de sostenimiento
I_{st}	Corriente de potasio sostenida
I_{to}	Corriente de potasio transitoria saliente
I_{tof}	Corriente de potasio transitoria saliente rápida
I_{toS}	Corriente de potasio transitoria saliente lenta
I_{kATP}	Corriente de potasio dependiente de ATP
I_{K1}	Corriente de potasio del rectificador anómala
I_{CaL}	Corriente de calcio lenta
Caco	Solución externa con cloruro de cobalto
TH	Hidroxilasa de tirosina

Resumen

El síndrome metabólico (SM) es un conjunto de signos que incrementa la probabilidad de desarrollar diabetes mellitus y problemas cardiovasculares. En la última década han incrementado en un porcentaje elevado de forma paralela estos padecimientos. En este trabajo se estudiaron los cambios electrofisiológicos que produce el SM sobre el nodo sinusal que explicaría el aumento de arritmias cardíacas. Se indujo el SM a ratas *Wistar* machos con sacarosa al 20 % en el agua de beber, 8 semanas fueron suficientes para que los animales desarrollaran SM y se siguió el tratamiento durante 24 semanas para observar la evolución del SM. En general, en ambos tiempos se observó que el SM produjo arritmias relacionadas con cambios en la morfología del potencial de acción del nodo senoauricular causadas por dos razones la primera aumento en las corrientes hiperpolarizantes. La segunda por cambios en la matriz extracelular. En la semana 8 el SM origino infiltración de lípidos alrededor de las células nodales y en la semana 24 se observó un aumento de colágeno e infiltración de lípidos fuera y dentro de las células.

Los cambios eléctricos y en la matriz extracelular generados por el SM aumentan la variabilidad de la frecuencia de disparo nodal y cardíaca, produciendo así un nuevo patrón de disparo que origina la bradicardia en los animales con SM. La remodelación observada en este trabajo podrían explicar las arritmias observadas en pacientes con SM.

Abstract

The Metabolic syndrome (MeS) is a cluster of the signs that increases the risk of developing cardiovascular disease and type 2 diabetes mellitus, in the last ten years, these diseases augmented parallel. In this work we study the alterations electrophysiological on sinoatrial node produced MeS them could originate cardiac arrhythmias. We induced MeS Wistar male rats with 20% sucrose in the drinking water, eight weeks of treatment were enough for the rats developed MeS and the progression of disease was followed by 24 weeks. The rats with MeS presented arrhythmias in both times these were related with changes in the activity electrical, caused by an increase in hyperpolarizing currents and alterations of the extracellular matrix.

In the eighth week the MeS produced infiltration of lipids around the nodal cells and twenty-four weeks showed an augmented the collagen and lipid. The changes mentioned above, augmented the variability in the frequency and firing action potential nodal which gave rise the bradycardia in the animals with MeS in both times. The remodeling of the nodal tissue studied in this work could explain the arrhythmias presented in the patients with MeS.

Introducción

Las enfermedades cardiovasculares (CV) son la principal causa de muerte en el mundo, en el 2008 el 30% (17.3 millones de personas) de las muertes fueron por causa de las CV y se calcula que para el 2030 esta cifra podría llegar a 23.3 millones de muertes por dichas enfermedades [1].

La mayoría de las enfermedades CV podrían prevenirse si se actúa sobre los factores de riesgo como son, la mala alimentación, la obesidad, la inactividad física, el consumo de tabaco, la diabetes mellitus, la hipertensión arterial y las dislipidemias [1].

Sistema cardiovascular

La función del sistema cardiovascular es mantener la homeostasis del sistema, este sistema está compuesto por una red elaborada de vasos sanguíneos y una bomba la cual envía sangre a todas las células del organismo a través de la red. El flujo plasmático que se distribuye a través de las células es pasivo y depende de la diferencia de presión creada por el corazón.

En los mamíferos el corazón está formado por dos bombas constituidas por una aurícula y un ventrículo. La derecha maneja una menor presión que la izquierda [2], se le conoce como circulación menor y su función es enviar la sangre no oxigenada a los pulmones. La izquierda o de circulación mayor envía la sangre oxigenada a todos los tejidos [2].

El tejido cardíaco funciona como un *sincitium*, es decir funciona como una célula que depende de la sincronización de las contracciones auriculares y ventriculares, dicha sincronización se lleva a cabo por la propagación precisa de una onda despolarizante, también conocida como potencial de acción (PA) que inicia la contracción del músculo cardíaco, este PA se origina en el nodo senoauricular [2].

Acoplamiento entre la excitación y la contracción del músculo cardíaco

El acoplamiento entre la excitación y la contracción, conocido como (AEC) se inicia con la generación de un PA, este se muestra en la figura 3. El PA de los cardiomiocitos de mamíferos consta de 5 fases, en las cuales se activan diferentes canales sensibles a voltaje. En la fase de meseta se activan los canales de calcio, la entrada del ion a través de estos canales promueven la apertura de canales de calcio del retículo sarcoplásmico (receptores de rianodina) aumentando la concentración de calcio en el espacio intracelular, que se une a la troponina C y activa la maquinaria contráctil de los cardiomiocitos [3].

Ritmo cardíaco

La secuencia de la contracción del músculo cardíaco se inicia en el nodo seno auricular (SA), el cual tiene células marcapasos que generan automáticamente PA regulares [4]. En el nodo SA la actividad eléctrica es heterogénea [5,6], la propagación del PA depende de la sincronización de la zona central hacia la periférica utilizando el acoplamiento entre los fibroblastos y la red de cardiomiocitos.

El acoplamiento del nodo SA es a través de las uniones comunicantes, las conexinas Cx-40, 43 y 45, aunque los fibroblastos juegan un papel importante en la propagación del PA de la zona central hacia la periférica [7] hasta alcanzar las aurículas, donde se propaga por las vías de conducción internodulares e interauriculares. Una rama de la vía internodular anterior recorre las aurículas y propaga la actividad eléctrica desde el nodo seno auricular hasta la aurícula izquierda la cual realiza la activación de izquierda a derecha y de arriba hacia abajo [8].

La actividad eléctrica originada en el nodo sinusal, se propaga de manera rápida (0.03 s, en el humano) y es uniforme hacia la pared auricular. En la aurícula derecha la onda despolarizante se propaga a través de los tres haces que conectan el nodo sinusal con el nodo auriculo ventricular (NAV) [8].

En el NAV, la actividad izquierda del haz de His, alcanza al septum ventricular y finalmente despolariza a la red de fibras de Purkinje, situada en la región del endocardio. La excitación atraviesa el espesor del miocardio hasta llegar a la región del epicardio, ver la figura 3 [8]. A la secuencia de eventos desde el inicio del PA en el nodo SA y la propagación descrita anteriormente, hasta la

contracción ventricular se le conoce como ritmo cardiaco normal [8,9]. A la pérdida del ritmo cardiaco se le conoce como “arritmia”.

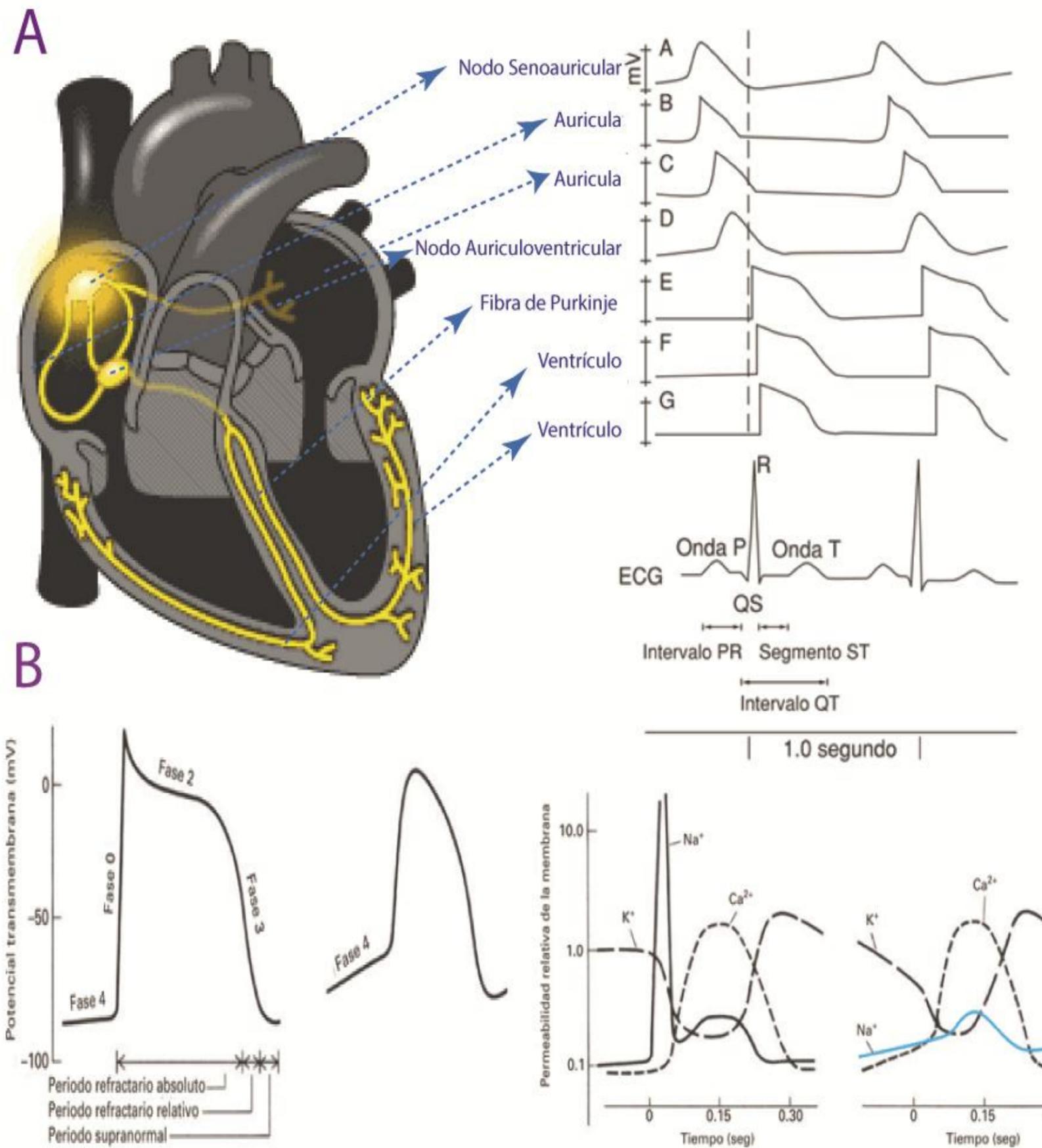


Figura 1. Actividad eléctrica del corazón. A Suma espacial y temporal de la actividad eléctrica del corazón. B Potencial de acción de trabajo y marcapaso (panel izquierdo), corrientes que participan en el PA (panel derecho), modificada de Fozzard y cols 1991.

Electrocardiograma

El electrocardiograma (ECG) es un registro gráfico de la suma espacial y temporal de los cambios de la magnitud y dirección de la actividad eléctrica, para su estudio el ECG se divide en 5 ondas, la onda P, que representa la actividad eléctrica del nodo seno

auricular despolarización y repolarización auricular (figura 1 y 2). La despolarización ventricular está registrada en el complejo QRS, la onda T describe la heterogeneidad transmural de la repolarización ventricular, la cual inicia en el epicardio y termina en el medio miocardio [10,11]. El segmento PQ representa el retraso que sufre la actividad eléctrica en el NAV, el segmento QT es la despolarización y repolarización de los ventrículos [11].

El análisis del ECG se realiza de la siguiente manera un ciclo cardíaco normal, inicia con la onda P, seguida por el complejo QRS y la onda T, el tiempo entre ondas y complejos se llaman segmentos o intervalos. Los segmentos son PR, ST y TP, los intervalos PR, QT y RR. Podemos medir al ciclo cardíaco midiendo el intervalo de la onda R a la siguiente onda R. En los roedores las ondas P, Q y R del ECG son parecidas a la de humano, pero la onda T está unida a la onda R, ya que la pared del ventrículo de rata es más delgada que la del humano así que la propagación es más rápida en todas las capas (ver figura 4).

Como se ha descrito anteriormente, la funcionalidad del corazón depende directamente de la actividad eléctrica tanto del origen como de su propagación espacial y temporal, cualquier cambio en la secuencia anterior puede generar remodelación en la actividad eléctrica¹ y muscular produciendo cambios en la variabilidad de la actividad cardíaca [12,13].

El diagrama de Poincaré, es una herramienta útil para cuantificar la dispersión de la variabilidad de la frecuencia cardíaca en el ECG. En la gráfica de Poincaré de los intervalos RR del ECG se muestra el delicado balance entre el simpático y parasimpático sobre la actividad eléctrica cardíaca [14].

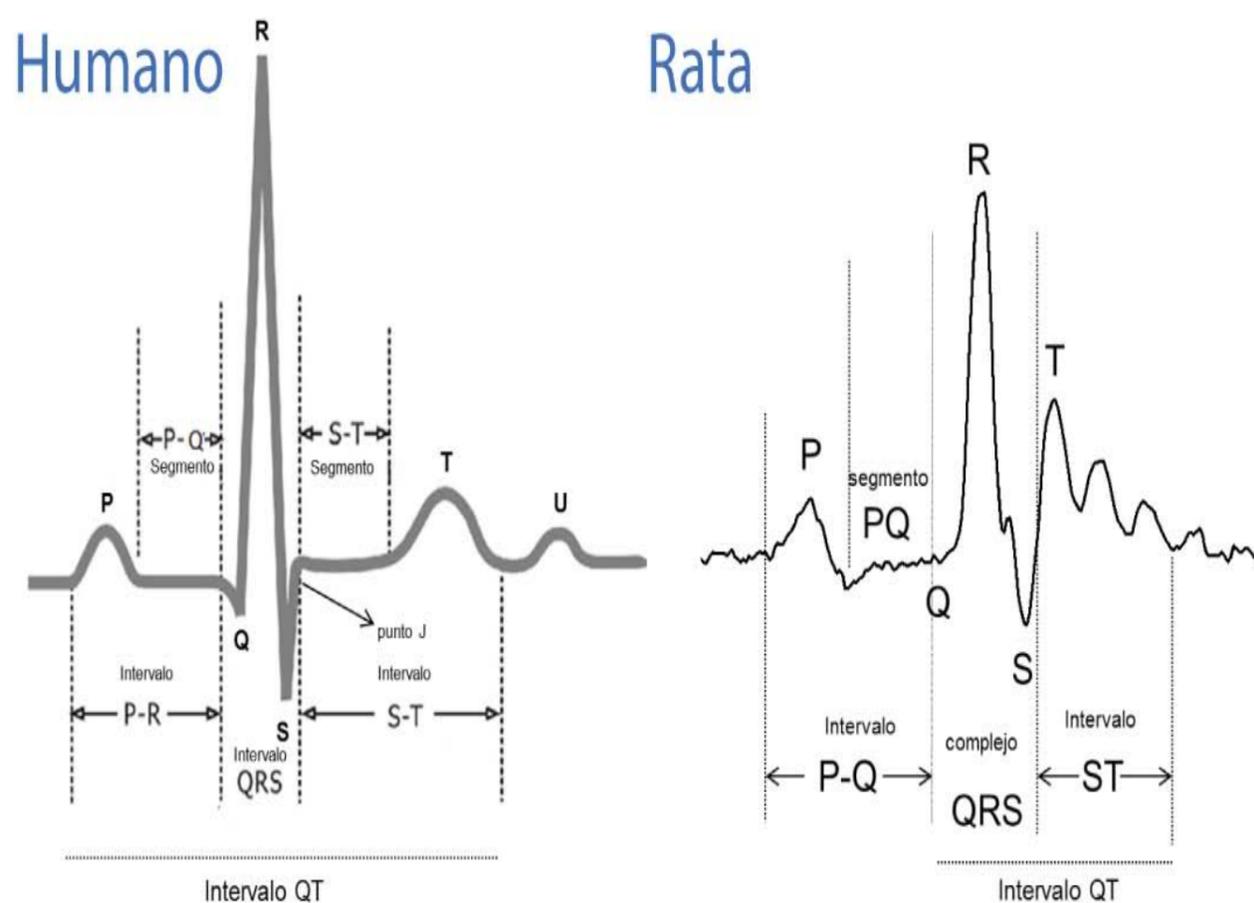


Figura 2. ECG de humano y rata. Comparaciones de las ondas, intervalos y segmentos que se observan en el ECG del humano con el ECG de rata.

Cuantificación de la variabilidad cardíaca

Utilizamos el diagrama de Poincaré ya que es una forma de cuantificar la dispersión del ritmo cardíaco, la cuantificación de esta dispersión se realizó calculando la distancia de todos los puntos del diagrama a la recta identidad cuya ecuación es $V_n = V_{n+1}$, y también se calculó la desviación estándar (SD) de estas distancias, a esta desviación se le conoce como SD1 o desviación en el

¹ La remodelación eléctrica ventricular es definida como una alteración en la duración del potencial de acción, produciendo una alteración en la secuencia de activación del PA, mientras que la remodelación auricular se produce cuando hay cambios en el inicio y morfología del PA que dan como resultado una fibrilación auricular, la fibrilación puede dar origen a otro tipo de arritmias supra ventriculares y también ventriculares.

ancho del diagrama. También se calculó la distancia de todos los puntos de la gráfica a la recta perpendicular de la recta identidad que pasa por el punto V_n medio, V_{n+1} medio. Se calculó la SD de cada uno de los puntos anteriores para determinar SD2 o desviación a lo largo del diagrama [15]. La cuantificación de la SD1 y la SD2 nos ayuda a inferir el tipo de arritmias que sufrirá el paciente de acuerdo a los cambios en el funcionamiento del simpático y del parasimpático sobre la frecuencia cardíaca [16].

Potencial de acción

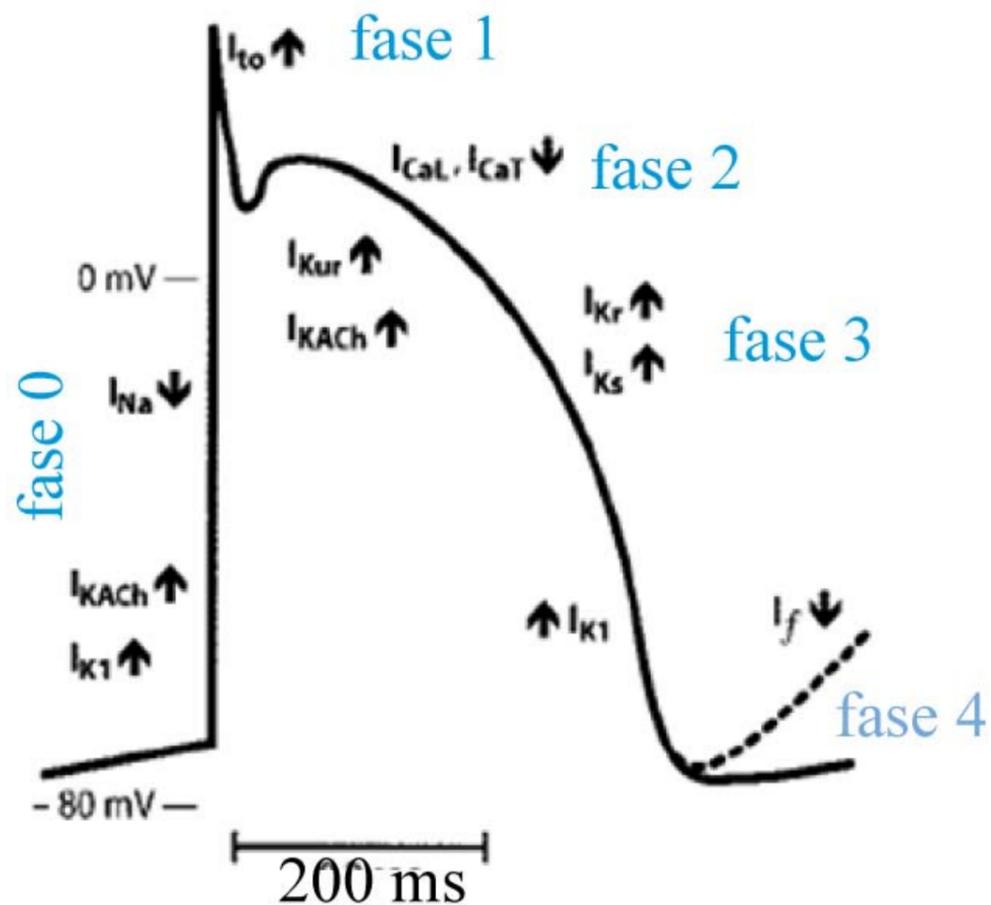


Figura 3. Potencial de acción característico del humano. El PA de células Purkinje de corazón del humano presenta las 5 fases características de los miocitos cardíacos. Modificada de Nerbonne y Kaas, 2005.

Diversidad de la actividad eléctrica en el tejido cardíaco

Actividad eléctrica o potencial de acción cardíaco

El PA ocurre a nivel de la membrana celular donde se encuentran los canales iónicos sensibles a voltaje a través de los cuales pasan los iones y producen corrientes iónicas, generando el PA (figura 1). En general se reconocen dos tipos de PA en los cardiomiocitos, los marcapasos y los de trabajo o conducción. El PA es generado por las células marcapaso y es propagado hacia las células de conducción [8,9]. Las células marcapasos están presentes en el nodo SA, en el NAV, el haz de His y en las fibras de Purkinje. El PA característico del corazón en los humanos es el de la fibra de Purkinje el cual presenta 5 fases diferentes: 1) la fase cero o llamada también de despolarización rápida, 2) La fase 1, que corresponde a la fase de repolarización temprana, 3) la fase 2 o de meseta, 4) la fase 3 o de repolarización tardía y 5) la fase 4 llamada también fase de reposo o en las células marcapaso llamada despolarización lenta diastólica, ver figuras 1 y 3 [8,9].

La morfología del PA es dependiente del tipo y la densidad de canales iónicos:

- 1) En la fase cero, participan las corrientes de sodio sensible a TTX y las corrientes de potasio como I_{ks} , la corriente de potasio lenta, la I_{KATP} corriente de potasio sensible a ATP, la I_{SS} es una corriente de sostenimiento mixta de sodio y potasio, la I_{kl} corriente de potasio rectificadora anómala, la I_{kACh} corriente de potasio dependiente de acetilcolina.
- 2) En la fase 1 participa una corriente de potasio transitoria lenta saliente por sus siglas en inglés " I_{to} ". Hay dos tipos de I_{to} de acuerdo a su cinética de activación la I_{tos} ³ y la rápida I_{tof} ⁴.
- 3) En la fase 2 participan las corrientes de calcio tipo L (lenta) o I_{caL} , la corriente de potasio rectificadora I_{Kr} y la corriente de potasio lenta I_K .
- 4) En la fase 3 participan corrientes de potasio como la I_K , la corriente de potasio rectificadora I_{Kr} y la corriente de potasio lenta I_{KS} .
- 5) En la fase 4 en los potenciales de acción no marcapaso participan corrientes de potasio como la I_{kl} o la I_k , I_{sus} ⁵, I_{st} ⁶ estas dos últimas corrientes de potasio conocidas como de sostenimiento [17].

En las diferentes especies de la familia de mamíferos existe una amplia diferencia, tanto en el número de canales iónicos, como en la densidad de corriente. Esta variabilidad produce diferencias en la morfología de los PA de las células entre las especies, aunque guardan similitudes entre ellas. No solo difiere el tipo y la densidad de corriente, sino también los PA en las diferentes regiones del corazón, dependiendo de la zona del tejido de donde se obtenga el registro [18,19].

Canales que participan en la morfología del potencial de acción marcapaso

Los potenciales de acción del nodo SA del conejo, que es la especie más estudiada, presenta 4 fases, donde participan las siguientes corrientes:

- 1) La fase 0 en las células centrales participa la corriente de calcio tipo L. En las células periféricas participan una mezcla de corriente de sodio (I_{Na} la NAV 1.5 y 1.1, sensibles a TTX) con la de calcio tipo L y T.
- 2) La fase 1, en esta fase participa la I_{to} que es una corriente de potasio, sensible a 4-AP, hay dos tipos de I_{tos} e I_{tof} de acuerdo a la cinética de activación.
- 3) La fase 3 se encuentra las corrientes de potasio la rectificadora tardía I_{Kr} y la lenta I_{KS} .
- 4) En la fase 4, también llamado de despolarización lenta participa la corriente I_f , llamada corriente "funny" o marcapaso. La corriente I_f despolariza lentamente la membrana hasta llegar al umbral de activación y generar un PA espontáneo. Esta corriente es mixta acarrea sodio, potasio y cloro, su umbral de activación va desde -50 hasta -65 mV. Los receptores β -adrenérgicos estimulan la activación mientras que los agonistas muscarínicos inhiben I_f , además esta corriente es modulada positivamente por AMPc [19].

Por la comodidad que ofrecen la familia de roedores se han utilizado como modelos para el estudio de diferentes patologías que remodelan la actividad eléctrica del corazón, por lo cual fue imprescindible caracterizar la actividad eléctrica del nodo SA de dicha familia. Aunque no es una tarea fácil ya que por su tamaño se complica la disección y caracterización del tejido marcapaso.

Nodo seno auricular de rata

En el 2005 Sutiagyn y colaboradores mapearon el nodo de rata en la superficie epicárdica de la vena cava alrededor de la arteria nodal y reportaron más de dos tipos de PA, pero solo los menciona sin hacer una caracterización electrofisiológica de ellos [20]. En el 2009 este mismo grupo, sugiere que hay tres actividades eléctricas; a una de ellas la llaman de trabajo, que solo conduce sin ser marcapaso, parecida a la actividad eléctrica de la aurícula. De hecho afirman que el nodo SA de la rata tiene una capa de músculo auricular sobre el tejido, sin embargo este artículo no caracteriza el PA de la rata.

En otro trabajo en rata se registró únicamente la fase 4 del PA nodal sin mencionar los otros PA antes descritos, al registrar las corrientes que participan en la despolarización lenta o fase 4 se registró además de la I_f otras dos corrientes la I_{kl} y la I_{st} , ninguna de estas dos corrientes se había observado previamente en el nodo SA [21] de otra especie.

² I_{to} , corriente (I) transient (t), outward (o), por sus siglas en inglés

³ I_{tos} corriente (I) transient (t), outward (o) slow(s)

⁴ I_{tof} corriente (I) transient (t), outward (o) fast(f)

⁵ I_{sus} corriente (I) sustentance (sus)

⁶ I_{st} corriente (I) support (st)

La corriente I_{st} , tiene un umbral de activación de -70 a -50 mV, el cual es regulado por agonistas beta adrenérgicos y se bloquea por dihidropiridinas. Además esta corriente es inhibida por cationes divalentes como el Mg^{++} y el Ca^{++} . También se registró la corriente de potasio I_{K1} , que en general solo se habían observado en PA de células de trabajo.

El ritmo puede ser regulado por el sistema nervioso autónomo, ya que el simpático regula el aumento de la frecuencia cardíaca y el parasimpático regula la disminución. Este fenómeno permite la variabilidad en la frecuencia de disparo cardíaco y cuando se genera una arritmia produce un aumento o disminución en la variabilidad [10,11].

Las patologías que podrían generar cambios en el delicado equilibrio del acoplamiento entre la excitación y la contracción son enfermedades respiratorias, hepáticas, desequilibrio osmótico, nefropatías y enfermedades metabólicas como la obesidad, el síndrome metabólico y la diabetes mellitus.

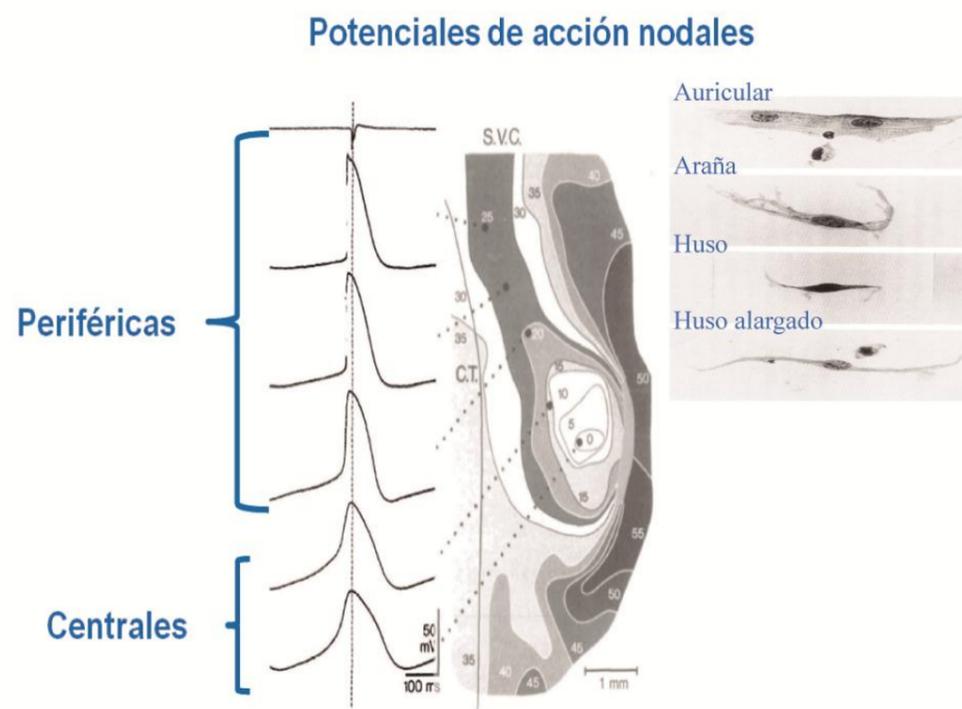


Figura 4 Actividad eléctrica en el nodo senoauricular de conejo. En el panel izquierdo se observa el origen y la propagación craneal de la actividad eléctrica del nodo SA de conejo además la ubicación de los PA centrales y periféricos en el nodo SA ambos presentan pendiente en la fase 4. En el panel derecho se observan los tipos de células nodales y la diferencia con las células auriculares. SVC vena cava superior, CT *crista terminalis*. Modificada de Boyett y cols 1998.

El síndrome metabólico (SM) es uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo. Estudios epidemiológicos de los últimos diez años, reportan un incremento significativo de personas con SM en todo el orbe al grado de llamarla "la pandemia del siglo XXI". En México se considera al SM como una enfermedad social ya que se ha reportado que más del 50% de la población adulta presenta SM con obesidad central. Además la obesidad infantil que existe en nuestro país producto del estilo de vida, incrementará el porcentaje de SM en la población en las siguientes décadas [22].

Definición de síndrome metabólico

El SM es un grupo de signos metabólicos que constituyen un factor de riesgo para desarrollar enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus tipo 2 (DM2) y algunos tipos de cáncer, la etiología de este síndrome depende de factores ambientales y genéticos [23]. En el 2004 la IDF (International Diabetes Federation) organizó y propuso una definición del SM con los parámetros propuestos por la OMS, la European Group for the Study of Insulin Resistance (EGIR) y la National Cholesterol Education Program-Third Adult Treatment Panel III (NCEP ATP III) quedando definido de la siguiente manera [23]:

El SM es un conjunto de signos y síntomas caracterizado por dislipidemias, presión sanguínea elevada, obesidad central, intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y colesterol elevado en ayunas, con presencia de estados protrombótico y pro-inflamatorio sistémico, figura 5 [24,25].

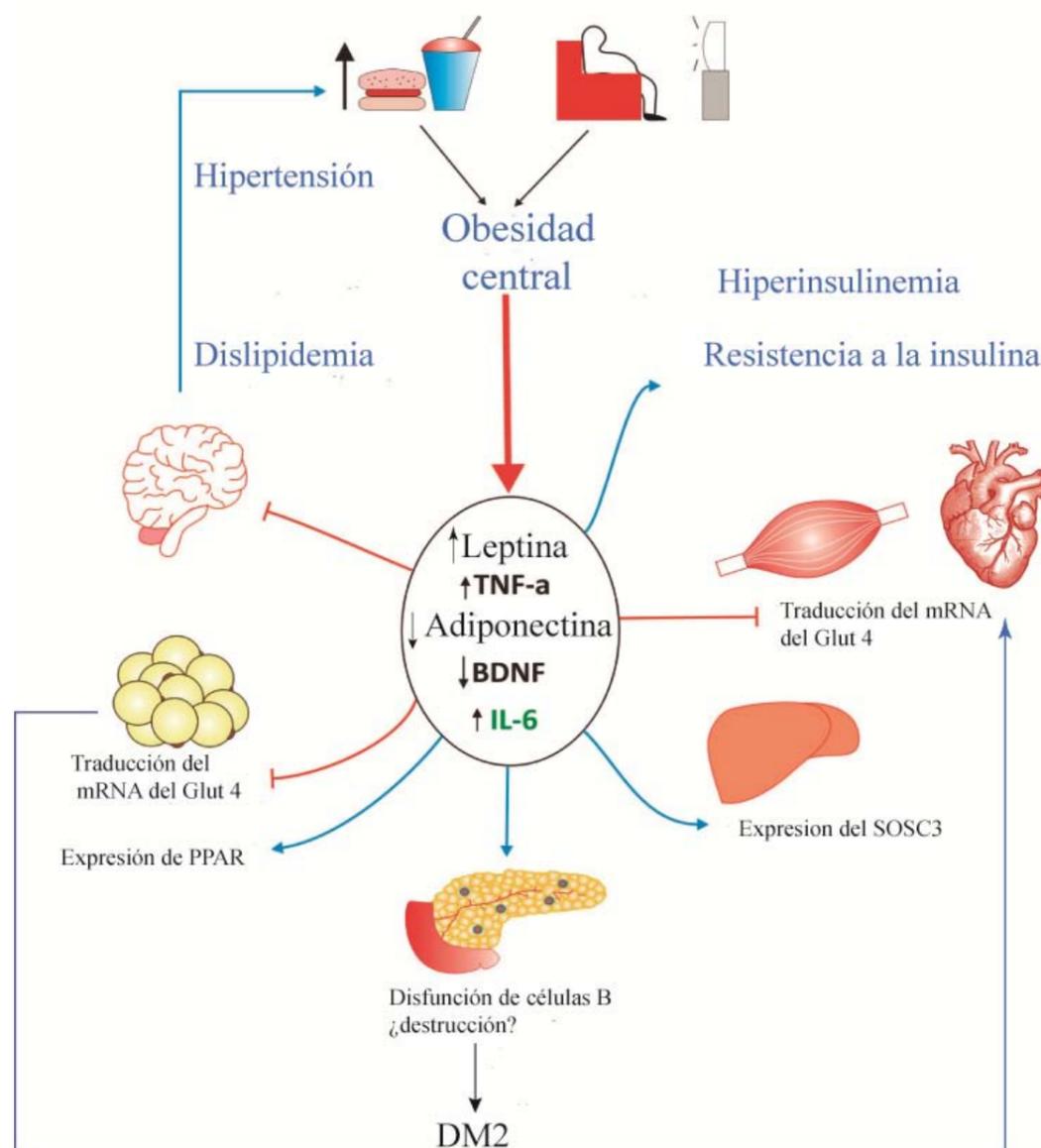


Figura 5. Síndrome metabólico. Definición de SM y sus efectos sobre los órganos, modificada de Hiriart y cols 2014.

Diagnóstico del síndrome metabólico

El SM en la práctica clínica sigue siendo una patogénesis compleja por la diversidad de los componentes que están en dicha constelación y de acuerdo con la definición de la IDF, en el diagnóstico del SM se propone que el paciente debe presentar 3 de los siguientes criterios: circunferencia abdominal de 80 cm en mujeres, 90 cm en hombres, HDL-C ⁷ <40 mg/dL en hombres <50 mg/dL en mujeres, triglicéridos en ayuno >150 mg/dl, presión sanguínea >130/85 mmHg, glucosa en ayuno ≥ 110 mg/dl, estos

⁷ Las lipoproteínas son moléculas cuya función es transportar a los lípidos insolubles desde el intestino y el hígado hacia los tejido periféricos. Por sus siglas en inglés lipoproteína de alta densidad (HDL) y lipoproteína de muy baja densidad (VLDL).

parámetros son para los grupos étnicos del centro y sur de América [26,27]. Por otro lado la IDF plantea que en los procesos de investigación para el esclarecimiento del desarrollo del SM se pueden medir otros factores (ver tabla 1) a este conjunto de pruebas se le conoce como "el estándar platinum" [28].

Factores del SM que incrementan el riesgo a padecer enfermedades cardiovasculares

Diferentes estudios muestran una correlación entre el SM, la obesidad, la diabetes mellitus, las enfermedades cardiovasculares y el cáncer [29]. Además los pacientes con SM que presentan dislipidemias generalmente desarrollan un incremento de la grasa abdominal y visceral. El incremento de grasa reportado está dado por la infiltración de ácidos grasos en los adipocitos ectópicos de los órganos blanco que son: corazón, hígado, páncreas y músculo.

El incremento del tejido adiposo en los órganos blanco únicamente se asociaba con enfermedades vasculares como aterosclerosis, infarto o isquemias tanto en el corazón como a nivel cerebral, o enfermedades secundarias como presión arterial elevada y falla renal por la dislipidemia entre otras [28].

Ahora se sabe que el tejido adiposo es un órgano endocrino que produce y secreta adipocinas las cuales están relacionadas con el control energético celular y procesos inflamatorios. Se ha demostrado que el incremento de la grasa ectópica es un importante predictor de enfermedades como la resistencia a la insulina y diabetes mellitus ya que se asocia, por ejemplo, con un incremento en la producción de glucosa hepática, la cual podría generar alteración en la glucosa de ayuno.

Tabla 1. Tabla de mediciones adicionales para hacer investigación en modelos animales con SM*

Distribución anormal de grasa corporal	Incremento distribución de grasa corporal Incremento en la distribución de grasa central Biomarcadores de tejido adiposo: leptina y adiponectina Hígado graso
Dislipidemia aterogénica	Apo B o disminución de HDL-c Partículas pequeñas de LDL
Disglucemia	Cambios en la curva de tolerancia a la glucosa oral
Resistencia a la insulina	Niveles de insulina y proinsulina en ayuno (HOMA-IR) Modelo de resistencia a la insulina Bergman Elevación de ácidos grasos en ayuno El valor de M desde el clamp
Desregulación vascular	Medición de la disfunción endotelial Microalbuminuria
Estado proinflamatorio	Proteína C reactiva elevada Citocinas proinflamatorias elevadas (por ejemplo, TNF-alfa, IL6) Disminución de los niveles plasmáticos de adiponectina
Estado protrombótico	Factores fibrinolíticos Factores de coagulación
Factores hormonales	Eje pituitaria-adrenal

* Datos obtenidos de Alberti y cols., 2006

Otro de los signos del SM que cobra importancia es la obesidad abdominal puesto que la relación cintura cadera es un buen predictor de enfermedades cardiacas [30], un ejemplo de ello es la hipertrofia ventricular causada por la obesidad, está se define como un aumento de espesor en las paredes ventriculares produciendo disfunción diastólica y sistólica, asociada a cardiomiopatías. Cuando el corazón está hipertrofiado utiliza como energía los lípidos acumulados en el músculo cardiaco, produciendo especies de oxígeno reactivas que dañan la función de los canales iónicos, la homeostasis de Ca^{+2} , además de producir apoptosis en los cardiomiocitos [31,32].

En recientes investigaciones se ha revelado que los pacientes con SM pueden sufrir muerte por arritmias cardiacas [33] ya que la obesidad incrementa el riesgo a padecer arritmias ventriculares, que se asocian con una muerte súbita. Las arritmias mortales están relacionados con una prolongación en el intervalo QT del ECG, es decir que ay un aumento en la duración del PA ventricular, este fenómeno es independiente a la edad del sujeto [34]. Otro factor que causa arritmias ventriculares mortales son las dislipidemias estas incrementan la actividad simpática produciendo inestabilidad eléctrica [35,36].

Modelos animales con síndrome metabólico

En el desarrollo de los modelos animales con SM se utilizan los factores genéticos y ambientales. Los modelos animales a los que les modifican el receptor a leptina para alterar el metabolismo celular son el ratón ob/ob, el ratón db/db y la rata fa/fa [37]. El modelo de rata que modificaron genéticamente la utilización de los ácidos grasos son la "Otzuka Long Evans Tokushima fatty" y la no obesa "Goto-Kakazaki" ambas tienen intolerancia a la glucosa, resistencia a la insulina y la última también presenta hipertensión. Otras especies que tienen susceptibilidad genética a un elemento del SM son la rata Spraw Dawley que desarrolla obesidad y diabetes, la rata Wistar-Kioto es susceptible a desarrollar hipertensión [37]. En los modelos animales donde se utilizan los factores ambientales como las dietas ricas en grasas presentan resistencia a la insulina, acompañado de infiltración de ácidos grasos, acumulación de grasa a nivel renal y albuminuria.

El modelo de dieta alta en carbohidratos en rata Wistar, se observa un aumento tanto en el peso corporal como en el tejido adiposo, así como un aumento en plasma del colesterol y los triglicéridos, los niveles de glucosa e insulina también se ven incrementados, además presentan hipertensión, además se dice que estos modelos desarrollan SM semejante al que presentan los humanos [38].

Consideramos que el modelo de rata con dieta alta en carbohidratos que usamos en este trabajo presenta la ventaja de no desarrollar genéticamente algún elemento del SM, además de que solo presenta una discreta hipertensión, dando la oportunidad de estudiar las arritmias sin tener dicho componente.

Hasta la fecha solo se ha descrito un incremento en el intervalo QT del ECG en cobayos con SM. Lo anterior implica que el SM promueve arritmias ventriculares [39]

Planteamiento del problema

Al SM se le conoce como la pandemia del siglo XXI, ya que han incrementado desmesuradamente los casos a nivel mundial, como consecuencia se observó un incremento en el desarrollo de diabetes mellitus, eventos cerebrovasculares, cáncer y enfermedades cardiovasculares [28].

El SM ha sido relacionada de manera indirecta con arritmias supraventriculares [40] se reportó que de manera paralela ambas condiciones aumentaron sus cifras en la última década. Por otro lado, algunos signos del SM, de manera individual, producen remodelación eléctrica cardíaca [41] ejemplo de ello son los cambios en la variabilidad del intervalo QTc del ECG en mujeres obesas, además de incremento de arritmias ventriculares por crecimiento de musculo ventricular [40].

Los pacientes obesos presentan síndrome de nodo enfermo relacionado con apnea del sueño y disminución en la frecuencia cardíaca. Además los pacientes con obesidad e hipertensión arterial incrementan la probabilidad de presentar arritmias [41].

Es claro que hasta el momento solo hay evidencia epidemiológica acerca de que el SM produce arritmias, lo que aún no queda claro es como afecta el SM a la actividad eléctrica para producir arritmias supraventriculares, ventriculares o ambas.

Hipótesis

Las alteraciones metabólicas que experimentan las ratas con SM, inducirán cambios sobre la actividad eléctrica del nodo seno auricular del corazón produciendo arritmias supra ventriculares o ventriculares.

Objetivo general

Analizar la actividad del nodo seno auricular y comparar los cambios que presente la actividad eléctrica en el modelo de ratas con SM.

Objetivos particulares

1. Registrar la actividad eléctrica del corazón en el animal íntegro con el ECG en animales testigo y caracterizar las arritmias que presenten los animales con SM
2. Caracterizar la actividad eléctrica en el nodo SA de las ratas testigo y comparar los cambios que se presenten en la actividad eléctrica del nodo SA de las ratas con SM.
3. Registrar las corrientes que se alteraron en el potencial de acción del nodo por el síndrome metabólico y compararlas con las corrientes de ratas testigo.

Materiales y métodos

Modelo animal

Utilizamos ratas macho Wistar de aproximadamente 2 meses de edad, con un peso de entre 250-280 g que nos proporcionó el bioterio del Instituto de Fisiología Celular (UNAM). Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (de 7:00 am-7:00 pm). Su alimentación fue con alimento estándar para roedor "Rodent diet 5001" de Harlan laboratories que contiene: 28.5% de proteína, 13.5% de grasas y 58% de carbohidratos. Se les dio agua *Ad libitum* a ambos, al grupo tratado se le adicionó 20 % p/v de sacarosa al agua. El tratamiento duró 8 o 24 semanas.

Caracterizamos al modelo cuantificando signos metabólicos como el peso, la cintura, la longitud, la grasa peripancreática y la grasa epididimal, a estos signos les llamamos mediciones morfométricas. También cuantificamos los parámetros bioquímicos es decir la concentración de glucosa, de insulina, colesterol, HDL-c y triglicéridos en plasma, la muestra de sangre (3ml) se obtuvo de la vena cava inferior un minuto antes de extraer el corazón y se envió a los laboratorios SERVALAB[®] donde se realizaron las mediciones. Por otro lado medimos la utilización de la glucosa haciendo una curva de tolerancia a la glucosa (CTGI), un día antes del sacrificio de la rata se le aplicó una dosis de glucosa 100 mg/kg de peso vía intraperitoneal y se midió la concentración de glucosa en la sangre de la vena caudal a los tiempos 0, 15, 30, 60, 120 minutos después de la administración con el glucómetro Acutred-Roche[®].

Alteraciones que produce el síndrome metabólico en la actividad eléctrica en el animal completo

Electrocardiograma

Antes del sacrificio de los animales se realizó el registro del ECG en la configuración I, se anestesió al animal con una mezcla de Ketamina 1 mg y Xilacina 5 mg por cada Kg de peso. Los electrodos de registro se colocaron de la siguiente forma: el negativo sobre el pecho del lado derecho, el electrodo positivo se colocó sobre el pecho del lado izquierdo y la tierra se colocó en la pata posterior derecha. Los electrodos van conectados a un amplificador el cual incrementa 70X la señal. La señal fue capturada a 1 KHz, con la ayuda de una tarjeta digitalizadora, se utilizó una computadora personal para almacenar los datos para su posterior análisis. Los parámetros que se midieron fueron el intervalo RR y el intervalo PQ. El análisis de la señal se hizo los programas del Clampfit y el Origin versión 8.0.

Variabilidad en la actividad eléctrica del corazón

Para determinar la variabilidad de la actividad eléctrica cardíaca en animal íntegro utilizamos el intervalo R a R de los ECG de los animales testigo y tratados. Con estos intervalos construimos el diagrama de Poincaré de la siguiente forma, tomamos la serie de tiempo de la secuencia de aparición del valor RR y graficamos R_{ri} contra $R_{ri} + 1$. Una vez que construimos el diagrama de Poincaré, medimos la variabilidad con la desviación estándar de las distancias de todos los puntos del diagrama a la recta $R_{ri} = R_{ri} + 1$ (recta identidad) y la denominamos SD1, al igual que la desviación estándar de las distancias que existen entre la recta perpendicular a la recta identidad que pasa por el punto R_{ri} media y $R_{ri} + 1$ media, a la cual la llamaremos SD2.

La medida de dispersión se hace según Kamakar [14], midiendo la dispersión de las distancias de acuerdo a la recta identidad entre un punto y el siguiente. La variabilidad de la actividad eléctrica del nodo SA aislado se realizó con el diagrama de Poincaré del intervalo interpotencial como variable y determinamos el equivalente de SD1 Y SD2 para determinar la variabilidad en la actividad espontánea nodal.

Alteraciones que produce el síndrome metabólico en la actividad eléctrica en el tejido nodal

Diseción del nodo seno auricular en rata Wistar

Se anestesiaron a los animales con una dosis de pentobarbital sódico (2.5 ml/1kg de peso), se abrió la cavidad torácica se obtuvo la muestra de sangre y se escindió el corazón. El corazón se colocó en un sistema Langendorff para intercambiar la sangre por

solución Tyrode a una velocidad de 7.5 ml/min temperatura de 36 ± 5 °C, gaseada con una mezcla de gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂).

Se hizo la disección para aislar el nodo SA, considerando las siguientes estructuras que lo delimitan, como se muestra en la figura 6 por la vena cava inferior y superior, pared interauricular y *crista terminalis*. La línea amarilla demarca la arteria nodal (b brazo de la arteria nodal), la línea roja punteada delimita el nodo de las aurículas. Boyett y cols., 2009 reportan que la actividad central se encuentra en el área punteada sobre la arteria nodal, los cuadros delimitan el área central del PA del nodo SA del ratón [42], el área determinada con cuadros punteados es el área donde se encuentre la actividad central en la rata [43].

Registro multicelular del potencial de acción

El nodo SA se colocó en una cámara para registro multicelular de tejido aislado con base de Sylgard, y se perfundió con solución Tyrode a 36.5 ± 0.5 °C gaseado con carbógeno durante todo el experimento. La actividad eléctrica o PA se registró por el lado del endocardio del nodo SA, con la técnica de microelectrodos convencionales⁸. La señal del microelectrodo se amplificó usando un WPI-Duo 773, la señal amplificada se digitalizó a una frecuencia de 10 KHz a través de una tarjeta de National Instruments® y el programa Labview®. Los datos fueron almacenados en una computadora personal para su análisis posterior.

La caracterización electrofisiológica del PA marcapasos se realizó midiendo los siguientes parámetros: velocidad máxima de despolarización (VMD), potencial diastólico máximo (PMD), amplitud, duración de la repolarización al 10, 30, 60, 90% (DRPA), frecuencia de disparo espontánea y pendiente de la fase 4. Para el análisis de los datos se utilizó el programa Origin, versión 8.

Inmunohistoquímica de hidroxilasa de tirosina (TH)

Se obtuvieron cortes coronales de 5 µm de ancho del tejido aislado del nodo seno auricular congelado en condiciones testigo y con SM. La tinción se hizo de la siguiente manera, se descongelaron los cortes y se fijaron con paraformaldehído por 1 minuto. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con PBS 1X y albúmina al 5 %. Se incubó durante 1 hora con tritón al 2 % y albúmina al 5% (solución perforante). Se incubó con el anticuerpo anti TH (anti-TH, anticuerpo policlonal de conejo) 1:50, durante 18 horas a temperatura -4°C. Se lavó con PBS 1X con 5% de albúmina durante 15 minutos. Se colocó el anticuerpo secundario Cy5 (Santa cruz biotechnology) durante 90 minutos a temperatura ambiente. Y finalmente se lavó con la solución PBS 1X con 5% de albúmina durante 15 minutos. El medio que se utilizó para montar la muestra fue DAKO.

Tinción de lípidos en el nodo seno auricular

Se hicieron cortes congelados en el tejido del nodo SA aislado con 5 µm de espesor y se montaron en laminillas de vidrio. Se fijó el tejido usando formalina durante 10 s, después se lavaron con agua destilada, se dejaron secar durante 30 a 60 s aproximadamente. Para después deshidratar el tejido con propilenglicol al 100 % durante 15 minutos.

Enseguida se le retiró el exceso de propilenglicol y se introdujo el tejido en rojo oleoso a temperatura de 56°C, durante 10 minutos, se retiró el exceso y se hidrató el tejido con propilenglicol al 85 % durante 3 minutos. Se lavó el exceso con agua corriente y se realizó una contra tinción con hematoxilina de Mayer's por 30 segundos, finalmente se lavó con agua corriente durante 30 segundos, se secó a temperatura ambiente por 60 s y se montó la muestra con medio de gelatina con glicerina.

Tinción para colágeno en el nodo seno auricular

El tejido nodal utilizado en el registro se deshidrató y se incluyó en parafina. Se hicieron cortes de 5 µm de ancho se tiñeron con hematoxilina de Weigert por 5 minutos, se lavó el exceso de colorante con agua corriente y después con agua destilada. En seguida se colocaron en ácido pícrico por 5 minutos se les quitó el exceso y se metieron en alcohol de 95° durante 10 minutos. Después se sumergieron en alcohol de 100° por 5 minutos. Finalmente las laminillas se introdujeron en dos frascos diferentes de xilol por 5 minutos en cada ocasión. Se hizo la fijación de la laminilla con bálsamo de Canadá.

⁸ La técnica de micro electrodos convencionales nos permite observar directamente la actividad eléctrica de una sola célula en un tejido multicelular.

Alteraciones que produce el síndrome metabólico en la actividad eléctrica en célula única

Registro de corrientes de los potenciales de acción del nodo seno auricular

Se obtuvo el corazón y montó en un sistema Langendorff para intercambiar la sangre por solución Tyrode, la cual estaba a temperatura de 36°C y gaseada con carbógeno. Una vez terminado de limpiar el corazón se hizo una perfusión con Tyrode 0 Ca⁺⁺ durante 8 minutos, posteriormente se incubó con las enzimas colagenasa (0.33 mg/ml) más proteasa (0.01 mg/ml) durante 15 minutos. Se desmontó el corazón, se hizo la disección del nodo antes descrita y se cortó en tiras.

Las tiras nodales se colocaron en un baño de enzimas que contenía colagenasa (0.33 mg/ml) y elastasa (0.40 mg/ml), la solución se mantuvo con una temperatura de 35°C gaseada con carbógeno, el nodo SA estuvo en la mezcla de las enzimas durante 5, 10 y hasta 15 minutos, para su posterior dispersión mecánica donde se obtuvieron los cardiomiocitos, los cuales se almacenaron en una solución llamada Kraft-Brüe (KB) hasta su registro (una hora después de la dispersión), ver tabla 1 en el apéndice.

El registro de las corrientes se realizó con la técnica de patch clamp en su versión de célula completa, utilizando el programa de Clampex y Clampfitt versión 5. El protocolo para el registro de corrientes marcapasos fue, pulsos cuadrados con potencial de mantenimiento de -40 mV, y los pulsos de prueba van desde -120 hasta 20 mV, con una duración inicial de 2.6 s, disminuyendo en cada pulso 200 ms. Para el registro de la corriente I_f se utilizó la solución de cloruro de cobalto (CaCo) suplementada con 0.5 mM BaCl₂. Para el registro de la corriente I_{st} se usó la solución externa normal (SEN) suplementada con 0.5 mM BaCl₂.

Las corrientes de potasio I_{K1} e I_{to} se utilizó la solución de CaCo suplementado con 1mM de cloruro de cesio, el protocolo que se aplicó para la corriente I_{to} fue con pulsos cuadrados con un potencial de mantenimiento de -80mV, con un prepulso a -40mV que duró 50 ms, los pulsos de prueba se aplicaron desde -50 a 40 mV cada 10 mV con una duración de 2000 ms.

Análisis estadístico

Todos los datos presentados en este trabajo se presentan como valor medio ± desviación estándar, utilizamos la prueba t-student para datos no pareados con una significancia de $p \leq 0.05$

Resultados

Ratas con 8 semanas de tratamiento

Modelo animal

Mediciones morfométricas

Después de 8 semanas de consumir agua con sacarosa al 20%, las ratas tratadas presentaron un incremento en el peso corporal del 33% en los animales con tratamiento, no se encontraron diferencias significativas en la talla del animal con SM comparado con los animales testigo. Los animales con SM también tuvieron un incremento del 10%, en la circunferencia abdominal, este dato concuerda con el aumento del peso de la grasa epididimal (3 veces) comparado con el de las ratas testigo, ver figura 6

Parámetros bioquímicos

Al medir la glucosa los animales de 8 semanas con SM no presentaron cambios en la glucosa de ayuno, sin embargo presentaron hiperinsulinemia ya que la concentración plasmática de insulina fue una orden de magnitud mayor a la de los animales testigo véase figura 6. Estas ratas también presentaron dislipidemia ya que se cuantificó una disminución en el HDL-c del 21%, aunque no hubo cambios significativos en los niveles de los triglicéridos, ver figura 6.

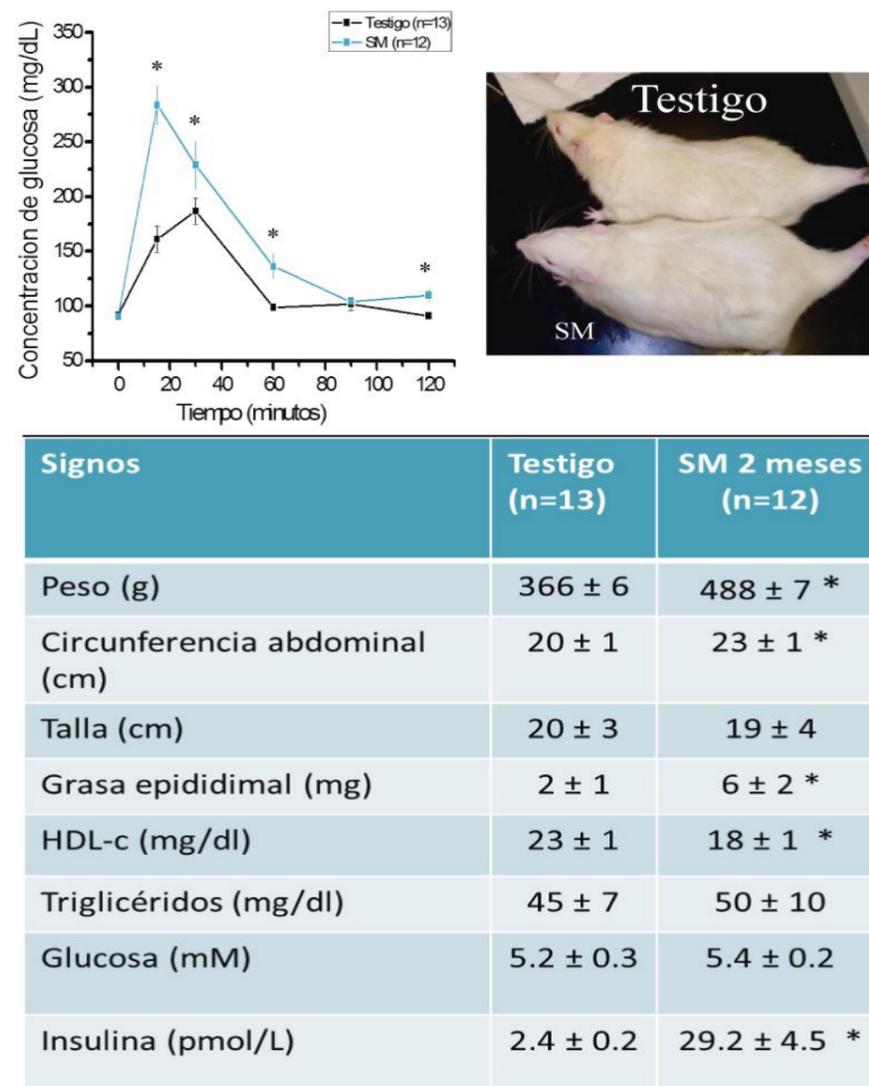


Figura 6. Datos metabólicos del modelo de SM con 8 semanas de tratamiento. Panel superior, gráfico de CTGI donde se observa en los animales tratados (azul) un aumento significativo en la concentración de glucosa comparado con los animales testigo (negro). Panel inferior tabla resumen de los datos metabólicos. * t de student para datos no pareados $p > 0.05$

Curva de tolerancia a la glucosa

Al hacer la curva de tolerancia a la glucosa intraperitoneal a los animales de 8 semanas, tanto testigo como con SM, mostraron un incremento de la glucosa en los primeros 30 minutos después de administrar la carga. Sin embargo en los animales con SM la concentración fue por arriba de 200 mg/dL y en los testigos fue de 150 mg/dL. Para el minuto 60, la concentración de glucosa de los animales testigo ya había disminuido casi a la concentración basal y en los animales con SM alcanzó la cifra de 147 mg/dL. Para el minuto 90 las ratas con SM tuvieron 100 mg/dL y a los 120 minutos incrementó la concentración de glucosa a 112 mg/dL, es decir no regresó la concentración de la glucosa basal que fue de 96 mg/dL, mientras que en los animales testigo la concentración de glucosa descendió por debajo de la concentración basal, ya que se cuantificó 84 mg/dL, ver figura 6.

Cambios en la actividad eléctrica en el corazón en el animal integro

Electrocardiograma

El 57% de los animales con 8 semanas con SM presentaron arritmias ventriculares, entre ellas una muy vistosa conocida como bigeminismo⁹. La frecuencia cardíaca es un signo que nos indica el funcionamiento del corazón, se puede calcular con el inverso del intervalo de la onda R a la siguiente onda R, las ratas testigo de 8 semanas presentaron un intervalo RR de 237 ± 27 y las ratas con SM tuvieron un intervalo RR mayor, con estos datos calculamos la frecuencia de disparo ($1/R-R$) y encontramos que en las ratas con SM la frecuencia disminuyó de 257 ± 1 a 223 ± 1 eventos por minuto, de tal manera que los animales con SM presentaron bradicardia¹⁰ sinusal.

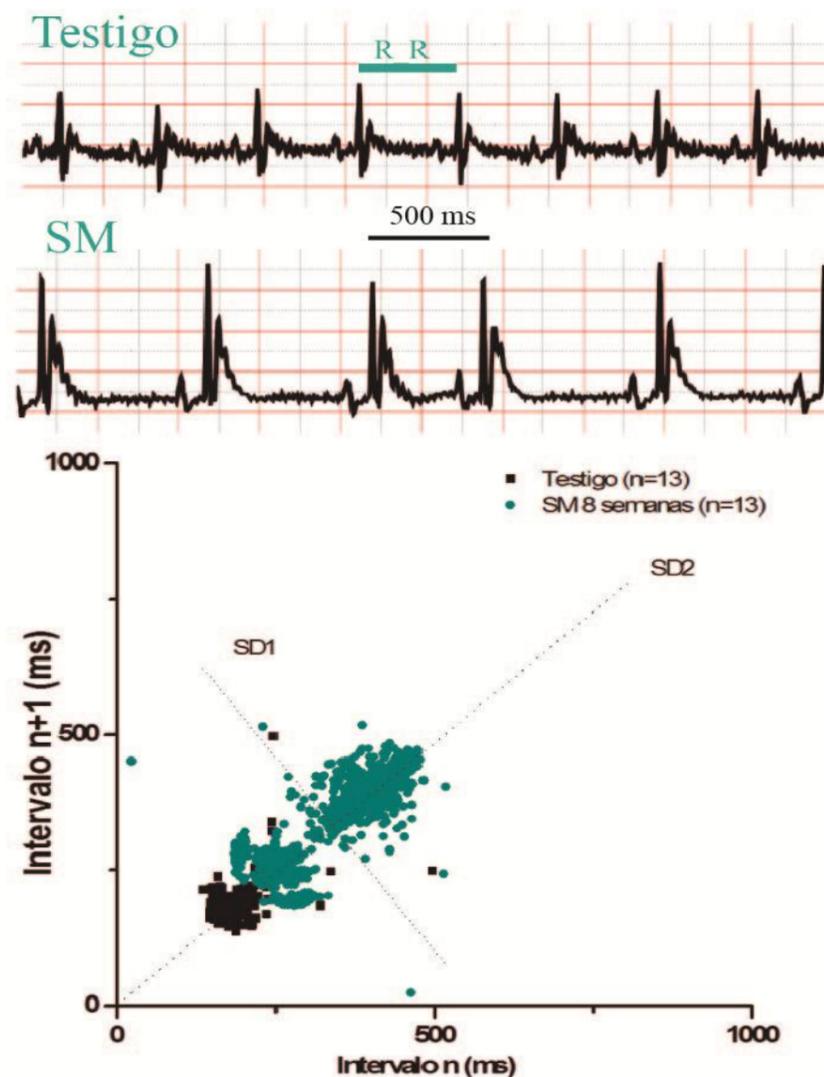


Figura 7. Disminución de la frecuencia cardíaca e incremento en la variabilidad de la actividad eléctrica en el corazón de las ratas. Registro del ECG panel superior testigo e inferior SM. Diagrama de Poincaré donde se observa el incremento de la variabilidad en SD2 Panel inferior.

⁹ Se habla del bigeminismo, cuando en una serie de dos o más complejos sinusales y cada uno de ellos va seguido de una extrasístole. En humanos una extrasístole es normal a menos que se instituya y se presente con otros síntomas

¹⁰ Se considera que hay bradicardia cuando disminuye la frecuencia cardíaca o es lenta.

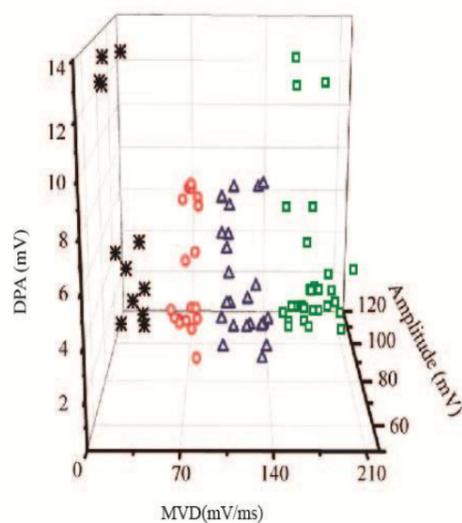
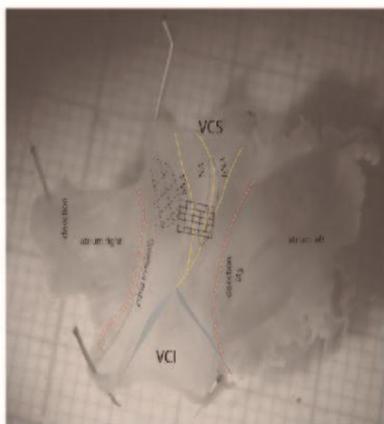
Variabilidad en el intervalo RR del electrocardiograma

Al graficar en intervalo R-R del ECG en un diagrama de Poincaré, la variabilidad en la desviación estándar de los animales testigos fue de $SD1 = 5.5 \pm 0.1$ y el valor de $SD2 = 26 \pm 0.5$. En ratas con SM el valor aumento 5 veces en $SD1$ fue 28 ± 4.2 y para $SD2$ aumento 2.6 veces su valor, es decir fue de 69 ± 11 .

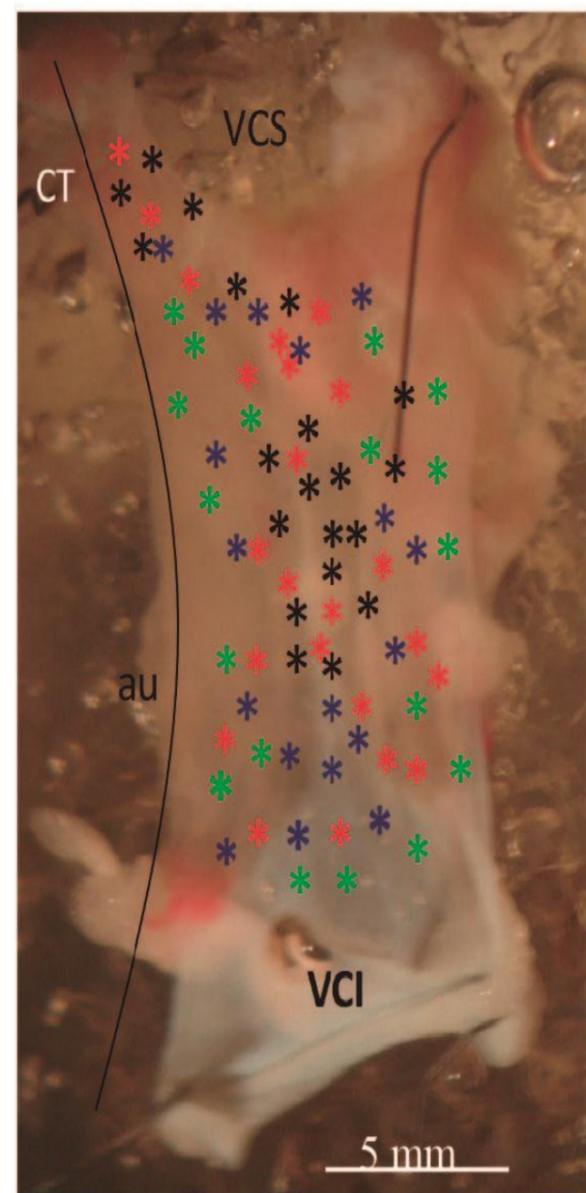
Se calculó el cociente $SD1/SD2$ para cuantificar el índice de variabilidad, no se encontraron diferencias significativas ya que en los animales con SM aumentaron proporcionalmente ambas desviaciones ($SD1$ y $SD2$) por lo que, los animales testigo tuvieron 0.25 y los animales con SM 0.24, figura 7.

Los resultados del ECG y la variabilidad de la desviación estándar nos sugieren que el nodo senoauricular está siendo afectado por el SM, por lo que se registró la actividad eléctrica del tejido nodal intacto:

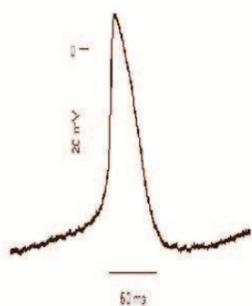
Disección



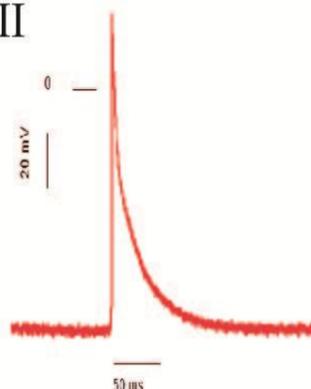
Mapeo del nodo SA



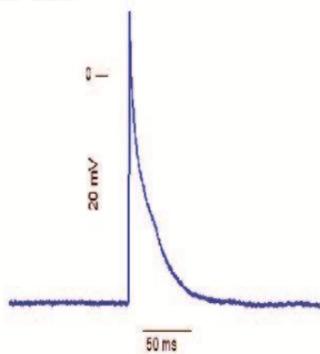
Tipo I



Tipo II



Tipo III



Tipo IV

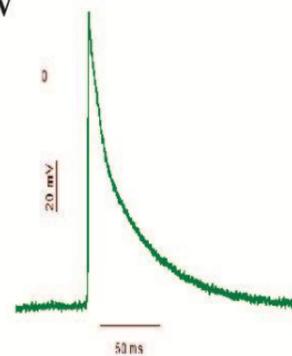


Figura 8. Actividad eléctrica y distribución de los potenciales de acción del nodo senoauricular de rata Wistar testigo. En el panel superior izquierdo se muestra la disección utilizada, el nodo SA se encuentra delimitado entre la vena cava superior (VCS) e inferior (VCI), la crista terminalis (CT) y el septum interatrial. Se reconocen 4 poblaciones de células, la actividad central o tipo I en negro está localizada al centro del nodo. La tipo II en rojo y III en azul están distribuidas en toda el área nodal y la tipo IV en verde se encuentra en el perímetro nodal.

Actividad eléctrica del nodo seno auricular en rata testigo

Se hizo la disección del nodo SA en la rata utilizando como referencia la disección que se hace para conejo, además de usar las estructuras de la vecindad como son la pared de la aurícula derecha, el septum interauricular y la crista terminalis, ver figura 8 [5]. Al hacer el registro se obtuvieron diferentes PA en la zona conocida como central y en la zona transicional o periférica. Los datos se analizaron aplicando una curva de distribución normal a todos los parámetros del PA descritos en la metodología, con este análisis se obtuvieron 4 poblaciones diferentes, ver figura 8 panel superior izquierdo.

De las cuatro poblaciones registradas, solo una presentó la pendiente característica de la fase 4 del PA, el resto pareciera ser actividad eléctrica transicional o periférica. A los PA con pendiente las llamamos centrales, por sus características similares a las ya reportadas en el nodo de conejo ver figura 4.

Las otras tres morfologías que tuvieron la pendiente de la fase 4 cercana a cero, las llamamos transicionales o latentes tipos II, III y IV, de acuerdo a la DPA ya que son muy semejantes a las reportadas en rata por Sutyagin en 2010, a las cuales llamo de trabajo o transicionales, porque según la literatura reportada solo sirven para la propagación de la zona central a la periférica y de allí hacia las aurículas.

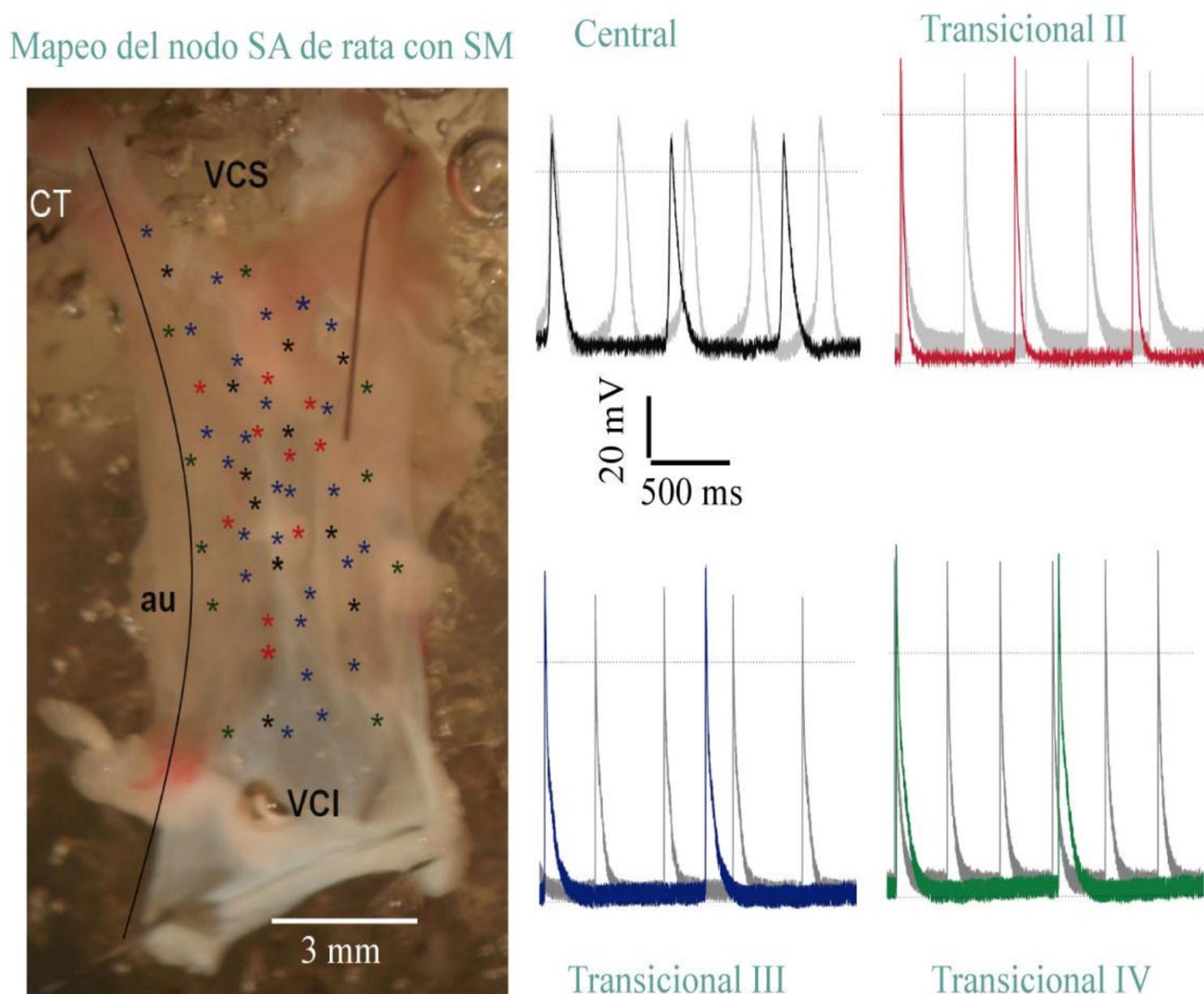


Figura 9. Alteraciones del potencial de acción por el síndrome metabólico. Ubicación de la actividad del nodo SA en los animales con tratamiento (panel izquierdo). Comparación del PA de las 4 poblaciones de los animales testigo (gris) comparada con PA de los animales con SM donde se observa un incremento en la pendiente de la fase 4 y disminución en la frecuencia de disparo espontánea.

Las características que presentaron las cuatro diferentes morfologías fueron: en los PA centrales o tipo I la velocidad máxima de despolarización es más lenta que en las transicionales, la primera tuvo 31 ± 16 milivoltios/milisegundos (mV/ms); las latentes tipo II tuvieron 80 ± 14 mV/ms; las tipo III tuvieron 127 ± 14 mV/ms y las tipo IV fue de 179 ± 18 mV/ms. La amplitud del PA fue menor en las centrales, estas tuvieron 71 ± 18 mV mientras que las transicionales tipo II tuvieron 82 ± 5 mV, las tipo III 92 ± 7 mV y las tipo IV fue de 104 ± 6 mV.

Como se observó a simple vista y después al hacer la función de distribución la DRPA al 60% también es menor en las transicionales, la tipo II tuvo de 47 ± 18 ms, la III 37 ± 12 ms y tipo IV 31 ± 9 ms, los demás parámetros se pueden observar en la figura 8 y tabla 2 del apéndice respectivamente.

En cuanto a la localización de la zona de los PA centrales varía según lo reportado para nodo de conejo, la localización de la PA tipo I se encuentran en el área entre la desembocadura de la vena cava superior y hacia 6 mm de la vena cava inferior. El PA transicional tipo II y III se encuentra en todo el tejido nodal mientras que la tipo IV está localizada en el perímetro del área nodal, figura 8

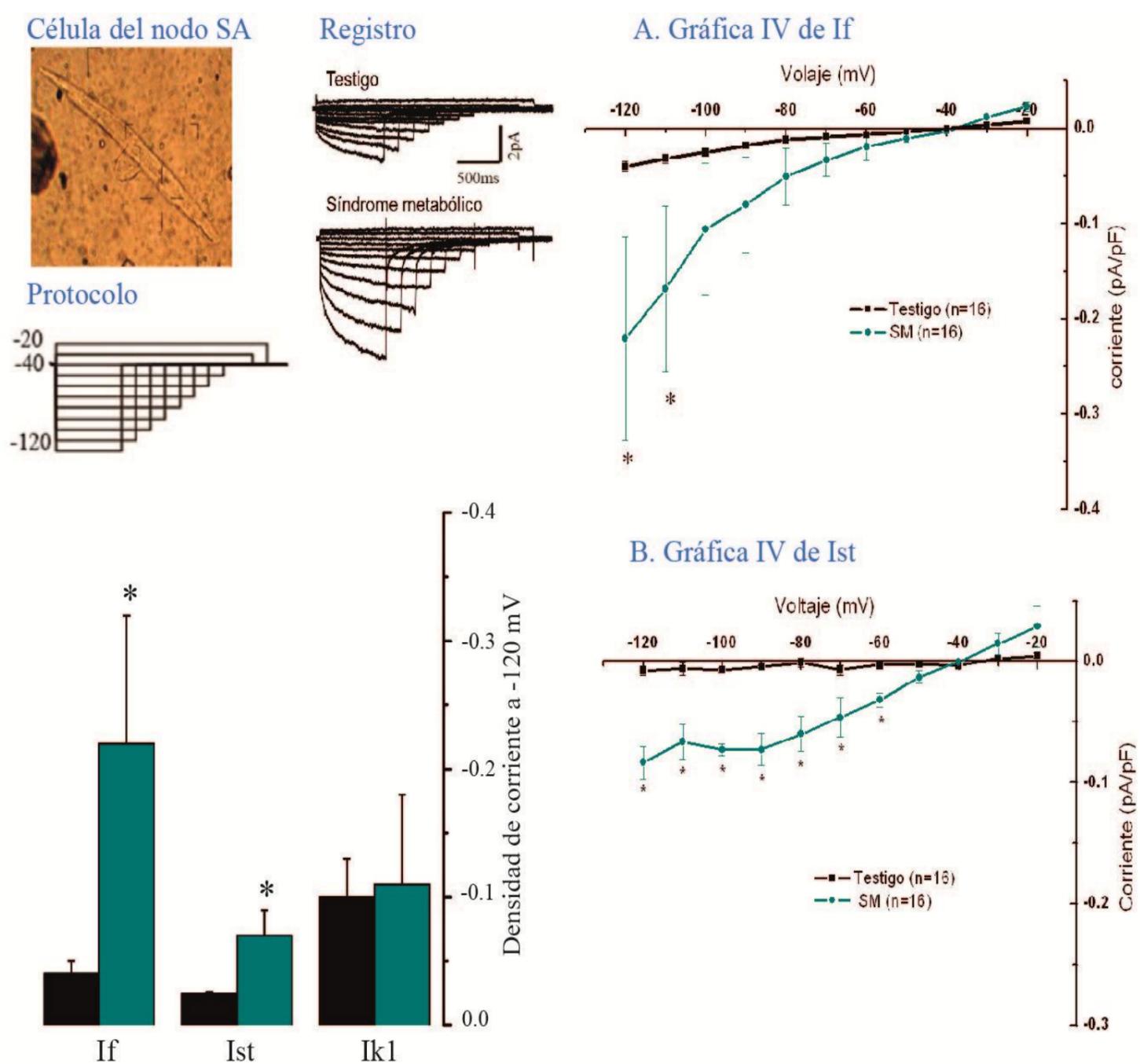


Figura 10. Incremento de las corrientes marcapaso en las células del nodo SA en los animales con SM. MIOCITO nodal en forma de huso que se usaron para los registros de corriente (panel superior izquierdo), la familia de corrientes marcapaso y el protocolo utilizado. En el panel inferior izquierdo se observa el aumento de las corrientes marcapaso I_f e I_{st} . Panel derecho gráfica de la curva corriente contra voltaje A. de la corriente I_f (panel superior) y B. de la corriente I_{st} (panel inferior).

Alteraciones por el síndrome metabólico sobre el potencial de acción del nodo SA

En los animales con SM se conservaron las 4 poblaciones de PA registradas en el nodo SA de rata testigo. Los cambios que presentaron los PA nodales de los animales con SM fueron: en los PA centrales se registró una disminución del 48% en la velocidad máxima de despolarización.

Los PA transicionales tipo II, III y IV presentaron pendiente de la fase 4 las tipo II pasaron de tener 0 mV/ms a 2 mV/ms; las tipo III a 3 mV/ms y en la tipo IV tuvieron 2 mV/ms, sin cambio significativo en el voltaje umbral. Otro parámetro alterado por el SM fue la frecuencia de disparo espontánea del PA disminuyó en promedio un 40% en las células transicionales, este hallazgo podría estar asociado a la bradicardia sinusal observada en el ECG del animal íntegro.

También disminuyó la duración del PA en los potenciales de acción transicionales a los diferentes porcentajes en los tipo II la DRPA al 10% disminuyó a 2 ms y en el tipo III la DRPA al 30% disminuyó a 4 ms y la DRPA al 60% a 13 ms, figura 9.

Los cambios realizados en la actividad eléctrica están relacionados con alteraciones en las corrientes que participan en cada una de las fases del PA, por los cambios en la fase 4 y en la duración del PA nos interesó registrar las corrientes hiperpolarizantes o marcapaso y las de potasio I_f , la I_{st} y la I_{k1} .

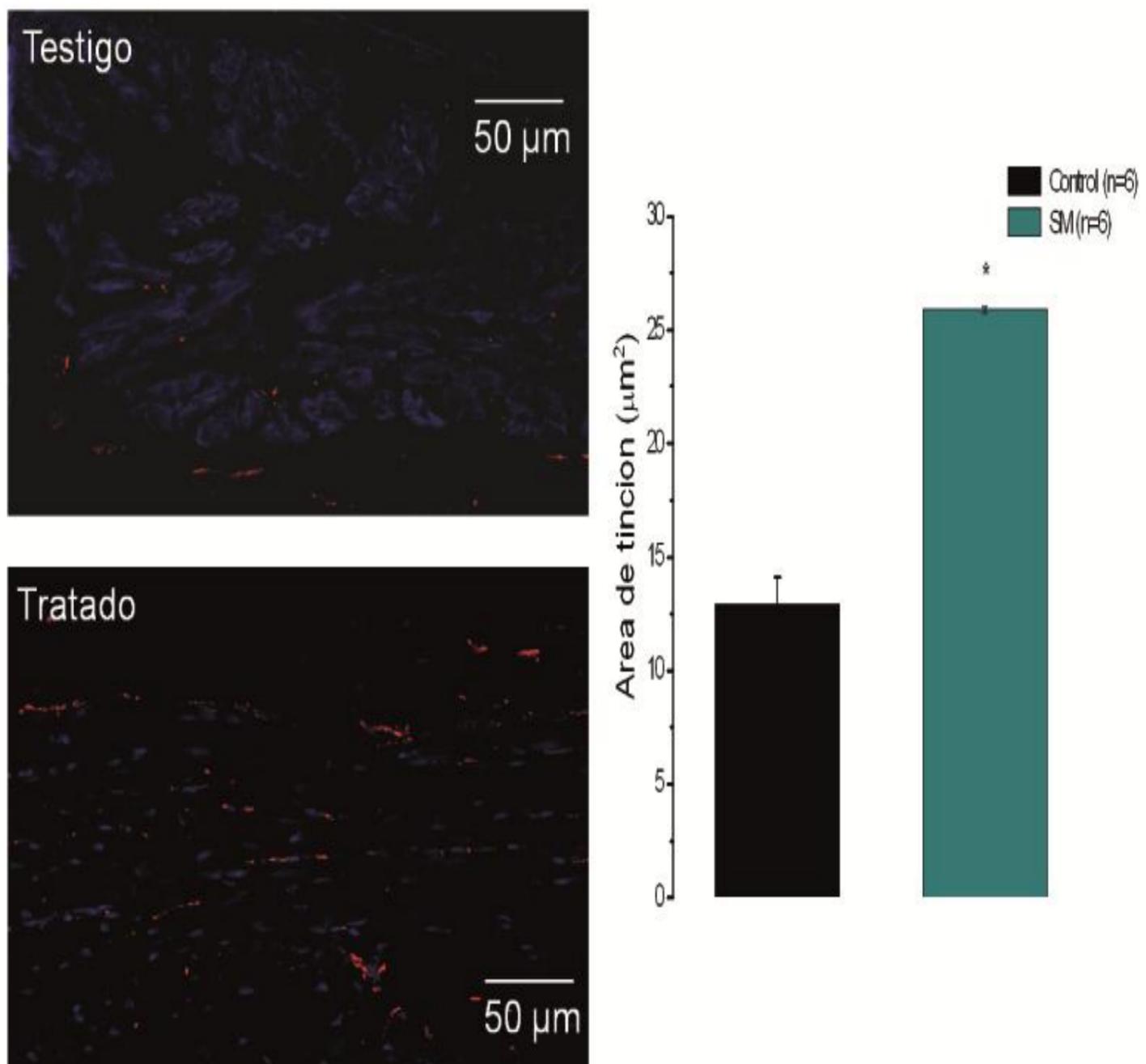


Figura 11. Incremento en el sistema simpático en el nodo seno auricular en rata con síndrome metabólico. En el panel superior se muestra la fotografía del nodo testigo y en la parte inferior la fotografía de la fluorescencia del nodo con SM. Gráfica de cuantificación del área de la fluorescencia en el panel inferior. T-student * media \pm desviación estándar.

Alteraciones en las corrientes marcapaso

Se registraron células nodales características es decir las que tuvieron forma de huso y actividad eléctrica espontánea. El número de células (n) fue 16 en ambos casos pero se sacrificaron 13 animales testigo y 10 animales con síndrome metabólico, la capacitancia de las células fue de 63 ± 5 pF en células de animales testigo y de 65 ± 2 pF en las células de animales con SM.

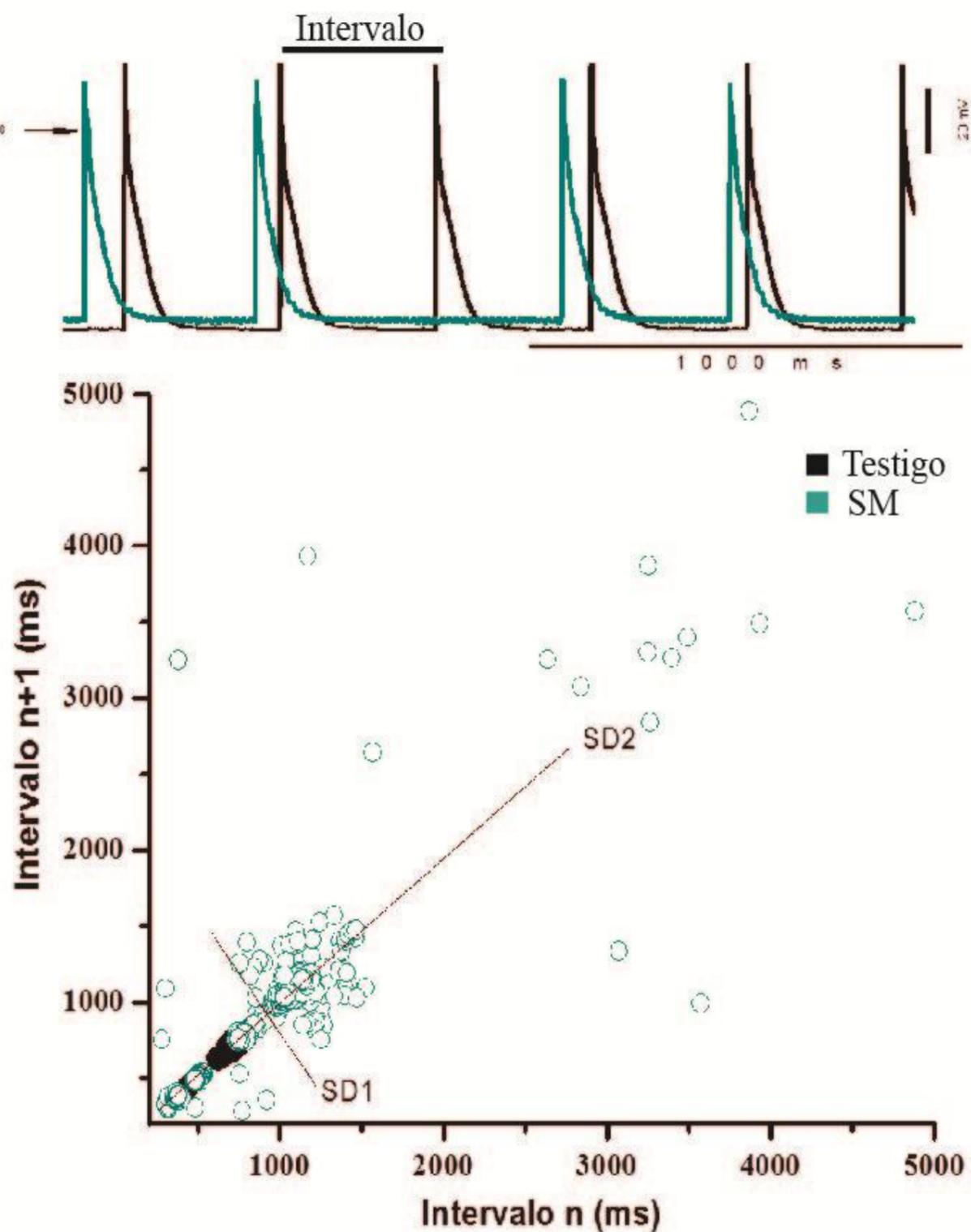


Figura 12. Variabilidad en la actividad eléctrica en el tejido nodal intacto. En panel superior se muestra el registro del PA en condiciones testigo (gris) y con SM (verde). En el inferior el diagrama de Poincaré del intervalo de disparo del nodo SA donde se observa un incremento.

Al hacer la curva corriente vs voltaje de las células del nodo SA de ratas con SM, se encontró un incremento en la densidad de corriente I_f del 200% en los voltajes de -120 y -110, en los siguientes voltajes solo se observó una tendencia a incrementar la corriente sin que fuera significativamente diferente, figura 10.

La corriente marcapaso I_{st} tuvo un aumento en los voltajes de -120 a -60 de aproximadamente un 300%, a los voltajes de -50 a -20 se observó un incremento de la corriente pero sin diferencia significativa. Mientras que la corriente marcapaso I_{kl} solo tuvo una tendencia a disminuir sin cambios significativos, figura 10.

Se ha reportado que en el SM se altera el sistema nervioso autónomo [44], así que utilizamos la tinción de la enzima hidroxilasa de tirosina (TH, por sus siglas en inglés) en el tejido nodal para observar si sucedía lo descrito anteriormente, es decir que encontraríamos un incremento del sistema simpático en este tejido por el SM. En las laminillas del nodo SA de ratas control se observó área con fluorescencia pero en los animales con SM aumentó al 200% el área teñida, ver figura 11.

La enzima TH se encuentra en la vía de síntesis de dopamina que es la precursora de las catecolaminas noradrenalina y adrenalina. Las catecolaminas juegan un papel importante en las corrientes marcapaso ya que producen un aumento del AMPc, el cual modula positivamente al canal de las corrientes marcapaso I_f e I_{st} .

Dinámica del disparo del potencial de acción del nodo seno auricular completo de rata

Como se sabe cualquier cambio en la morfología de la actividad eléctrica o en su propagación podría generar arritmias, por ello analizamos si en el origen del PA había variabilidad así que se graficó el intervalo que hay entre un PA contra el siguiente en un diagrama de Poincaré, véase la figura 10.

Desde el registro se evidencio que había diferencia entre los intervalos de aparición de los PA en los nodos de animales con SM, la media de los intervalos fue de 481 ms en el registro de los nodos testigo y 675 ms en los nodos con SM. El patrón de disparo de los nodos con SM, es decir los intervalos del nodo seno auricular, son semejantes al patrón de intervalos de R-R del ECG registrados en el animal integro lo que nos sugiere que la disminución de la frecuencia cardiaca tiene origen en el nodo.

Otro resultado relevante que observamos en el diagrama de Poincaré de los intervalos interpotencial, fue el incremento de la variabilidad de disparo, es decir que la desviación estándar es impredecible en los animales con SM, ver figura 12. De tal manera que en el diagrama de Poincaré de los animales testigo tenemos en promedio una desviación $SD1 = 4.4$ y $SD2 = 175$, mientras que para los animales con SM la desviación es de $SD1 = 35$; $SD2 = 624$, el coeficiente $SD1/SD2$ en los testigo es de 0.03 y en el tratado es de 0.06, figura 12.

Cabe mencionar que el registro de la actividad eléctrica de los animales con SM se complicó, ya que fue más difícil colocar y mantener el microelectrodo en la célula que registrábamos, por lo que consideramos revisar si había cambios en la matriz extracelular.

Cambios en la matriz extracelular del nodo senoauricular

Por los resultados de los signos clínicos se evidencio que los animales con SM pudieran tener mayor cantidad de lípidos almacenados en las reservas como el tejido graso se incrementó 3 veces su valor comparado con el testigo, otro tejido que está involucrado en la reserva de los lípidos es el musculo por lo cual se hizo la tinción de rojo oleoso al nodo SA y los resultados fueron que la infiltración de lípidos en el nodo se hizo palpable ya que el área de tinción con rojo oleoso fue 3 veces mayor en el animal con SM, el área de tinción en el tejido nodal del animal testigo fue de 0.1 mm^2 , mientras que en el nodo del animal con SM fue de 0.3 mm^2 , figura 13.

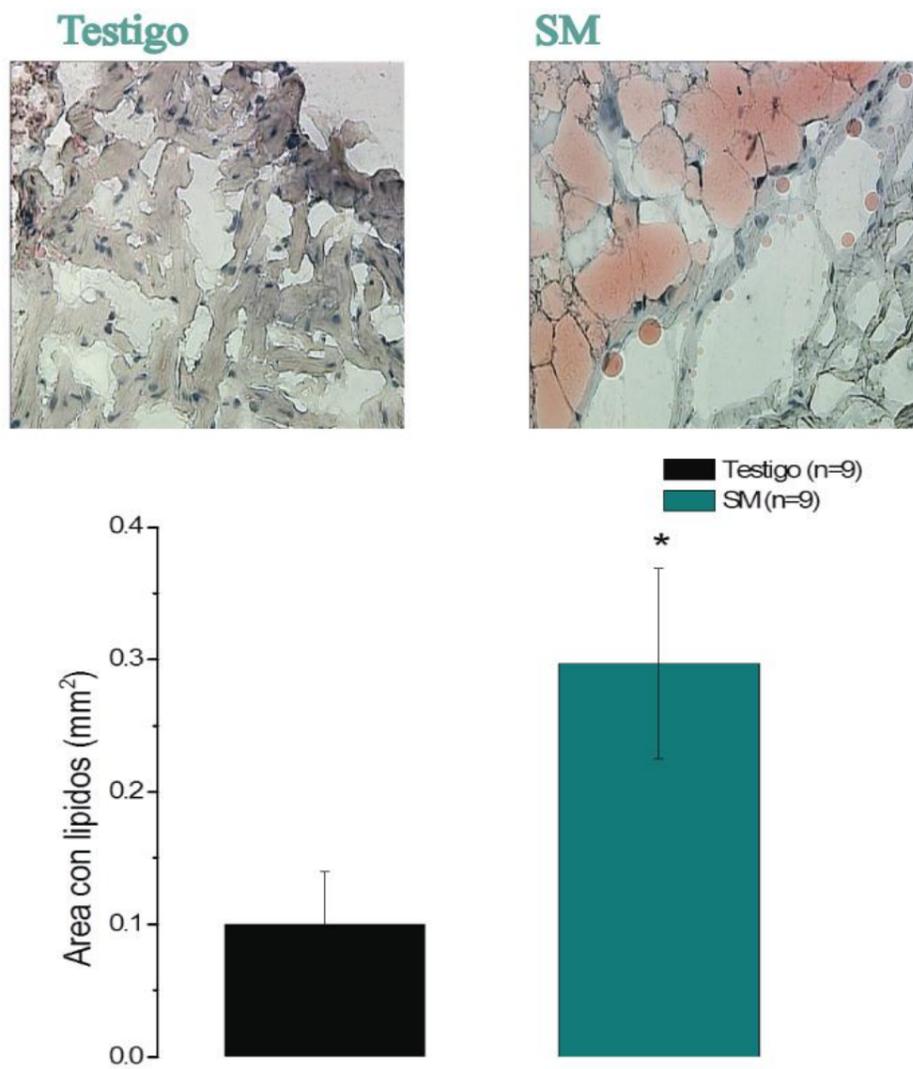


Figura 13. Aumento de lípidos en el nodo SA de rata con síndrome metabólico. Microfotografías de la infiltración de lípidos (área roja) en el tejido nodal (panel superior). En el panel inferior se muestra con una gráfica de barras la cuantificación de los lípidos en el tejido de los animales con SM. T student * media \pm error estándar n = 6.

Modelo animal con 24 semanas de tratamiento

Mediciones morfométricas del modelo animal con síndrome metabólico

En los animales testigo aumento su peso de acuerdo a su edad, pesaron 488 ± 6 g, los animales tratados incrementaron 38% su peso, en la talla no hubo diferencia significativa en las dos poblaciones, los animales testigo midieron 25.5 ± 2 cm y 26.5 ± 2 cm los tratados. Como los animales con SM aumentaron considerablemente de peso, quisimos corroborar que el corazón no sufrió cambios estructurales por esta razón por lo cual pesamos el corazón y lo correlacionamos con el peso del animal. El peso del corazón no sufrió cambios a pesar de que las ratas con SM engordaron, los corazones pesaron 2 ± 0.1 g en los animales testigo y 2.1 ± 0.08 g en los animales con SM, ver la figura 14 y del apéndice la figura 2.

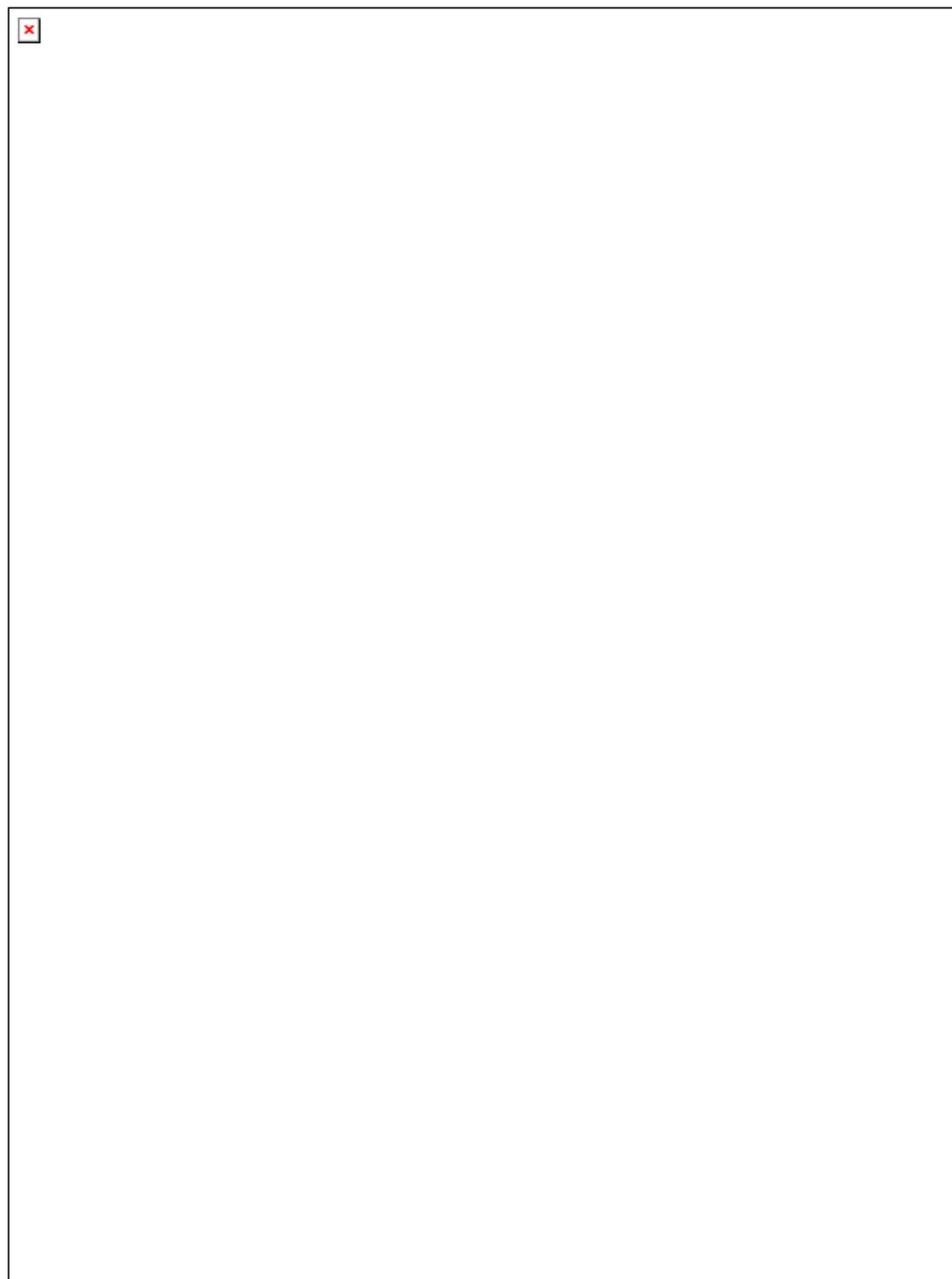


Figura 14. Datos metabólicos medidos en la rata. Panel superior gráfica de CTGI del modelo de ratas con 24 semanas de tratamiento, se observa alteración en el metabolismo de la glucosa desde el minuto cero. Panel inferior tabla resumen de las mediciones morfométricas. *.t de student para datos no pareados $p > 0.05$.

Parámetros bioquímicas que presentaron los animales a las 24 semanas

En la semana 24 del tratamiento, los animales presentaron alteración en la glucosa de ayuno porque tuvieron un incremento en la glucosa del 21% comparado con la glucosa de los animales testigo. También los animales con SM presentaron dislipidemia es decir que hubo un aumento en los triglicéridos y el colesterol mientras que el HDL-c disminuyó, a este tiempo del tratamiento los animales ya no presentaron hiperinsulinemia como los de la semana 8 de tratamiento.

Curva de tolerancia a la glucosa

En la curva de tolerancia a la glucosa se observó alteración en la glucosa ya que los animales con SM presentaron un aumento del 35% desde la glucosa basal o tiempo cero, después de la administración los animales testigo tuvieron el pico máximo a los 15 minutos, lo mismo que los animales con SM, aunque estos presentaron glucosa por arriba de 300 mg/dL de allí y hasta el minuto 60 se mantuvo por arriba de 200 mg/dL. Para el minuto 90 y 120 disminuyó por debajo de la inicial hasta 110 y 115 respectivamente. En los animales testigo para el minuto 60 ya habían disminuido hasta 118 mg/dL para el minuto 90 y 120 ya había regresado al estado basal, figura 14

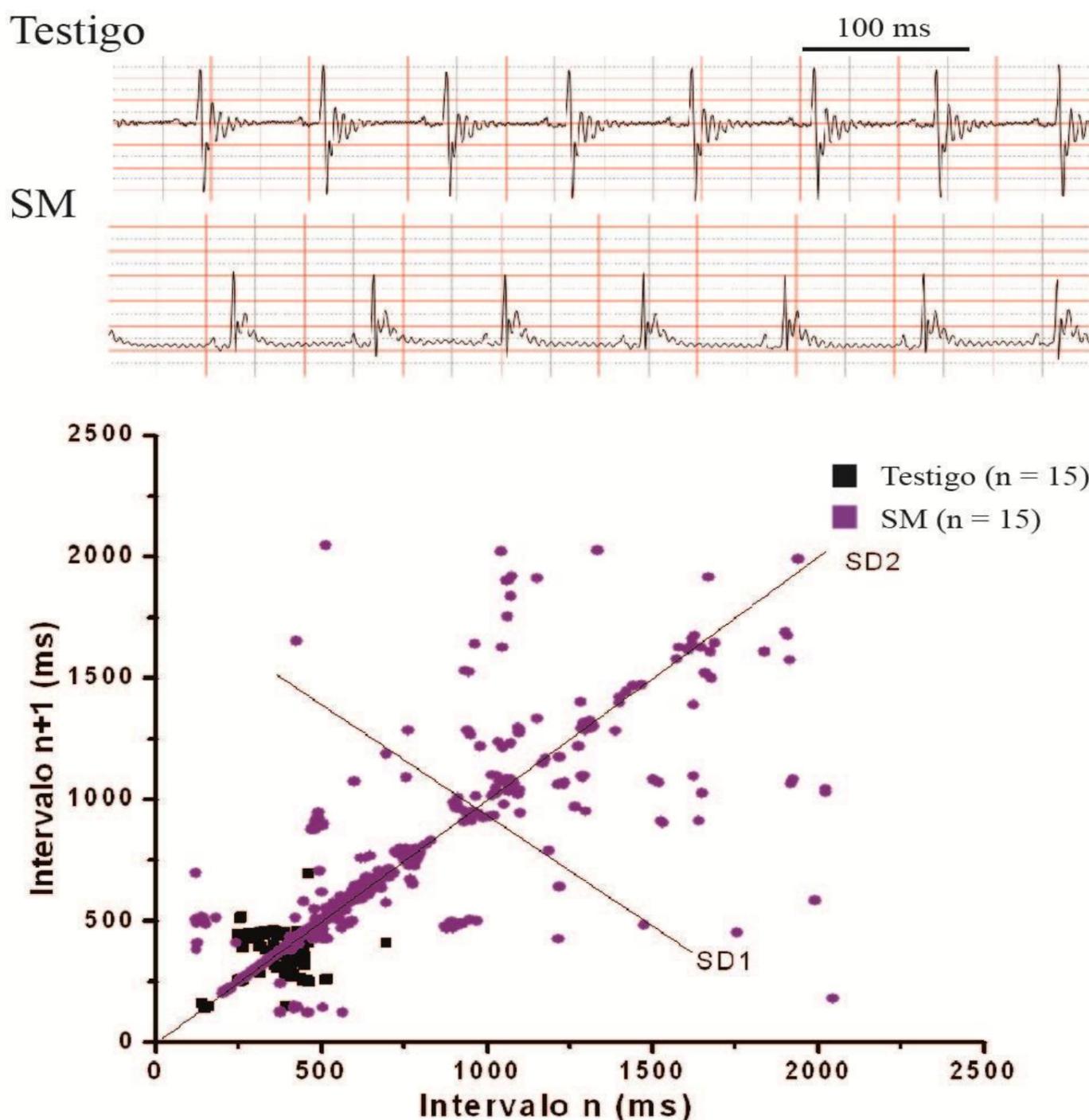


Figura 15 Variabilidad de la actividad eléctrica en el corazón de las ratas. Panel superior, registro del ECG donde se observa una elevación de la onda T. Panel inferior diagrama de Poincaré, donde se observa un aumento en tanto en la SD1 como en la SD2.

Electrocardiograma

En los ECG de los animales testigo de 24 semanas se observó una disminución en la FC comparada con la de los animales testigo de 8 semanas, la FC a las 24 semanas fue de 237 ± 1 latidos/minuto y a la semana 8 de 257 ± 0.8 latidos/minuto. Además se observaron cambios en la morfología del ECG como alargamiento del segmento QT y un aumento en la amplitud de la onda S, comparado con los ECG de los animales testigo de 8 semanas.

Por otro lado el SM provocó una disminución en la FC mayor a esta edad que en los animales con SM de 8 semanas. Ya que los animales con SM tuvieron una FC de 198 ± 1 latidos/min también hubo cambios como una elevación en el segmento ST del ECG.

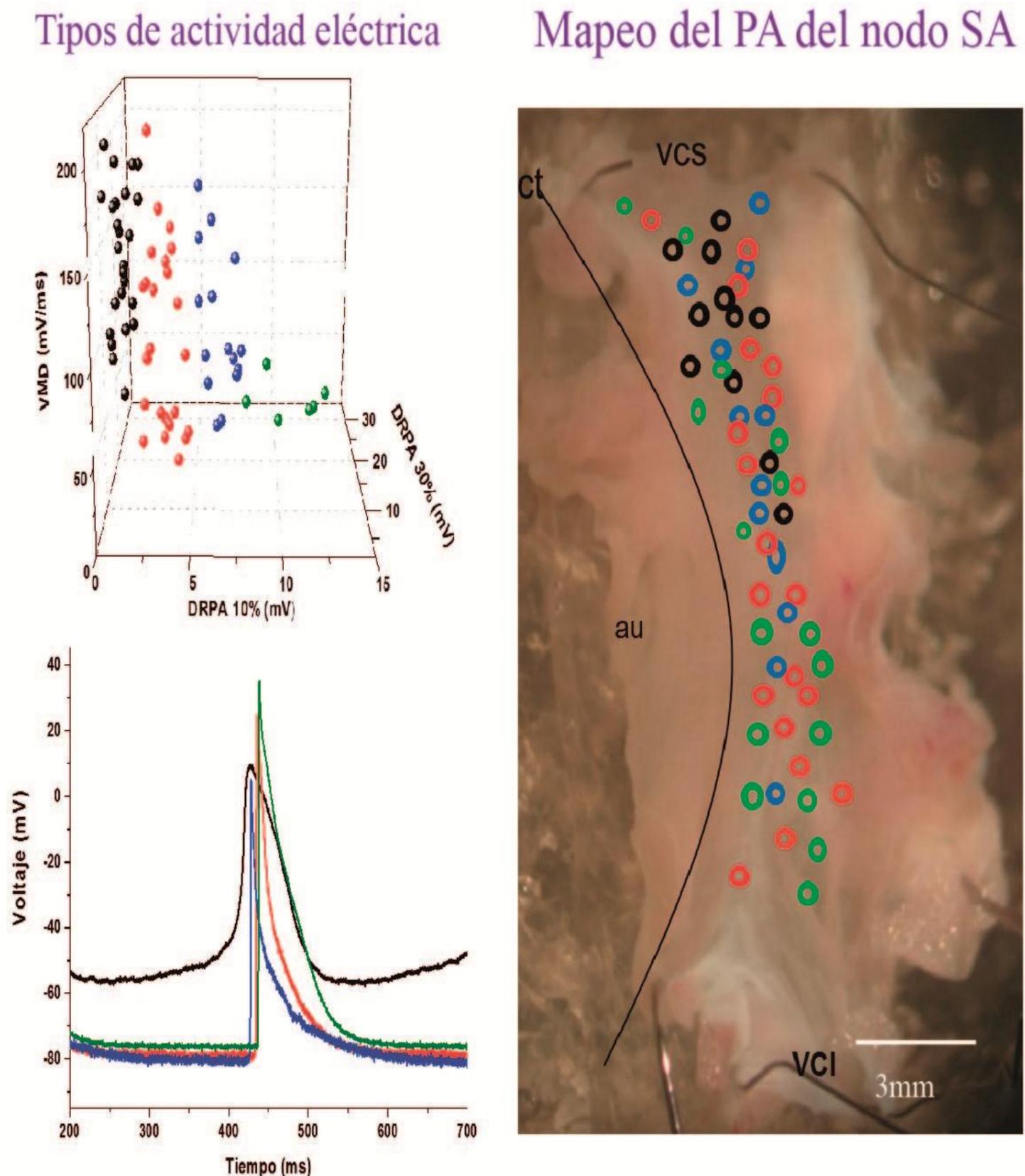


Figura 16 Mapeo y actividad eléctrica del nodo SA con 24 semanas de tratamiento. Panel superior e inferior izquierdo, se observa que se conservaron las 4 poblaciones descritas anteriormente. Panel derecho, la localización de la actividad eléctrica de las 4 poblaciones en el tejido intacto se conservó.

Variabilidad de ritmo cardíaco

Al hacer el diagrama de Poincaré se observó que el intervalo de R a R se vuelve regular en los animales con SM, ya que el 50 % de los datos hacen una línea recta con respecto al eje de SD2 además incrementó el intervalo, por otro lado la dispersión que hay en el eje SD1 es mayor. Los números fueron los siguientes: en animales testigo la SD1 fue de 7 ± 0.4 y la SD2 fue de 28 ± 1 , mientras que en los tratados la SD1 fue de 16 ± 1 y la SD2 69 ± 0.3 , el coeficiente de la desviación estándar es de 0.4 en ambos grupos, figura 15.

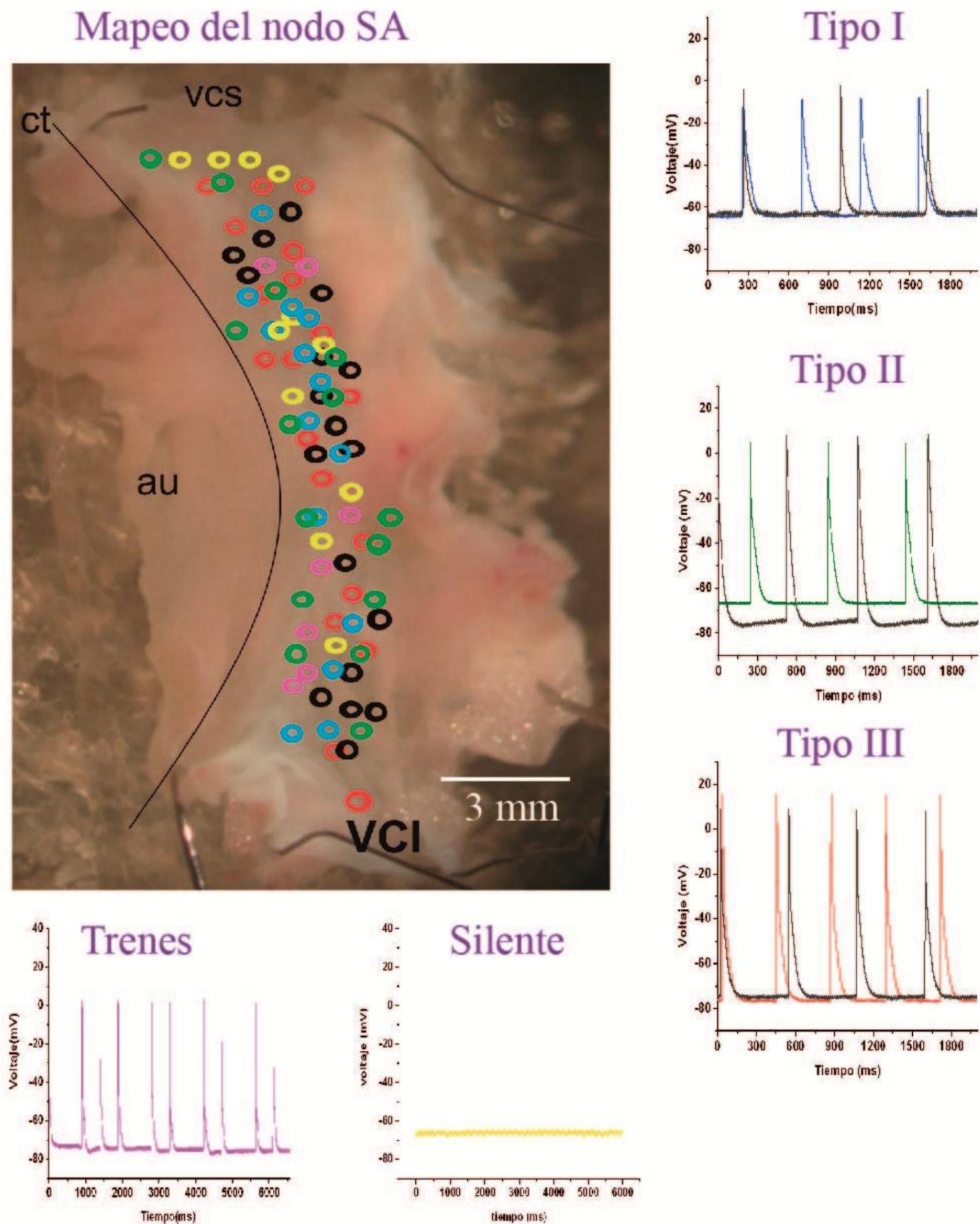


Figura 17. Cambios en la actividad eléctrica por el SM. En el PA tipo I y II se observan cambios en la amplitud y en tipo I en la DRPA al 60% en el tipo II incremento la pendiente de la fase 4 del PA, en la tipo III disminuyo la DRPA al 90%. Se encontraron 2 tipos de actividades extras la silente en amarillo y la de trenes en magenta.

Registro multicelular del nodo seno auricular

Al registrar el tejido multicelular a los 6 meses en animales testigo, estos mostraron las cuatro poblaciones descritas a los 2 meses, la actividad eléctrica tipo I está circunscrita en la vena cava superior y centro del tejido nodal. Los de morfología tipo II, III y VI se encuentran en todo el nodo SA, por lo que no hubo cambios en la topología de la actividad eléctrica en el tejido y la morfología del PA entre el grupo testigo de las 24 semanas, comparada con las testigo de 8 semanas figura 16.

Cambios en el PA de las células del nodo SA en el tejido

Los cambios que se observaron en el PA del nodo SA de los animales con SM a las 24 semanas fueron: En las células tipo I se registró un aumento en la amplitud los testigo tuvieron 65 ± 3 mV, con SM tuvieron 71 ± 5 mV, también en este tipo de PA se registró una disminución en la DRPA al 60% de 39 ± 6 a 29 ± 6 ms.

En las células transicionales tipo II hubo un aumento en la amplitud del PA, los testigos tuvieron 81 ± 3 mV y los animales con SM tuvieron 91 ± 6 mV, otro parámetro que cambio fue la pendiente de la fase 4 en los testigo fue de 1.9 ± 0.2 mV/ms y los animales con SM de 5.8 ± 2 mV/ms.

En la tipo III registramos una disminución en la DRPA al 90% en los animales testigo fue de 80 ± 5 ms y en los animales con SM fue de 69 ± 7 ms, figura 17.

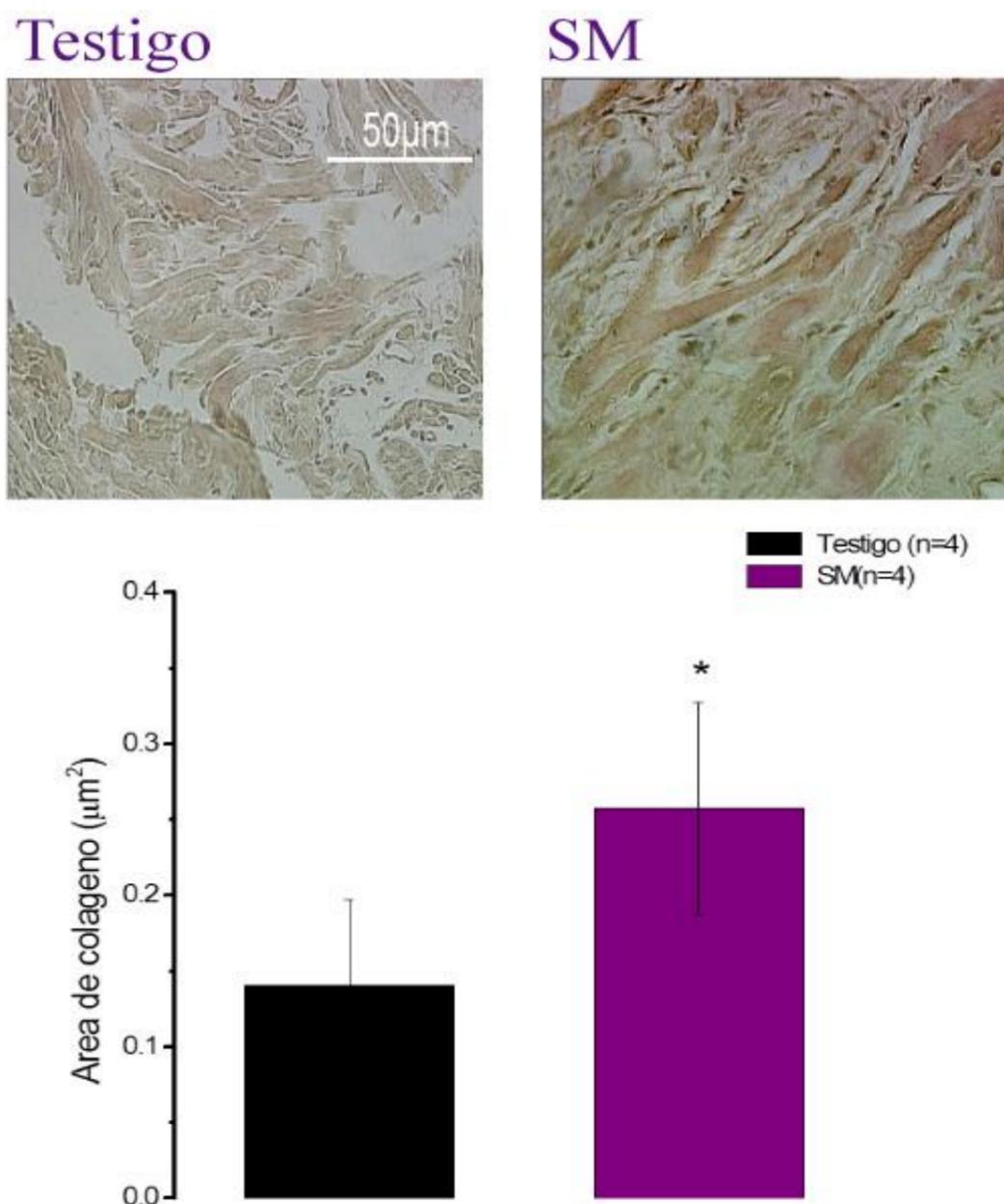


Figura 18 Incremento de colágeno en el tejido nodal. En panel superior se muestran microfotografías del tejido nodal, donde se observa un incremento de colágeno en el tejido. En el panel inferior se observa la gráfica de cuantificación de la tinción de colágeno. *t-student media \pm desviación estándar

Cabe mencionar el tejido nodal a los 6 meses con SM se hizo más duro, ya que al registrar se rompía o tapaba muy fácilmente el microelectrodo. Lo que nos hizo pensar que habría mayor cantidad de tejido conectivo (colágeno y elastina) en la matriz extracelular por la edad del animal, aunque el número de microelectrodo rotos aumentó en los tejidos de los animales con SM, además de acumuló mayor cantidad de lípidos infiltrados en el tejido nodal, figura 18.

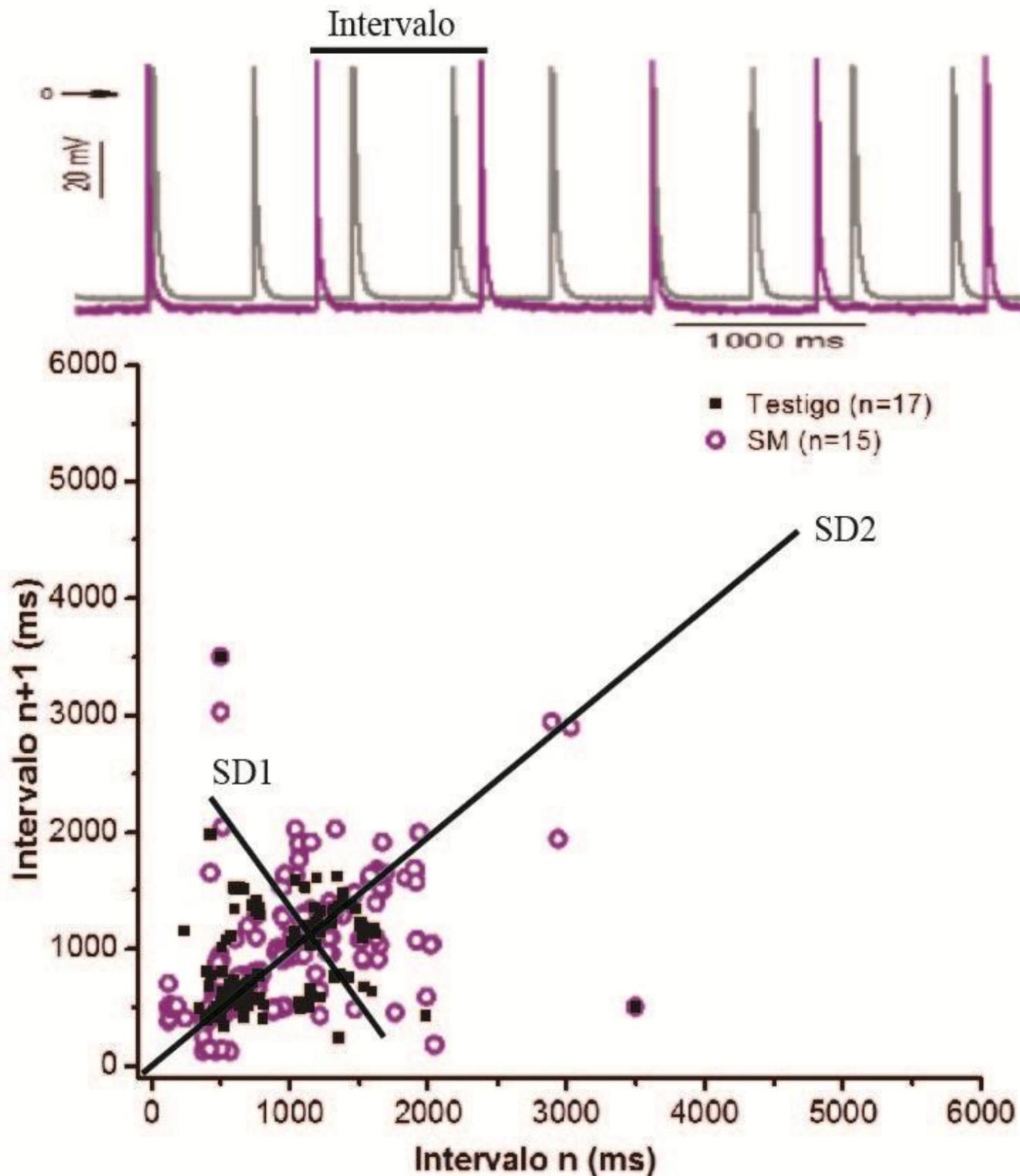


Figura 19 Variabilidad en el disparo del PA en el marcapaso y disminución en la frecuencia de disparo. Registro característico de la actividad eléctrica del nodo SA se observa una disminución de la frecuencia de disparo panel superior. Diagrama de Poincaré donde se observa un incremento en la dispersión de los intervalos R-R en los animales con SM.

Por lo que al hacer la tinción para ácidos grasos observamos en el nodo SA de los animales testigo un área de tinción de 0.05 mm^2 , mientras que en los animales tratados, de 0.3 mm^2 , es decir la infiltración de lípidos en el nodo SA de los animales con SM incrementó 600%. El área de tinción colágeno en el tejido nodal de los animales testigo fue de 0.125 mm^2 , mientras que en los animales tratados fue de 0.26 mm^2 , el porcentaje de aumento fue de 200% figura 18.

Además en la actividad eléctrica se hallaron otros dos tipos diferentes de PA una a la que llamamos silentes y otra en trenes, este tipo de morfología no las podemos considerar como una actividad eléctrica "normal marcapaso", por lo que nosotros creemos que esta actividad es por los cambios en la matriz extracelular. Es decir que el aumento de colágeno e infiltración de adipocitos en la matriz del tejido nodal harían un bloqueo físico de los PA tipo I hacia las células transicionales tipo II, III y IV, provocando la remodelación en la actividad eléctrica en el nodo SA de las ratas con SM [45].

Dinámica del potencial de acción del nodo seno auricular

Al analizar el diagrama de Poincaré de los intervalos de generación de los potenciales de acción donde se incluyeron las 4 poblaciones, la dispersión que presentaron los intervalos tanto en la cuantificación de SD1 como en SD2, en los animales testigo fue de SD1 = 70 y SD2 = 144 con un coeficiente SD1/SD2 de 0.48, mientras que en el nodo SA con SM fue de SD1 = 172 y SD2 = 376, con un coeficiente SD1/SD2 de 0.45, figura 18. De tal manera que en ambos casos se duplica la SD por lo que el coeficiente es muy semejante en ambas condiciones de tratamiento.

La frecuencia promedio nodal de los animales testigo a las 24 semanas disminuyó en comparación con la frecuencia de disparo de los animales con 8 semanas de tratamiento, por otro lado también se observó una disminución en los animales con SM comparado con los animales testigo. La frecuencia de los PA a las 24 semanas en animales testigo fue de 171 ± 50 eventos por minuto y en el tratado de 105 ± 10 eventos por minuto.

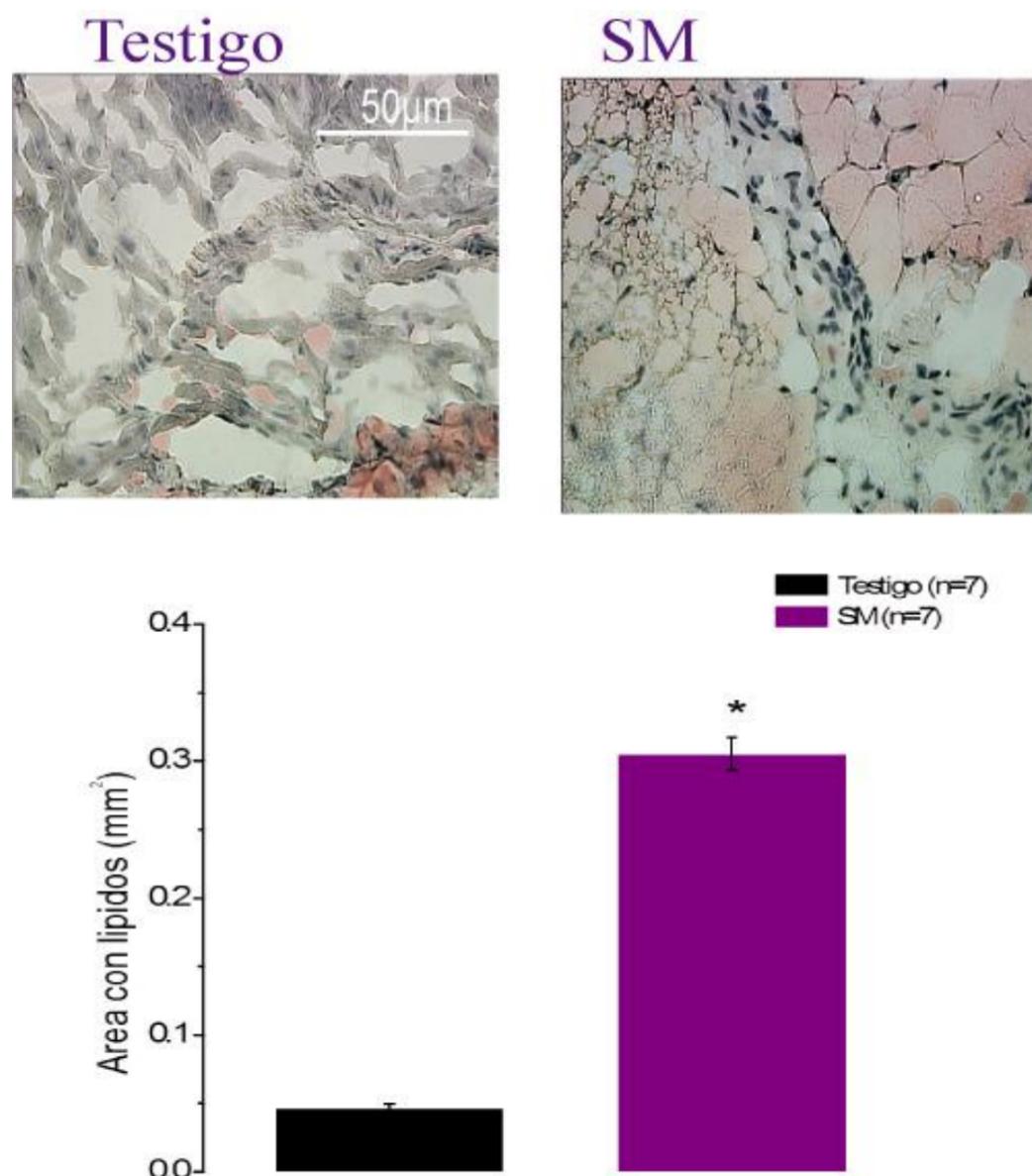


Figura 20 Incremento de la infiltración de lípidos en el tejido nodal. Se observa un incremento en la infiltración tanto en la matriz extracelular alrededor de los miocitos como en los miocitos (panel superior). En el panel inferior se muestra la cuantificación de los lípidos infiltrados. *t-student media \pm desviación estándar.

El síndrome metabólico modifica las corrientes nodales marcapaso y las repolarizantes

Las células nodales utilizadas tuvieron una capacitancia de 75 ± 5 pF en los animales testigo, en los animales con SM tuvieron 70 ± 5 pF. La máxima densidad de corriente I_f fue al voltaje de -120 mV en los animales testigo fue de 0.5 , en los animales con SM fue de 0.35 pA/pF, la inversión de la corriente fue a -40 mV. Las corrientes marcapaso I_{st} e I_{K1} sufrieron una disminución en su densidad de corriente sin diferencia significativa, figura 21.

En el registro del PA del tejido intacto de los animales con SM se reportó un incremento en la amplitud, por lo cual decidimos registrar la corriente I_{to} , al hacer la curva corriente contra voltaje se halló una disminución en el voltaje de máxima corriente a los 50 mV. La I_{to} de los animales testigo fue de 0.37 pA/pF y en las células de animales con SM fue de 0.27 pA/pF, la disminución en la densidad de corriente se observa desde los voltajes de -10 hasta 50 mV, figura 21.

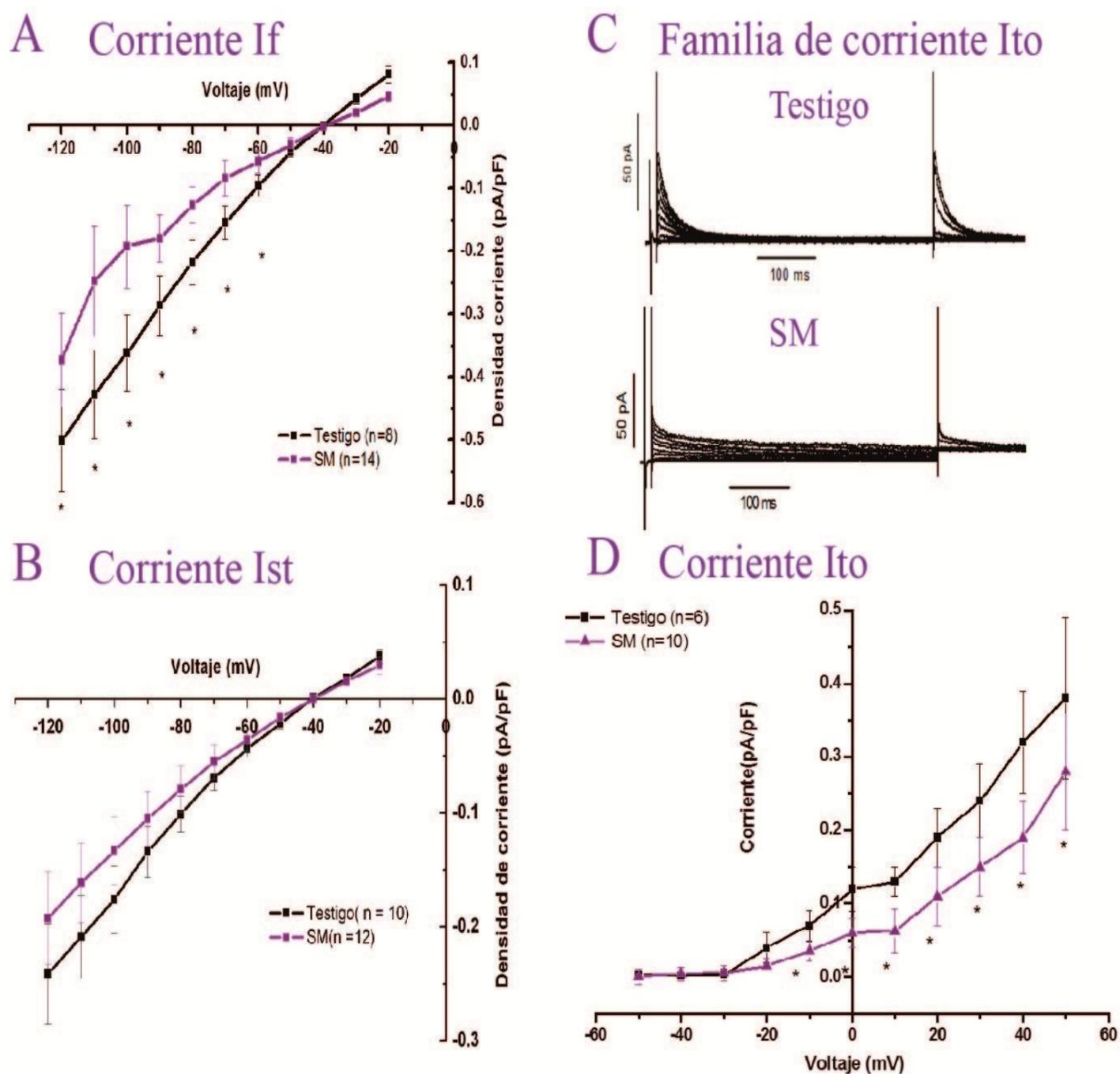


Figura 21. Reducción de las corrientes I_{to} , I_f e I_{st} en las células de los animales con SM con 24 semanas de tratamiento. Curvas corrientes contra voltaje de I_f donde hay una reducción de la corriente con diferencia significativa en los voltajes de -60 a -120 mV, **A**. Mientras que en la corriente I_{st} **B** (panel inferior izquierdo) se observa una reducción en la corriente sin diferencia significativa. En el inciso C se observa una familia de la corriente I_{to} , en el panel superior derecho o D se muestra la curva IV de la corriente de potasio I_{to} donde se registró una reducción en la corriente a partir de los voltajes de -10 a 50 mV en las células de los animales con SM.

Discusión

La sacarosa produce síndrome metabólico

El tratamiento de sacarosa al 20% en el agua de beber por 8 semanas es suficiente para desarrollar un modelo con SM, cuyos signos son semejantes a los que se presentan en el humano. Este modelo presenta la ventaja de que las ratas *Wistar* no tienen la carga genética para el desarrollo de diabetes, ni las variantes en la alimentación como en los humanos.

El SM inducido en las ratas produce alteración en el metabolismo de la glucosa, similar al que se produce en los humanos ya que el deterioro es progresivo. Siguiendo los criterios de la ECDCD¹¹ y según los resultados mostrados los animales de 8 semanas tienen alteración en el metabolismo de la glucosa de ayuno mientras que los animales de 24 semanas ya presentan intolerancia a la glucosa, ver figura 6 y 14 [26].

La remodelación que tiene el corazón en los pacientes con problemas metabólicos está atribuida en general a los daños en el sistema vascular, sobre todo está relacionado con la hipertensión [26,27], los animales con SM en este trabajo solo presentan una discreta hipertensión [37], por lo cual este dato no se relaciona con la alteración eléctrica en el nodo de los animales con SM. Por lo que la alteración en el metabolismo de la glucosa es el origen de los cambios eléctricos sobre el nodo SA.

En los animales de 24 semanas de tratamiento se observa mejor la dislipidemia ya que a este tiempo, aumenta la concentración de los triglicéridos en plasma, este hecho incrementa la probabilidad de padecer diabetes mellitus y enfermedades cardiovasculares.

La dislipidemia junto con la discreta hipertensión que presentan los animales con SM podrían provocar hipertrofia ventricular cardíaca, por lo cual se pesó el corazón y se midieron los ventrículos, corroborando así que la mediana hipertensión [37] no cambia el tamaño de los ventrículos (véase figura 1 del apéndice) es decir que los cambios en la actividad eléctrica que observamos en este trabajo son independientes de las posibles enfermedades vasculares [46].

El síndrome metabólico provoca arritmias cardíacas

La frecuencia cardíaca (FC) es un parámetro que nos indica el funcionamiento del corazón, conforme avanza la edad del individuo la FC va disminuyendo [47]. Como se observó en los resultados las ratas de 8 semanas con SM tuvieron una FC similar a la causada por el envejecimiento en los animales testigo de 24 semanas y en los animales tratados a ese tiempo el SM exacerbó la bradicardia. Además se observan arritmias ventriculares probablemente provocadas por los cambios en el ritmo cardíaco [48], ya que se presentó la bradicardia pero no hubo alargamiento del intervalo QT del ECG, pero sí un alargamiento en el intervalo PR, por lo que proponemos que la bradicardia presente en los animales con SM es por la disminución en la frecuencia de disparo espontánea vista en el nodo SA intacto.

La elevación descrita en el segmento ST del ECG de los animales testigo a las 24 semanas, puede ser por la repolarización precoz o temprana de los ventrículos, este fenómeno sucede fisiológicamente en algunos pacientes sin causar arritmias mortales [49].

Cambios el ritmo sinusal por el síndrome metabólico

Los cambios que produce el SM sobre la morfología de los PA transicionales permite una semejanza con los PA centrales, además los PA transicionales se encuentran en áreas donde solo se hallaban las células centrales. Este fenómeno puede generar la confusión de que los PA centrales aumentan y migran hacia otras áreas cambiando el sitio marcapaso como lo describió Boyett y cols. para ratas con envejecimiento. Sin embargo lo que nos ayuda a esclarecer la confusión es la caracterización de la actividad eléctrica, que nos permite diferenciar particularmente entre PA centrales y aunque el SM produzca grandes cambios morfológicos sobre el PA. Entonces con nuestros resultados demostramos que solo cambió la morfología del PA sin cambiar el sitio marcapaso [43], estos cambios incrementan la probabilidad de arritmias supra ventriculares.

Otros cambios presentados en el tejido nodal por el SM que contribuyen al aumento de arritmias supra ventriculares como síndrome del nodo enfermo y fibrilación auricular [50,51] fueron la disminución en la frecuencia de disparo, la variabilidad del disparo espontánea y el incremento de la desviación estándar, también estos resultados nos sugiere que las arritmias ventriculares observadas en el ECG inician desde el nodo SA.

¹¹ ECDC European Center for Disease Prevention and Control

Otras células que se vieron afectadas por el SM fueron los fibroblastos estas son células de soporte que hacen posible una restauración rápida de la matriz extracelular, también son imprescindibles para la propagación eléctrica. En el nodo SA, los fibroblastos que están alrededor de los cardiomiocitos forman un patrón de propagación del disparo único anisotrópico [52], que se da a través de una abundante presencia de conexinas entre los cardiomiocitos y fibroblastos [53,54]. Según la evidencia presentada en este trabajo es que la matriz extracelular efectivamente juega un papel importante en la propagación del PA en el tejido nodal. El incremento del colágeno en la matriz no solo genera fibrosis en el tejido si no que cambia los patrones de disparo de los PA.

Además los lípidos infiltrados en el tejido nodal también podrían generar un cambio en el patrón de disparo y en la propagación de la actividad eléctrica de las células centrales hacia las periféricas, aumentando la probabilidad de arritmias de reentrada sinusales, generadas por focos ectópicos en nodo y tejido auricular. La acumulación de colágeno y lípidos en la matriz extracelular del tejido nodal forma una barrera física que puede generar bloqueos de la propagación de PA del nodo hacia las aurículas provocando extrasístoles auriculares que se propagan hasta los ventrículos incrementando la probabilidad de la génesis de una arritmia por cambio en el patrón de propagación [55] como las observadas en los animales con SM.

Los fibroblastos con señales adecuadas, como un incremento en la concentración de insulina, pueden producir adipogénesis [56] entonces donde antes había tejido de conducción (fibroblasto con fibroblasto o fibroblasto con cardiomiocito) ahora hay tejido no conductor (fibroblasto y adipocito) que no permite la propagación adecuada del PA, produciendo de esta manera la barrera física antes mencionada.

El patrón de disparo y la propagación del PA en el nodo SA sigue la teoría de dos osciladores acoplados, el primer oscilador (zona central) que comanda al segundo (zona transicional), la propagación de la actividad es en forma craneal (elíptica) [5], si el origen y la frecuencia del oscilador primario cambia, genera nuevos patrones de disparo en el oscilador secundario [55] como focos ectópicos, el desacoplamiento de los dos osciladores genera bloqueos en la propagación de tal manera que cada célula iniciaría su propio ritmo figura 8 y 15 como consecuencia un nuevo patrón de disparo [55] generando nuevos osciladores desacoplados. Al no propagarse la señal nos daría como consecuencia una disminución en la frecuencia de disparo nodal por lo tanto una disminución en el ritmo cardíaco.

En el modelo de 24 semanas la disminución en la frecuencia de disparo por bloqueos en el nodo SA de los animales con SM, lo atribuimos al aumento de colágeno por la edad más el incremento de colágeno por el tratamiento, tal fue el cambio en la matriz extracelular que se produjeron zonas donde la actividad era “silente”, es decir que aunque se le colocará un estímulo externo no era excitable en esa zona (figura 17). La morfología de PA de trenes que registramos en el nodo SA de animales con SM creemos que es por el incremento en la infiltración de lípidos en la matriz extracelular y el cambio en el acoplamiento entre el miocito con fibroblasto a miocito con adipocito.

Cambios en la actividad eléctrica en célula única

Tradicionalmente la corriente marcapaso es la corriente I_f [57], pero ahora se sabe que la corriente I_{st} e I_{k1} también juegan un papel importante en la actividad eléctrica espontánea del nodo SA en rata [58]. Pero recientes investigaciones nos dan a otro mecanismo importante a considerar que es el reloj de calcio relacionado con la corriente de calcio tipo L. Los cambios en la pendiente de la fase 4 pueden ser por cambios intrínsecos en las corrientes I_{k1} , I_{st} e I_f o por los cambios en la matriz extracelular que sufrió el tejido de los animales con SM.

La infiltración de ácidos grasos que generan la barrera física, desacoplan las células promoviendo la generación de PA en las zonas de propagación, de tal manera que se genera en los PA transicionales un aumento en la pendiente de la fase 4. La aparición de la pendiente en estas células genera un nuevo oscilador tomando su propio ritmo de disparo. El incremento en la pendiente de la fase 4 nos hizo pensar que tendríamos un incremento en las corrientes I_{st} e I_f o una disminución en la corriente I_{k1} , porque se ha reportado que cuando la densidad de la corriente I_{k1} es muy grande, mimetiza a la corriente marcapaso I_f , y como se reportó en este trabajo efectivamente encontramos un incremento tanto en I_{st} como en I_f sin cambios en I_{k1} en las células de los animales con SM.

Por otro lado, se ha propuesto que el aumento de ácidos grasos incrementa la densidad de corrientes hiperpolarizantes [59], entonces como se observó en el nodo SA de las ratas con SM hay 300 veces más infiltración de ácidos grasos, ese podría ser la otra razón por lo cual incrementaron la densidad de las corrientes por lo tanto la pendiente de la fase 4. También el aumento de la inervación regula la corriente I_f y la I_{st} en ambos casos las aumenta.

En el modelo de 8 semanas con SM tienen hiperinsulinemia, lo cual podría inducir la activación de PKC regulando a la alta la corriente I_f , además podría activarse el diacil glicerol y el 1, 4, 5 inositol trifosfato los cuales regulan el calcio intracelular regulando a la alta la corriente I_{st} . Otro elemento que nos indicaría que el calcio intracelular está viéndose afectado es la disminución en la velocidad máxima de despolarización del PA en las células centrales del nodo SA.

Tanto el incremento en la pendiente de la fase 4 como el aumento de las dos corrientes marcapaso nos daría como resultado un incremento en la frecuencia de disparo en el nodo SA, sin embargo en promedio la frecuencia disminuyó, este resultado aunque parece contradictorio se explicaría con el desacoplamiento de los dos osciladores, por el cambio en la morfología del PA o por el cambio de ritmo. Además del aumento en colágeno juega el papel de aislante en el nodo SA, produciendo de esta manera bloqueos en la propagación del PA dando como resultado la disminución de la frecuencia cardíaca.

En los animales de 24 semanas con SM creemos que el aumento en la amplitud del potencial de acción producto de la disminución de la corriente de potasio I_{to} , disminuye la DRPA produciendo la disminución de la frecuencia de disparo [23] nodal. Por otro lado se sabe que al disminuir la I_{tof} el corazón presenta menor vulnerabilidad de presentar taquicardias ventriculares [60], lo que nos hace suponer que es un mecanismo de defensa por el aumento de probabilidad de arritmias.

Se tiene que remarcar que en la semana 8 de tratamiento los animales con SM no presentaron cambios en la amplitud del PA por lo que no fue necesario el registro de la corriente I_{to} a este tiempo. Este último punto nos indicaría que el SM afecta a diferentes niveles el tejido nodal del corazón logrando remodelar tanto la propagación y morfología de la actividad eléctrica cardíaca.

Conclusiones

Este trabajo fue el parte aguas para destacar que la arritmias ventriculares mortales puede tener su origen en el nodo SA y propagarse hacia aurículas hasta a llegar a ventrículo [61].

1. La actividad eléctrica del nodo SA es diferente en la rata, con respecto al conejo que es la especie más estudiada, pero funcionalmente es muy semejante a la del humano, ya que cualquier alteración en la actividad eléctrica es suficiente para generar arritmias.
2. El modelo animal permitió estudiar los cambios intrínsecos de la actividad eléctrica del marcapaso natural, independiente de los cambios vasculares.
3. También permitió observar la remodelación en la actividad eléctrica en el curso temporal del SM.
4. Por otro lado el SM produce cambios morfológicos funcionales, que remodelan la actividad eléctrica del nodo SA dando como resultado un incremento en la susceptibilidad a sufrir arritmias sinusales que pueden propagarse y dar origen a arritmias letales.
5. La disminución del ritmo cardíaco "bradiarritmia" producida en el nodo SA, se propaga hacia las aurículas y ventrículos provocando tanto arritmias supraventriculares como ventriculares.
6. El SM no solo produce en el nodo sinusal remodelación eléctrica, si no también remodelación en la matriz extracelular, lo que nos sugiere que ambas remodelaciones nos aumentan la probabilidad de arritmias.
7. Los cambios tanto eléctricos como morfológicos en el nodo sinusal aumentan la probabilidad de arritmias de reentrada que pueden terminar en muerte súbita, aunque no se incluyó en los resultados hubo un 5% de deceso en los animales con 24 semanas de tratamiento sin causa aparente.
8. Este trabajo es el inicio de la búsqueda de los cambios que produce el SM sobre el marcapaso natural del corazón y los mecanismos por los cuales se producen esos cambios.
9. Finalmente se demuestra que está presente la corriente I_{to} en el potencial de acción del nodo SA de la rata.

Referencias

1. Fuster V, Bansilal S (2010) Promoting cardiovascular and cerebrovascular health. *Stroke* 41: 1079-1083.
2. American Physiological Society (1887-), Berne RM, Sperelakis N, Geiger SR (1979) *The cardiovascular system. Vol. I, The Heart.* Bethesda, Md: American Physiological Society. vii, 970 p. p.
3. Bers DM (2002) Cardiac excitation-contraction coupling. *Nature* 415: 198-205.
4. Issa ZF, Miller JM, Zipes DP (2012) *Clinical arrhythmology and electrophysiology : a companion to Braunwald's heart disease.* Philadelphia, Pa. ; London: Saunders.
5. Boyett MR, Honjo H, Yamamoto M, Nikmaram MR, Niwa R, et al. (1998) Regional differences in effects of 4-aminopyridine within the sinoatrial node. *Am J Physiol* 275: H1158-1168.
6. Sutyagin PV, Kamkin AG, Gurina OY (2009) Main Regularities of Mutual Location of Different Pacemaker Cells in the Rat Heart Sinoatrial Node. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 148: 452-454.
7. Camelliti P, Green CR, LeGrice I, Kohl P (2004) Fibroblast network in rabbit sinoatrial node: structural and functional identification of homogeneous and heterogeneous cell coupling. *Circ Res* 94: 828-835.
8. Fozzard HA (1991) *The Heart and cardiovascular system : scientific foundations.* New York: Raven Press.
9. Zipes DP, Rahimtoola SH, American Heart Association., American College of Cardiology. (1987) State-of-the-art consensus conference on electrophysiologic testing in the diagnosis and treatment of patients with cardiac arrhythmias. Dallas: American Heart Association. 199 p. p.
10. Weissenburger J, Nesterenko VV, Antzelevitch C (2000) Transmural heterogeneity of ventricular repolarization under baseline and long QT conditions in the canine heart in vivo: torsades de pointes develops with halothane but not pentobarbital anesthesia. *J Cardiovasc Electrophysiol* 11: 290-304.
11. Antzelevitch C (2001) Transmural dispersion of repolarization and the T wave. *Cardiovasc Res* 50: 426-431.
12. Zipes DP, Jalife J (2004) *Cardiac electrophysiology : from cell to bedside.* Philadelphia: Saunders. xvi, 1144 p. p.
13. Priori SG, Zipes DP (2006) *Sudden cardiac death : a handbook for clinical practice.* Malden, Mass.: Blackwell Futura. x, 292 p. p.
14. Karmakar CK, Khandoker AH, Gubbi J, Palaniswami M (2009) Defining asymmetry in heart rate variability signals using a Poincare plot. *Physiological Measurement* 30: 1227-1240.
15. Rajendra Acharya U, Paul Joseph K, Kannathal N, Lim CM, Suri JS (2006) Heart rate variability: a review. *Med Biol Eng Comput* 44: 1031-1051.
16. Rajendra Acharya U, Subbanna Bhat P, Kannathal N, Choo Min L, Laxminarayan S (2005) Cardiac Health Diagnosis using Wavelet Transformation and Phase Space Plots. *Conf Proc IEEE Eng Med Biol Soc* 4: 3868-3871.
17. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A (2000) The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *The Journal of Physiology* 523: 593-605.
18. Nerbonne JM, Guo W (2002) Heterogeneous expression of voltage-gated potassium channels in the heart: roles in normal excitation and arrhythmias. *J Cardiovasc Electrophysiol* 13: 406-409.
19. Bleeker WK, Mackaay AJ, Masson-Pévet M, Bouman LN, Becker AE (1980) Functional and morphological organization of the rabbit sinus node. *Circulation Research* 46: 11-22.
20. Sutyagin PV, Kalinina EE, Pylaev AS (2005) Morphofunctional organization of sinoatrial node in rat heart. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine* 139: 256-259.
21. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A (2000) The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *J Physiol* 523 Pt 3: 593-605.
22. Haffner S, Taegtmeier H (2003) Epidemic obesity and the metabolic syndrome. *Circulation* 108: 1541-1545.
23. Meyer U, Schindler C, Bloesch T, Schmockler E, Zahner L, et al. (2014) Combined Impact of Negative Lifestyle Factors on Cardiovascular Risk in Children: A Randomized Prospective Study. *J Adolesc Health.*
24. Bloomgarden ZT (2004) The 1st World Congress on the Insulin Resistance Syndrome. *Diabetes Care* 27: 602-609.
25. Alberti KGMM, Zimmet P, Shaw J (2005) The metabolic syndrome - a new worldwide definition. *Lancet* 366: 1059-1062.
26. Wilson PW, Grundy SM (2003) The metabolic syndrome: a practical guide to origins and treatment: Part II. *Circulation* 108: 1537-1540.
27. Wilson PW, Grundy SM (2003) The metabolic syndrome: practical guide to origins and treatment: Part I. *Circulation* 108: 1422-1424.
28. Alberti KG, Zimmet P, Shaw J (2006) Metabolic syndrome--a new world-wide definition. A Consensus Statement from the International Diabetes Federation. *Diabet Med* 23: 469-480.
29. Forte V, Pandey A, Abdelmessih R, Forte G, Whaley-Connell A, et al. (2012) Obesity, Diabetes, the Cardiorenal Syndrome, and Risk for Cancer. *Cardiorenal Med* 2: 143-162.
30. Pouliot MC, Despres JP, Lemieux S, Moorjani S, Bouchard C, et al. (1994) Waist circumference and abdominal sagittal diameter: best simple anthropometric indexes of abdominal visceral adipose tissue accumulation and related cardiovascular risk in men and women. *Am J Cardiol* 73: 460-468.
31. Schnabel RB, Larson MG, Yamamoto JF, Kathiresan S, Rong J, et al. (2009) Relation of multiple inflammatory biomarkers to incident atrial fibrillation. *Am J Cardiol* 104: 92-96.
32. Schnabel RB, Sullivan LM, Levy D, Pencina MJ, Massaro JM, et al. (2009) Development of a risk score for atrial fibrillation (Framingham Heart Study): a community-based cohort study. *Lancet* 373: 739-745.
33. Isomaa B, Almgren P, Tuomi T, Forsen B, Lahti K, et al. (2001) Cardiovascular morbidity and mortality associated with the metabolic syndrome. *Diabetes Care* 24: 683-689.
34. Corbi GM, Carbone S, Ziccardi P, Giugliano G, Marfella R, et al. (2002) FFAs and QT intervals in obese women with visceral adiposity: effects of sustained weight loss over 1 year. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2080-2083.
35. Van Herendael H, Garcia F, Lin D, Riley M, Bala R, et al. (2011) Idiopathic right ventricular arrhythmias not arising from the outflow tract: prevalence, electrocardiographic characteristics, and outcome of catheter ablation. *Heart Rhythm* 8: 511-518.
36. Lin YH, Shah S, Salem N, Jr. (2011) Altered essential fatty acid metabolism and composition in rat liver, plasma, heart and brain after microalgal DHA addition to the diet. *J Nutr Biochem* 22: 758-765.
37. Larque C, Velasco M, Navarro-Tableros V, Duhne M, Aguirre J, et al. (2011) Early endocrine and molecular changes in metabolic syndrome models. *IUBMB Life* 63: 831-839.
38. Panchal SK, Brown L (2011) Rodent models for metabolic syndrome research. *J Biomed Biotechnol* 2011: 351982.
39. Caillier B, Pilote S, Patoine D, Levac X, Couture C, et al. (2012) Metabolic syndrome potentiates the cardiac action potential-prolonging action of drugs: a possible 'anti-proarrhythmic' role for amlodipine. *Pharmacological Research* 65: 320-327.
40. Kipshidze NN, Katsitadze GA, Khosroshvili LB (2005) [Effect of the metabolic syndrome on the electrophysiological parameters of the heart]. *Georgian Med News:* 9-13.
41. Lakka HM, Laaksonen DE, Lakka TA, Niskanen LK, Kumpusalo E, et al. (2002) The metabolic syndrome and total and cardiovascular disease mortality in middle-aged men. *JAMA* 288: 2709-2716.
42. Verheijck EE, Wilders R, Joyner RW, Golod DA, Kumar R, et al. (1998) Pacemaker synchronization of electrically coupled rabbit sinoatrial node cells. *Journal of General Physiology* 111: 95-112.
43. Yanni J, Tellez JO, Sutyagin PV, Boyett MR, Dobrzynski H (2010) Structural remodelling of the sinoatrial node in obese old rats. *J Mol Cell Cardiol* 48: 653-662.
44. Straznicki NE, Grima MT, Sari CI, Eikelis N, Lambert GW, et al. (2014) A randomized controlled trial of the effects of pioglitazone treatment on sympathetic nervous system activity and cardiovascular function in obese subjects with metabolic syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 99: E1701-1707.
45. Rohr S (2004) Role of gap junctions in the propagation of the cardiac action potential. *Cardiovasc Res* 62: 309-322.
46. Guerra F, Mancinelli L, Angelini L, Fortunati M, Rappelli A, et al. (2011) The association of left ventricular hypertrophy with metabolic syndrome is dependent on body mass index in hypertensive overweight or obese patients. *PLoS One* 6: e16630.
47. Fox JG (1985) *Laboratory animal medicine. Changes and challenges.* Cornell Vet 75: 159-170.
48. Corino VDA, Matteucci M, Cravello L, Ferrari E, Ferrari AA, et al. (2006) Long-term heart rate variability as a predictor of patient age. *Computer Methods and Programs in Biomedicine* 82: 248-257.
49. Schmied C, Di Paolo FM, Zerguini AY, Dvorak J, Pelliccia A (2013) Screening athletes for cardiovascular disease in Africa: a challenging experience. *Br J Sports Med* 47: 579-584.

50. Lin Y-K, Chen Y-J, Chen S-A (2010) Potential atrial arrhythmogenicity of adipocytes: Implications for the genesis of atrial fibrillation. *Medical Hypotheses* 74: 1026-1029.
51. Larson ED, St Clair JR, Sumner WA, Bannister RA, Proenza C (2013) Depressed pacemaker activity of sinoatrial node myocytes contributes to the age-dependent decline in maximum heart rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 18011-18016.
52. Camelliti P, Green C, LeGrice I, Kohl P (2004) Fibroblast Network in Rabbit Sinoatrial Node. *Circulation Research* 94: 828-835.
53. Camelliti P, Borg TK, Kohl P (2005) Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts. *Cardiovasc Res* 65: 40-51.
54. Verheule S, van Kempen MJA, Postma S, Rook MB, Jongasma HJ (2001) Gap junctions in the rabbit sinoatrial node. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology* 280: H2103-H2115.
55. Budelli R, Torres J, Catsigeras E, Enrich H (1991) Two-neurons network. I. Integrate and fire pacemaker models. *Biol Cybern* 66: 95-101.
56. Matsuda M, Korn BS, Hammer RE, Moon YA, Komuro R, et al. (2001) SREBP cleavage-activating protein (SCAP) is required for increased lipid synthesis in liver induced by cholesterol deprivation and insulin elevation. *Genes Dev* 15: 1206-1216.
57. DiFrancesco D (2010) The Role of the Funny Current in Pacemaker Activity. *Circulation Research* 106: 434-446.
58. Shinagawa Y, Satoh H, Noma A (2000) The sustained inward current and inward rectifier K⁺ current in pacemaker cells dissociated from rat sinoatrial node. *Journal of Physiology-London* 523: 593-605.
59. Deng W, Bukiya AN, Rodriguez-Menchaca AA, Zhang Z, Baumgarten CM, et al. (2012) Hypercholesterolemia induces up-regulation of K_{ACh} cardiac currents via a mechanism independent of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and Gbetagamma. *Journal of Biological Chemistry* 287: 4925-4935.
60. Speerschnieder T, Grubb S, Metoska A, Olesen SP, Calloe K, et al. (2013) Development of Heart Failure is Independent of KChIP2 Expression. *J Physiol*.
61. Soltysinska E, Speerschnieder T, Winther SV, Thomsen MB (2014) Sinoatrial node dysfunction induces cardiac arrhythmias in diabetic mice. *Cardiovasc Diabetol* 13: 122.

Apéndice

Tabla A1. Soluciones utilizadas para el registro de la actividad eléctrica del nodo seno auricular. Solución-Brüe (KB), solución externa normal (SEN), solución calcio-cobalto (CaCo).

Sal, droga	Tyrode multicelular (mM)	Tyrode célula (mM)	Tyrode 0 Ca+2 (mM)	KB (mM)	CaCo (mM)	SEN (mM)	Interna (mM)
NaCl	124	118	118		136	136	
KCl	5.4	5.4	5.4	40	4	4	40
MgCl ₂	1.05	1.05	1.05		2	2	
NaHCO ₃	24	24	24				
NaH ₂ PO ₄	0.42	0.42	0.42				
glucosa	11	11	11		11	11	
CaCl ₂	1.8	1.8			0.1	1.8	
taurina		10	10	20			
Glutamato de potasio				80			
HEPES				10		10	10
Creatina				0.5			
EGTA				10			10
MgSO ₄				5			1
KH ₂ PO ₄				10			10
Acido succinico				10			
CoCl ₂					0.5		
Na ₂ -ATP							3
Na-GTP							0.2
Aspartato de potasio							80

Tabla A2. Parámetros medidos para la caracterización electrofisiológica del PA del nodo SA en tejido intacto

Parámetros del Potencial de acción	Tipo I n = 17	Tipo II n = 14	Tipo III n = 25	Tipo IV n = 18
Pendiente de la fase 4 (μV/μs)	10 ± 2			
Voltaje mínimo (mV)	-64 ± 8	-72 ± 5*	-74 ± 5*	-79 ± 6***
Voltaje máximo (mV)	9 ± 11	10 ± 5	18 ± 5**	24 ± 7***
Amplitud (mV)	71 ± 18	82 ± 5	92 ± 7**	104 ± 6***
DRPA 10% (ms)	6 ± 3	5 ± 3*	3 ± 1*	2 ± 1**
DRPA 30% (ms)	18 ± 7	14 ± 6	10 ± 4*	9 ± 4**
DRPA 60% (ms)	47 ± 12	37 ± 12*	31 ± 9**	25 ± 11***
DRPA 90% (ms)	104 ± 25	98 ± 19	82 ± 19**	77 ± 13**
Voltaje umbral (mV)	-58 ± 11	-68 ± 13*	-73 ± 5*	-77 ± 9**
Máxima velocidad de despolarización (mV/ms)	31 ± 16	80 ± 14*	127 ± 14**	179 ± 18***
Frecuencia (eventos/min)	133 ± 49	156 ± 32	166 ± 40*	170 ± 11*

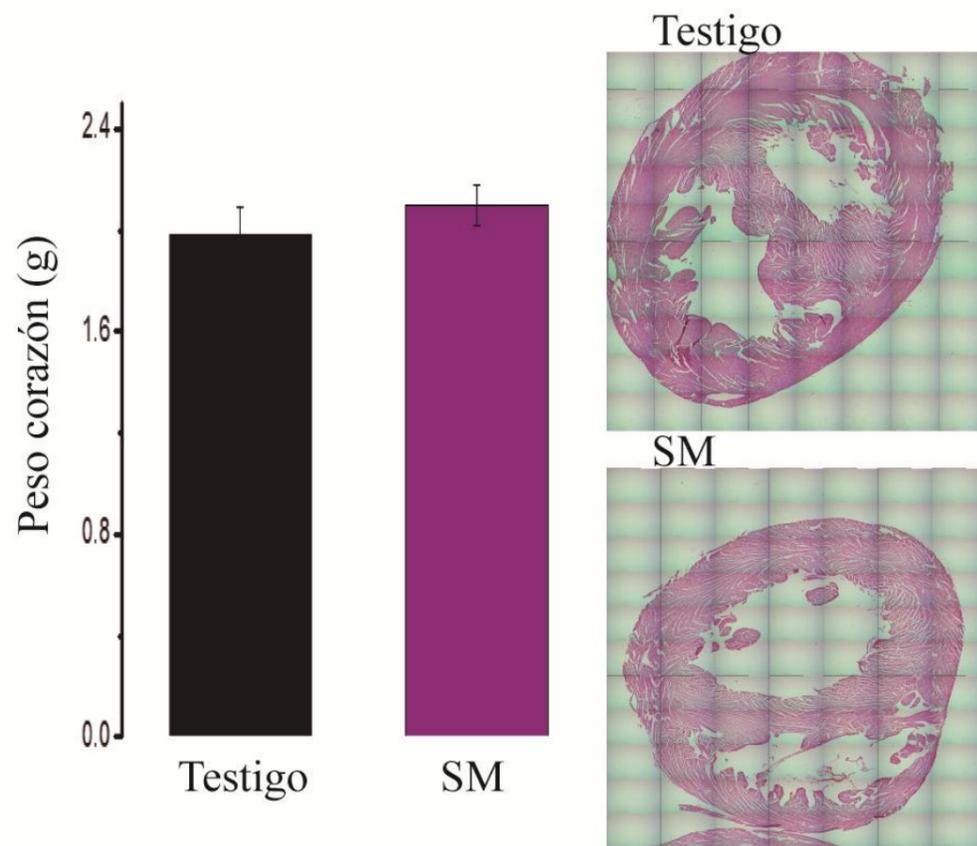


Figura S1. Comparación del tamaño del corazón. Grafica del peso de corazón a las 24 semanas no incremento el peso del corazón, cortes coronales de la base de los ventrículos donde se observa que no hubo incremento en la masa muscular.