



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN

DOCTORADO EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

**“EFECTO DE LA ADICIÓN DE LA CÁSCARA DE MANZANA SOBRE
EL ESTRÉS OXIDATIVO Y EL PERFIL DE PROTEÍNAS EN UN
MODELO MURINO DIABÉTICO”**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORADO EN
CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA EN RED

PRESENTA:

MARTÍNEZ LADRÓN DE GUEVARA ELIDETH

DIRECTORES DE TESIS:

DRA. NURY PÉREZ HERNÁNDEZ

DR. MIGUEL ÁNGEL VILLALOBOS LÓPEZ

MÉXICO D.F A 20 DE FEBRERO DE 2016





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 12:00 horas del día 18 del mes de Febrero del 2016 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.N.M y H. para examinar la tesis titulada:

"Efecto de la adición de la cáscara de manzana sobre el estrés oxidativo y el perfil de proteínas en un modelo murino diabético".

Presentada por el alumno:

Martínez	Ladrón de Guevara	Elideth
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre(s)
	Con registro:	B 1 0 2 4 0 0

aspirante de:

Doctorado en Ciencias en Biotecnología en Red

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR LA TESIS**, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dra. Nury Pérez Hernández

Dr. Miguel Ángel Villalobos López

Dr. Guillermo Pérez Ishiwara

Dr. Juan Salas Benito

Dr. Alejandro Martínez Martínez



PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA
Y HOMEOPATÍA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

Dra. Ana Laura Luna Torres



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 30 del mes de marzo del año 2016, el (la) que suscribe Elideth Martínez Ladrón de Guevara alumno(a) del Programa de Doctorado en Ciencias en Biotecnología en RED con número de registro B102400, adscrito(a) al Posgrado de la E. N. M y H., manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) Dra. Nury Pérez Hernández y Dr. Miguel Ángel Villalobos López y cede los derechos del trabajo titulado Efecto de la adición de la cáscara de manzana sobre el estrés oxidativo y el perfil de proteínas en un modelo murino diabético, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: eladron@uacj.mx, nuryp_h@yahoo.com.mx y ciba.mangel.inp@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Elideth Martínez Ladrón de Guevara

ESTE PROYECTO FUÉ REALIZADO EN LA ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA-IPN GRACIAS AL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS SIP 20113562 Y 20120526.

LA ALUMNA RECIBIÓ LA BECA PARA REALIZAR ESTUDIOS DE DOCTORADO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (No. 60485), ASI COMO LA BECA DEL PROGRAMA INSTITUCIONAL DEL FORMACIÓN DE INVESTIGADORES-IPN (PIFI).

AGRADECIMIENTOS

Agradezco su interés y apoyo en mi formación a la Dra. Nury Pérez Hernández, Dr. Miguel Ángel Villalobos López, al Dr. Guillermo Pérez Ishiwara, al Dr. Juan Salas Benito y al Dr. Alejandro Martínez Martínez.

DEDICATORIA

A mi hija Elideth

A padres Rogelio Martínez Moreno y Elizabeth Ladrón de Guevara Tarango, a mi abuela Ofelia Tarango Martínez.

Y a Miguel Ángel Orozco Barraza.

CONTENIDO	Página
RESUMEN	2
ABSTRACT	3
1 INTRODUCCIÓN	4
1.1 Corazón	4
1.1.1 Actividad eléctrica del corazón	7
1.1.2 Propiedades activas y pasivas del corazón	9
1.2 Diabetes y cardiopatía diabética	12
1.2.1 Estrés oxidativo y diabetes	13
1.2.2 Remodelación cardiaca y estrés oxidativo	17
1.3 Antioxidantes dietarios	19
1.3.1 Manzana	22
1.3.2 Manzana y beneficios en su consumo	23
1.3.3 La cáscara de manzana	24
2 JUSTIFICACIÓN	26
3 HIPÓTESIS	27
4 OBJETIVOS	27
4.1 Objetivo general	27
4.2 Objetivos específicos	27
5 MATERIALES Y MÉTODOS	28
5.1 Obtención de la cáscara de manzana	28
5.2 Análisis de la cáscara de manzana	28
5.2.1 Análisis proximal	28
5.2.2 Análisis estructural por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM)	28
5.2.3 Evaluación de los polifenoles	29
5.3 Diseño biológico experimental	30
5.3.1 Inducción de la diabetes mellitus	31
5.4 Análisis bioquímicos	32
5.5 Experimentos electrofisiológicos	32

5.5.1 Evaluación de las propiedades activas	33
5.5.2 Evaluación de las propiedades pasivas	34
6 RESULTADOS	35
6.1 composición de la cáscara de manzana	35
6.2 Peso corporal y parámetros bioquímicos	39
6.3 Potenciales de acción	45
6.3.1 Características de los potenciales de acción del corazón de ratas control y diabéticas	45
6.3.2 Características de los potenciales de acción del corazón de ratas diabéticas sin y con cáscara	48
6.4 Resistencia de entrada y de los umbrales intracelulares en los músculos papilares	51
6.4.1 Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en corazón de ratas sanas control y diabéticas	51
6.4.2 Cambios en la relación resistencia de entrada-corriente umbral en ratas diabéticas tipo 1 y 2 con y sin cáscara de manzana durante 90 días	52
6.4.3 Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en corazón de ratas sanas control y diabéticas	54
6.4.4 Propagación de respuestas prematuras y actividad re-entrante en ratas diabéticas	54
7. DISCUSIÓN	57
7.1 Acciones de la cáscara de manzana sobre el perfil bioquímico	57
7.2 Actividad eléctrica del corazón con diabetes	59
7.2.1 Propiedades activas	59
7.2.2 Organización del sincium ventricular (propiedades pasivas)	61
7.3 Acciones de la cáscara de manzana	63
8. CONCLUSIONES	65
9. BIBLIOGRAFÍA	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Página

Figura 1. Anatomía del corazón	5
Figura 2. Conducción de los impulsos eléctricos en el corazón	7
Figura 3. Fases del potencial de acción en el ventrículo (las corrientes despolarizantes se señalan hacia abajo y las corrientes repolarizantes hacia arriba)	9
Figura 4. Capas que constituyen la pared del corazón.....	11
Figura 5. Relación de los potenciales de acción del corazón y el electrocardiograma	13
Figura 6. Vías metabólicas de la glucosa relacionadas con el estrés oxidativo	16
Figura 7. Clasificación de los polifenoles.....	22
Figura 8. Diseño experimental	31
Figura 9. Mediciones del potencial de acción y periodos refractarios	33
Figura 10. Mediciones del umbral intracelulares	34
Figura 11. Espectro de RMN de ^1H en D_2O a 750 MHz de la cáscara de manzana	36
Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C en D_2O a 188.4 MHz de la cáscara de manzana.....	37
Figura 13. Espectro de Masas en MeOH modo positivo de la cáscara de manzana	37
Figura 14. Espectro de Masas en MeOH modo negativo de la cáscara de manzana	37
Figura 15. Diferencias en peso corporal expresadas en valores promedio y desviación estándar	40

Figura 16. Diferencias en niveles de glucosa expresadas en valores promedio y desviación estándar	41
Figura 17. Diferencias en niveles de HbA _{1c} expresadas en valores promedio y desviación estándar	41
Figura 18. Diferencias en niveles de insulina expresadas en valores promedio y desviación estándar	42
Figura 19. Diferencias en niveles de colesterol expresadas en valores promedio y desviación estándar	43
Figura 20. Diferencias en niveles de triglicéridos expresadas en valores promedio y desviación estándar	43
Figura 21. Diferencias en niveles de HDL expresadas en valores promedio y desviación estándar	44
Figura 22. Diferencias en niveles de VLDL expresadas en valores promedio y desviación estándar	44
Figura 23. Cambios del PA en la diabetes tipo 1	45
Figura 24. Cambios del PA en la diabetes tipo 2 a los 30 días	46
Figura 25. Cambios del PA en la diabetes tipo 2 a los 90 días	46
Figura 26. Duración de los PA en ratas sanas, diabetes tipo 1 y tipo 2 sin cáscara (30 días)	47
Figura 27. Duración de los PA en ratas sanas, diabetes tipo 1 y tipo 2 sin cáscara (90 días)	48
Figura 28. Duración de los PA acción de ratas control, diabetes tipo 1 sin cáscara y con cáscara por 90 días	49
Figura 29. Duración de los PA en ratas con diabetes tipo 2 con Glibenclamida, sin y con cáscara (90 días)	49
Figura 30. Acción de la cáscara de manzana sobre los PA de ratas diabéticas tipo 1 (90 días)	50

Figura 31. Acción de la cáscara de manzana sobre PA de ratas diabéticas tipo 2	50
Figura 32. Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en las ratas control y ratas diabéticas	51
Figura 33. Comparación de la relación corriente umbral-resistencia de entrada de ratas con diabetes tipo 2 con glibenclamida y diabetes tipo 2 sin cáscara (90 días)	52
Figura 34. Cambios en las relaciones de resistencia de entrada-corriente umbral en ratas D1SC y D1CC durante 90 días.	53
Figura 35. Comparación de la relación corriente umbral-resistencia de entrada de ratas con diabetes tipo 2 con glibenclamida, con y sin cáscara (90 días).....	53
Figura 36. Relación resistencia de entrada-corriente umbral en ratas sanas sin y con cáscara (150 mg/kg).....	54
Figura 37. Actividad re-entrante iniciada por la aplicación de una extrasístole temprana	55
Figura 38. Cambio de dirección en la propagación del frente de onda	56

Tabla 1. Concentración de iones intra y extracelular en miocito cardiacos de mamíferos.....	8
Tabla 2. Principales especies reactivas	14
Tabla 3. Análisis de la composición de la cáscara de manzana	35

GLOSARIO DE ABREVIATURAS

ACE	Convertidora de angiotensina
ADA	Sociedad Americana de Diabetes (siglas en inglés)
Ang II	Angiotensina II
ANP	Péptido natriurético atrial
AOAC	Asociación Oficial de la Química Analítica (siglas en inglés)
APA	APA Amplitud del Potencial de Acción
ASK	ASK Quinasa reguladora de la señal de apoptosis (siglas en inglés)
C	Control o sanas
CAT	Catalasa
c-HDL	Colesterol de alta densidad
CT	Colesterol total
cx-43	Conexina 43
D1	Diabetes tipo 1
D1CC	Diabetes tipo 1 con cáscara
D1SC	Diabetes tipo 1 sin cáscara
D2	Diabetes tipo 2
D2CC	Diabetes tipo 2 con cáscara
D2SC	Diabetes tipo 2 sin cáscara
DAG	Diacilglicerol
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EKC	EKC Electrocardiograma
EO	EO Estrés oxidante
ERNS	Especies reactivas de nitrógeno
EROS	Especies reactivas de oxígeno
G	Glibenclamida
GR	Glutación reductasa
Grx	Glutación
GSH	Glutación reducido
GSH-px	Glutación Peroxidasa

GSSG	Glutati3n oxidado
H ₂ O ₂	Per3xido de hidr3geno
HbA _{1c}	Hemoglobina glicosilada
HNO ₂	3xido nitroso
I _{CaL}	Corriente de Calcio lenta
I _{Kr}	Corriente rectificadora tardía r3pida
I _{Ks}	Corriente tardía lenta
I _{Kss}	Corriente saliente de Potasio estado estable
I _{Na}	Corriente entrante de sodio
I _{to}	Corriente transitoria de Potasio
NAD	Nicotinamida
NADP	Nicotinamida adenina dinucle3tido fosfato
NF-κβ	Factor nuclear-κβ
NO	3xido n3trico
NOS	3xido n3trico sintetasa
NSA	Nodo seno auricular
O ₂ ⁻	Ani3n super3xido
OH	Radical hidroxilo
ONOO ⁻	Peroxin3trico
PA	Potencial de acci3n
PI3K	Quinasa 3-fosfatidilinositol
PKC	Protein-cinasa C
PMR	Potencial de membrana en reposo
PRA	Periodo Refractario Absoluto
PRR	Periodo Refractario Relativo
PTGA	Productos Terminales de la Glicosilaci3n Avanzada
QT	Intervalo electrocardiograma
-SH	Grupo tiol o sulfhidrilo
SCC	Sanas con c3scara
SEM	Error medio est3ndar (por sus siglas en ingl3s)
SOD	Super3xido dismutasa

SSC

Sanas sin cáscara

STZ

Estreptozotocina (siglas en inglés)

RESUMEN

Diversos estudios epidemiológicos sugieren claramente que el consumo de la manzana en la dieta diaria se relaciona con múltiples beneficios para salud y en particular con afecciones del sistema cardiovascular. Tales beneficios se han asociado a su composición química, especialmente a los compuestos polifenólicos. Sin embargo, no existen estudios sistemáticos en donde se explore la acción de la cáscara de manzana en las propiedades electrofisiológicas del corazón en modelos de diabetes. En consecuencia, el presente estudio fue diseñado para examinar los efectos del liofilizado de la cáscara de manzana Red Delicious en músculos papilares aislados del corazón de ratas macho con inducción de diabetes tipo 1 y 2, en comparación al control a 30 y 90 días. El registro de los potenciales de acción, potencial de reposo, amplitud de los potenciales de acción, los umbrales intracelulares y la resistencia de entrada se realizaron utilizando métodos convencionales para microelectrodos.

Los resultados obtenidos indican que el consumo de cáscara de manzana a los 90 días de tratamiento es capaz de mantener los niveles de glucosa y hemoglobina glicosilada (HbA_{1c}) similares al control e interesantemente disminuir el aumento de la duración de potencial de acción (PA) y el período refractario absoluto, en el modelo de diabetes tipo 2.

Estas acciones son, probablemente, el o los mecanismos mediante los cuales se llevarán a cabo las funciones protectoras de la cáscara de manzana sobre la actividad cardíaca en la cardiopatía diabética.

ABSTRACT

Several epidemiological studies strongly suggest that apple consumption in the diet is associated with multiple health benefits particularly with diseases of the cardiovascular system. Such benefits have been associated with their chemical composition, especially polyphenolic compounds. However, there are no systematic studies of the action of the apple peel on the electrophysiology of the heart on diabetes models. Consequently, this study was designed to examine the effects of lyophilized apple peel Reed Delicious in papillary muscles isolated heart healthy male rats, diabetic type 1 and 2 with their respective controls at 30 and 90 days. Recording action potentials, resting potential, amplitude of action potentials, and thresholds intracellular input resistance were performed using conventional methods for microelectrodes.

The results indicate that consumption of apple peel after 90 days of treatment is able to maintain glucose levels and glycosylated hemoglobin (HbA_{1c}) similar to the control and interestingly reduce the increment of the duration of the action potential (PA) and the absolute refractory period in type 2 diabetes model.

These actions are probably the mechanisms by which carried out the protective functions of apple peel on cardiac activity in diabetic heart disease.

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Corazón

El corazón pesa entre 200 a 425 gramos y es un poco más grande que una mano cerrada, late 100.000 veces diarias, bombeando aproximadamente 7.571 litros de sangre. Este órgano se encuentra entre los pulmones en el centro del pecho, detrás y levemente a la izquierda del esternón. Una membrana de dos capas, denominada pericardio envuelve el corazón como una bolsa. La capa externa del pericardio rodea el nacimiento de los principales vasos sanguíneos del corazón y está unida a la espina dorsal, al diafragma y a otras partes del cuerpo por medio de ligamentos. La capa interna del pericardio está unida al músculo cardíaco. Una capa de líquido separa las dos capas de la membrana, permitiendo que el corazón se mueva al latir a la vez que permanece unido al cuerpo.

El corazón tiene cuatro cavidades, Figura 1. Las cavidades superiores se denominan aurícula izquierda y aurícula derecha y las cavidades inferiores se denominan ventrículo izquierdo y ventrículo derecho. Una pared muscular denominada tabique separa las aurículas izquierda y derecha y los ventrículos izquierdo y derecho. El ventrículo izquierdo es la cavidad más grande y fuerte del corazón. Las paredes del ventrículo izquierdo tienen un grosor de poco más de un centímetro, pero tienen la fuerza suficiente para impeler la sangre a través de la válvula aórtica hacia el resto del cuerpo. Las válvulas que controlan el flujo de la sangre por el corazón son cuatro: la válvula tricúspide, que controla el flujo sanguíneo entre la aurícula derecha y el ventrículo derecho; la válvula pulmonar que controla el flujo sanguíneo del ventrículo derecho a las arterias pulmonares, la válvula mitral que permite que la sangre rica en oxígeno proveniente de los pulmones pase de la aurícula izquierda al ventrículo izquierdo y la válvula aórtica que permite que la sangre oxigenada pase del ventrículo izquierdo a la aorta, la arteria más grande del cuerpo, la cual transporta la sangre al resto del organismo (Delmar *et al.*, 2007).

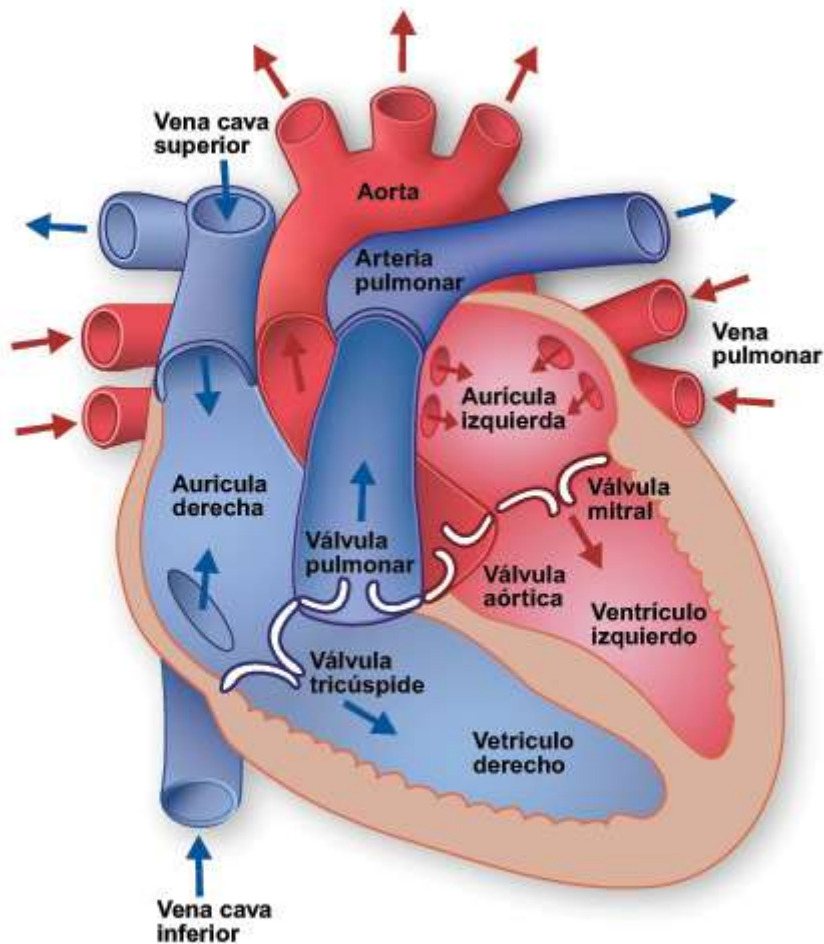


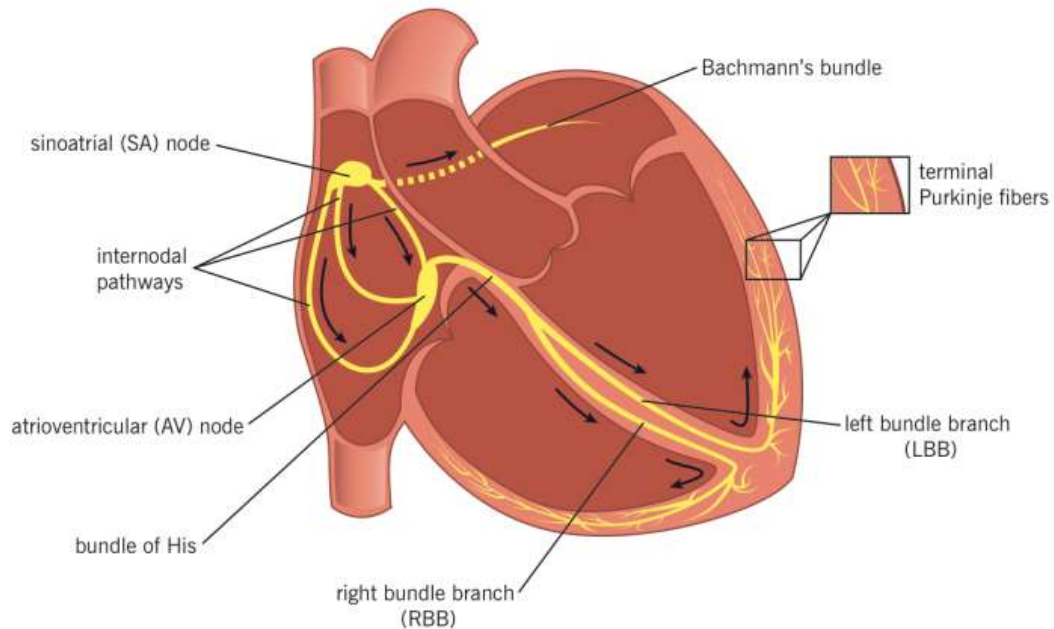
Figura 1. Anatomía del corazón

(http://www.texasheart.org/HIC/Anatomy_Esp/anato_sp.cfm)

A partir de los estudios realizados por Heidenhain y Gollewsky alrededor del año 1900, se consideró al corazón de mamífero como un sincicio anatómico, sin embargo, los estudios morfológicos iniciales no confirmaron esta idea. Fue a mediados del mismo siglo, que las evidencias experimentales electrofisiológicas hicieron posible comprender como es que; todas las células del corazón funcionan como unidades independientes pero que, a su vez, se encuentran

intercomunicadas a través, de uniones de baja resistencia. Estas uniones de baja resistencia se denominan *nexus* o “*gap junctions*” (Sjostrand y Anderson, 1954; Sjostrand *et al.*, 1958; Dewey y Barr, 1964). Aunado a las evidencias de tipo morfológico, los hallazgos de tipo electrofisiológico; se orientaron a reconocer que tales *nexus*, además de permitir el intercambio de sustancias entre los miocitos permiten también el paso de corriente (Weidmann, 1952; Barr *et al.*, 1965; Weidmann, 1966). Se postuló entonces que, en el corazón todas las células se encuentran acopladas eléctricamente y que el corazón se comporta como un sincicio funcional.

Los impulsos eléctricos generados por el músculo cardíaco (el miocardio) estimulan la contracción del corazón. Esta señal eléctrica se origina en el nódulo sinoauricular (SA) ubicado en la parte superior de la aurícula derecha. El impulso eléctrico de este marcapaso natural se propaga por las fibras musculares de las aurículas y los ventrículos estimulando su contracción. Aunque el nódulo SA envía impulsos eléctricos a una velocidad determinada, la frecuencia cardíaca podría variar según las demandas físicas o el nivel de estrés o debido a factores hormonales. Los PA generados por células individuales se conducen de célula a célula a través de las *gap junctions* que ponen en contacto los citoplasmas de las células y forman una vía de baja resistencia para el flujo de la corriente excitatoria proporcionada por el potencial de acción PA; bajo este mecanismo, es como se lleva a cabo la generación y conducción de los potenciales en los diferentes tejidos que conforman al corazón dando como resultado final la activación y sincronización de toda la masa muscular ventricular y una eficiente función del corazón como bomba. Sin embargo, para el adecuado proceso de excitación se sigue un patrón de activación secuencial que tiene su inicio en el nodo seno auricular (NSA) continuándose en las aurículas para terminar en los tejidos ventriculares (Figura 2). No obstante, las alteraciones en la actividad eléctrica conducen a serios desordenes que, en ocasiones, pueden ser letales.



© Cassandra Uy

Figura 2. Conducción de los impulsos eléctricos en el corazón (Papano y Wier, 2013).

1.1.1 Actividad eléctrica del corazón

El origen de la actividad eléctrica del corazón está relacionado con los cambios que se producen en el potencial de reposo de la membrana celular (PRM), el cuál es la diferencia de potencial que existe entre el interior y el exterior de la célula. El PRM se genera porque la membrana celular se comporta como una barrera con conductancia selectiva, es decir, permite sólo el tránsito de determinadas moléculas a través de ella por lo que se produce una distribución asimétrica de iones entre el espacio intra y extracelular produciendo una diferencia de potencial (Tabla 1) (Katz, 2011).

No obstante, el valor del PRM no sólo es determinado por las diferentes concentraciones iónicas en los líquidos extra e intracelulares, sino también es influenciado por la participación de bombas y transportadores como la ATPasa Na⁺-K⁺, la presencia de aniones no difusibles (proteínas dentro del citoplasma) y la conductancia selectiva de la membrana al ion K⁺ en condiciones de reposo. La fuerza impulsora que determina el movimiento de los iones a través de la membrana es generada por la presencia de dos gradientes: el eléctrico y el de concentración. En las células cardiacas ventriculares de trabajo, el PRM es de 80 a 90 mV siendo el interior negativo con respecto al exterior.

Ion	Concentración (Mm)	
	Intracelular	Extracelular
Na ⁺	5 a 15	145
K ⁺	140	5
Ca ²⁺	0.0001	1 a 2
Cl ⁻	5 a 15	110

Tabla 1. Concentración de iones intra y extracelular en miocito cardiacos de mamíferos

Debido que las células cardiacas son excitables, cuando el potencial de membrana se hace menos negativo o se despolariza (se aleja del PRM) y alcanza un valor de potencial crítico (potencial umbral) se produce el Potencial de Acción (DPA), el cual es un cambio transitorio del potencial de la membrana celular originado por la activación y el cierre de distintos canales iónicos, es decir, son cambios en la conductancia de la membrana. Los DPA del corazón son mucho más complejos que los de las neuronas y del músculo esquelético los cuales duran sólo unos milisegundos. La duración del PA cardiaco es de algunos cientos de milisegundos que consisten en varias fases que varía de acuerdo del tejido cardiaco que se estudie (Katz, 2011).

1.1.2 Propiedades activas y pasivas del corazón

La generación y conducción de los PA en el corazón depende de sus propiedades activas y pasivas. Las primeras están relacionadas con el tipo y cantidad de canales iónicos expresados en la membrana celular de los cardiomiocitos. Estos canales iónicos generan corrientes de entrada (despolarizantes) y corrientes de salida (repolarizantes). Por tanto, la morfología del PA depende de las propiedades activas y varía entre las diferentes regiones del corazón. Específicamente, en el tejido ventricular de trabajo, el PA posee cinco fases originadas por la activación de diferentes corrientes iónicas, las cuales se enumeran del 0 al 4 (Figura 2) (Liu, 2014).

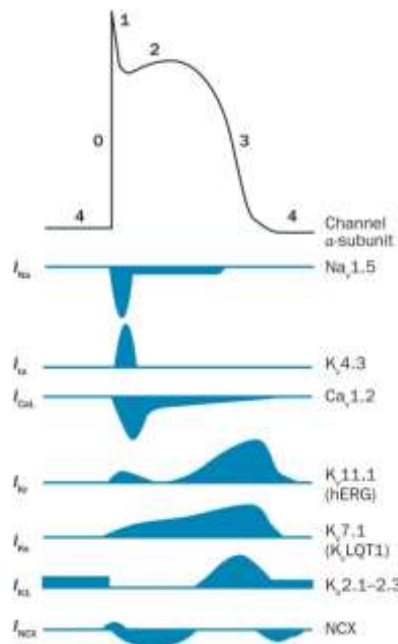


Figura 3. Fases del PA en el ventrículo (las corrientes despolarizantes se señalan hacia abajo y las corrientes repolarizantes hacia arriba, (Liu, 2014)

La fase 0 es también conocida como despolarización rápida o fase de subida del PA y es generada por la corriente entrante de sodio (I_{Na}). En la fase 1 se produce una repolarización inicial rápida que termina en el inicio de la meseta del PA. Esta es provocada por la inactivación rápida de la I_{Na} y la activación de la corriente transitoria (I_{to}). La I_{to} determina la repolarización rápida y la duración del PA. La fase 2 es la meseta del PA, la cual se origina por un fino equilibrio entre las corrientes entrantes de Calcio tipo L ($I_{Ca^{2+}L}$) y del intercambiador Na^+/Ca^{2+} y las corrientes salientes a través de los canales de potasio del rectificador tardío con sus tres componentes, ultra rápida (I_{Kur}), rápida (I_{Kr}) y lenta (I_{Ks}). Por lo tanto, pequeños aumentos en las corrientes entrantes o pequeñas disminuciones en las corrientes salientes se manifiestan como aumentos importantes en la duración del PA y viceversa. Según se inactiven los canales de Ca^{2+} , las corrientes repolarizantes se hacen dominantes y se inicia la fase 3, con lo que se inicia la fase de repolarización, la cual consiste en al menos dos componentes: la I_{Kr} y I_{Ks} . En la última porción de la fase 3 aparece la corriente que presenta rectificación hacia adentro (I_{K1}) que mantiene el PRM. Por último, la fase 4 está ausente en el músculo ventricular adulto ya que es típica de aquellos tejidos cardiacos con actividad espontánea (Pappano y Wier, 2013).

Incluso en el tejido ventricular se presentan diferencias en la forma y duración de los PA dependiendo de la región (epicardio, endocardio, miocardio) ya que la expresión de los canales iónicos de potasio es heterogénea (Jourdon y Feuvrai, 1993). Simultáneamente estos canales iónicos interactúan, no de manera lineal, sino dinámicamente con los cambios de concentraciones de iones y con las modificaciones del voltaje de membrana; además están sujetos a procesos regulatorios (Kléber y Rudy, 2004; Rudy y Siva, 2006).

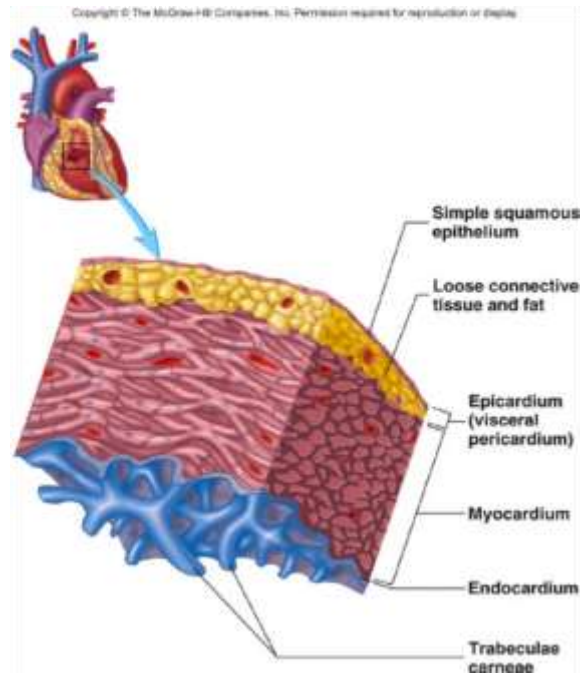


Figura 4. Capas que constituyen la pared del corazón
(http://www.rci.rutgers.edu/~uzwiak/AnatPhys/Cardiovascular_System.html).

Las propiedades pasivas están vinculadas con la propagación de los PA y están determinadas por el tamaño y la forma de los miocitos, así como la cantidad y distribución espacial de las “gap junctions” o de las uniones comunicantes (conexinas). Cualquier perturbación en las propiedades activas, en las propiedades pasivas y en la interacción entre ambas puede tener, bajo condiciones fisiológicas, un efecto importante en la excitabilidad de los tejidos cardiacos, así como en la generación y la propagación de los potenciales de acción. En consecuencia, en situaciones patológicas como la diabetes, la función cardiaca puede ser profundamente afectada.

1.2 Diabetes y cardiopatía diabética

La diabetes mellitus es un conjunto de alteraciones metabólicas que tienen por característica común la hiperglucemia (ADA, 2014). Aproximadamente del 90 al 95% de los casos de diabetes son del tipo 2 y del 5 al 10% del tipo 1. En ambos tipos de diabetes las complicaciones cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad (Cai, 2006). Generalmente la mortalidad por diabetes se relaciona con una mayor susceptibilidad a presentar arritmias cardíacas que provocan la muerte súbita (Shimoni, 2001). Esta vulnerabilidad del corazón se debe a la disfunción eléctrica y contráctil que se presenta por la cardiopatía diabética, la cual es considerada una enfermedad cardíaca independiente de la enfermedad coronaria (relacionada con la aterosclerosis) (Shimoni *et al.*, 2005). Por ello la diabetes es considerada como el factor de riesgo más importante de las enfermedades cardiovasculares independiente de la hiperlipidemia (Waczykpuková *et al.*, 2010).

La cardiomiopatía diabética es una complicación temprana de la diabetes (Watanabe *et al.*, 2010) e implica anomalías eléctricas en los ventrículos que se denominan como remodelación electrofisiológica (Rahnema *et al.*, 2011). Este remodelado eléctrico está relacionado con la repolarización anormal y aumento de la DPA por la alteración de las propiedades activas del corazón. En la diabetes tipo 1 (D1) y la diabetes tipo 2 (D2) se presenta una disminución en la densidad de la corriente de K^+ saliente transitoria (I_{to}) y de la corriente de K^+ de estado estable (I_{Kss}) (Shimoni *et al.*, 2001; Li *et al.*, 2005; Shimoni *et al.*, 2005). Siendo considerada la disminución en la densidad de la I_{to} como la alteración electrofisiológica más notable en el tejido ventricular en la diabetes (Raimondi *et al.*, 2004). Estos cambios observados en la diabetes se ven reflejados en el electrocardiograma (EKG) de las personas que padecen esta patología, donde suele presentar una prolongación en el intervalo QT (Figura 5) y un aumento en la dispersión del QT (Li *et al.*, 2005).

Igualmente la remodelación también se ha asociado con anomalías de las propiedades pasivas específicamente en la conexión intercelular eléctrica

causada por la laterización de la proteína conexina 43 (cx-43). Esta laterización de la cx-43 reduce la velocidad de conducción incrementando la susceptibilidad del corazón a presentar arritmias ventriculares (Howarth *et al.*, 2008; Rahnema *et al.*, 2011; Wright *et al.*, 2012).

La etiología de la cardiomiopatía diabética no sólo se atribuye a la hiperglucemia, hiperlipidemia e inflamación sino también al estrés oxidante, siendo éste último el mayor contribuidor (Watanabe *et al.*, 2010).

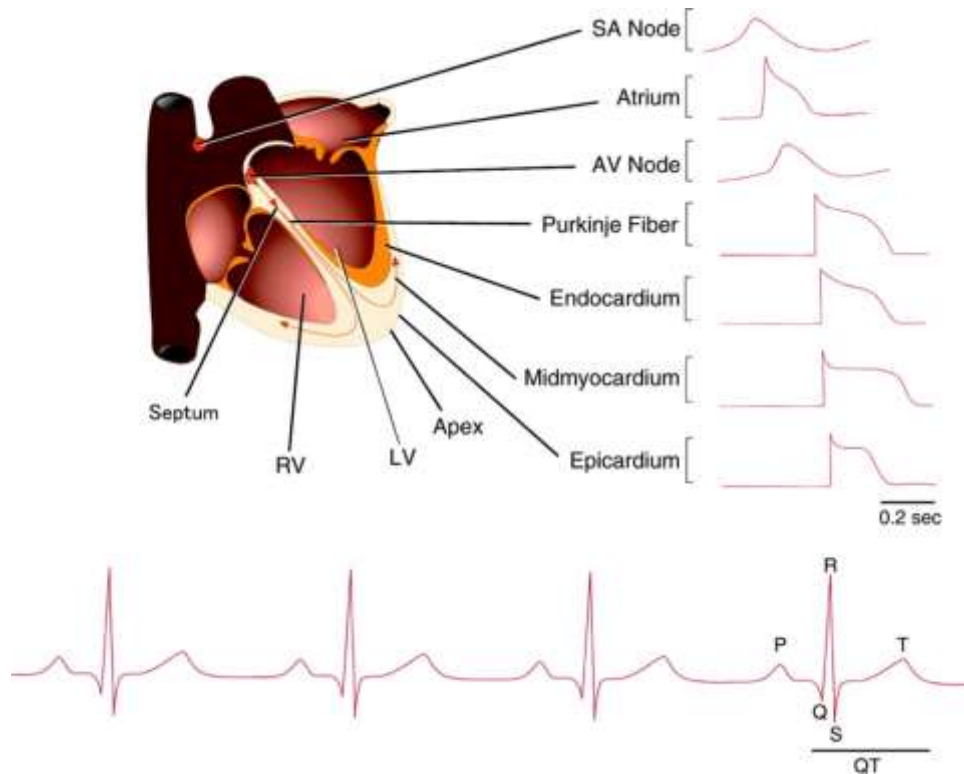


Figura 5. Relación de los DPA del corazón y el electrocardiograma (Nerbonne y Kass, 2005)

1.2.1 Estrés oxidativo y diabetes

El estrés oxidante se presenta cuando la generación de las especies reactivas de oxígeno (EROS) y especies reactivas de nitrógeno (ERNS) superan la

actividad de los sistemas antioxidantes del organismo encargados de contrarrestarlos. En la diabetes existe tanto una producción excesiva de especies reactivas como una disfunción del sistema de defensa (Kaneto *et al.*, 2010).

Las especies reactivas son resultado del metabolismo celular que en condiciones fisiológicas intervienen en varias funciones en la mayoría de órganos y procesos, como el de inflamación, expresión de genes, detección del oxígeno, respuesta inmunitaria, así como señalización, crecimiento, senescencia y muerte celular (Zhang *et al.*, 2012). No obstante, debido a que los EROS y ERNS son átomos o moléculas que contienen uno o más electrones no apareados en su último orbital, son altamente reactivos e inestables capaces de modificar y dañar los ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y carbohidratos causando por lo tanto daño celular. Adicionalmente, las altas concentraciones de éstos pueden acrecentar el daño en los compartimentos celulares y tisulares al alterar las cascadas de señalización dependientes del estado de reducción y oxidación (redox) celular, el cual es resultado del equilibrio entre los agentes oxidantes y reductores provocando disfunción celular y en última instancia la muerte de la misma. Las principales especies reactivas se muestran en la Tabla 2.

	EROS	ERNS
Radicales libres	Superóxido ($O_2^{\cdot-}$) Hidroxilo (OH^{\cdot}) Peróxido (ROO^{\cdot}) Hidroperóxido (HOO^{\cdot})	Óxido nítrico (NO^{\cdot}) Dióxido nítrico (NO_2^{\cdot})
No radicales libres	Peróxido de hidrógeno (H_2O_2) Ácido hidrocloruro ($HOCl$)	Peroxinítrico ($ONOO^{\cdot}$) Óxido nitroso (HNO_2) Alcanos de peroxinitratos ($RONOO$)

Tabla 2. Principales especies reactivas

Para la inactivación de las especies reactivas, el organismo posee sistemas de defensa antioxidante enzimática y no enzimática, tanto celular como extracelular. El primero está compuesto por varias enzimas siendo las principales: la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa (CAT) y la glutatión peroxidasa (GSH-px), las cuales actúan respectivamente sobre el $O_2^{\cdot-}$, el H_2O_2 y con la reducción de peróxidos o alcoholes (Oré *et al.*, 2009). Con respecto a las defensas antioxidantes no enzimáticas, se encuentran los sistemas de la nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH/NADP), la tiorredoxina (Trx) y el glutatión (Grx). El sistema de la Trx está compuesto por Trx y tiorredoxina reductasa (TrxR), mientras que el sistema Grx está formado por Grx, glutatión reducido (GSH) y la glutatión reductasa (GR). Estos sistemas tienen por finalidad el mantener el estado reducido del grupo tiol o sulfhidrilo (-SH) de las cisteínas de las proteínas por medio de la transferencia de los electrones de NADPH a las proteínas oxidadas.

El cambio de redox del grupo sulfhidrilo de las cisteínas es muy importante puesto que está involucrado con la regulación de la función celular pues generalmente determina la estructura y la actividad de las enzimas, los factores de transmisión, las proteínas transportadoras necesarias para la viabilidad de la célula (Li *et al.*, 2006) y además están estrechamente vinculadas a la señalización redox por el estrés oxidativo. El sistema del glutatión es el principal responsable del estado redox de las células puesto que su concentración es 500 y 1000 veces superior que la de Trx y NADPH respectivamente (Filomeni *et al.*, 2002).

En la diabetes, la formación exacerbada de los EROS y ERNS se asocia a la hiperglucemia crónica e hiperlipidemia. La hiperglucemia aumenta la producción de especies reactivas principalmente por cuatro vías: 1) la auto-oxidación de la glucosa, 2) la formación de Productos Terminales de la Glicosilación Avanzada (PTGA), 3) la activación de la vía del sorbitol y 4) la activación de la vía de las hexosas. Todas éstas vías llevan a la sobreproducción de anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) por parte de la mitocondria (Cai, 2006; Zhang *et al.*, 2012). Además la hiperlipidemia aumenta la producción de EROS por medio de la inhibición de la oxidación de la glucosa. La acumulación de estas especies reactivas incrementa a

su vez la producción de las mismas por un fenómeno que se le conoce como liberación de EROS por EROS (Jeoung *et al.*, 2012) (Figura 6).

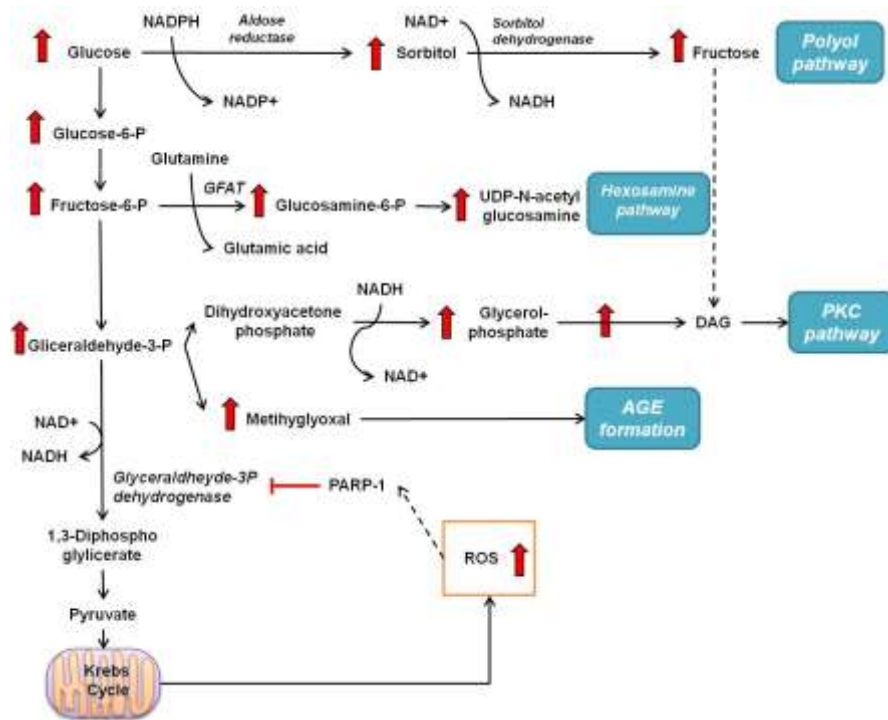


Figura 6. Vías metabólicas de la glucosa relacionadas con el estrés oxidativo (<http://www.intechopen.com/books/oxidative-stress-and-chronic-degenerative-diseases-a-role-for-antioxidants/oxidative-stress-in-diabetes-mellitus-and-the-role-of-vitamins-with-antioxidant-actions>)

La limitación del sistema de defensa antioxidante en la diabetes está relacionada por la activación de la vía de sorbitol que reduce la cantidad de NADPH disponible afectando la regeneración del principal antioxidante celular, que es el GSH. Asimismo, al disminuir la concentración de GSH se afecta la actividad de otras enzimas que lo requieren como la óxido nítrico sintetasa (NOS), CAT y NADPH oxidasa. Por otra parte la disminución de GSH conlleva a incrementar las concentraciones de triosas fosfato capaces de aumentar producción del metilglioxal

(precursor de PTGA) y del diacilglicerol (DAG) (activador de la protein-cinasa C), ver Figura 4 (Al-Dallen *et al.*, 2004; Rosado-Perez y Mendoza-Núñez, 2007). Conforme aumenta la sobreproducción de especies reactivas, se compromete cada vez más la acción del sistema antioxidante y el desbalance del estado redox se acentúa (Vassort y Turan, 2010). Actualmente esta modificación del estado redox se ha asociado con la vulnerabilidad del corazón a presentar arritmias en la diabetes (Jeong *et al.*, 2012).

1.2.2 Remodelación cardiaca y estrés oxidativo

El estrés oxidante en el miocardio provoca que disminuya el GSH mientras su forma oxidada (GSSG) se acumula modificando el estado redox celular. Al cambiar el estado redox las proteínas se pueden oxidar más fácilmente, específicamente los grupos tiol (-SH) de las cisteínas que son los más vulnerables ya que pueden formar uniones con el oxígeno, el nitrógeno, los halógenos y el selenio originando un rango de modificaciones post-traduccionales (Xu *et al.*, 2002) las cuales están estrechamente vinculadas con la señalización redox por el estrés oxidativo. La señalización redox en el corazón está involucrada en procesos fisiológicos (el proceso de excitación-contracción, diferenciación celular), homeostáticos o de respuesta al estrés (adaptación a hipoxia o isquemia) y patológicos (remodelación cardiaca, fibrosis).

Los cambios en la señalización del estado redox producen una respuesta adaptativa del corazón a los cambios en el ambiente celular los cuales involucran a la quinasa 3-fosfatidilinositol (PI3K), calcio y proteina-cinasa C (PKC) para regular el metabolismo del corazón. Sin embargo, si estas modificaciones son muy intensas o se agregan otros estímulos (por ejemplo, la hipertensión) la acumulación de los metabolitos resulta en una mala adaptación como sucede en la diabetes (Young *et al.*, 2002). Esta mala adaptación puede activar al factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), a la quinasa reguladora de la señal de apoptosis (ASK, por sus siglas en inglés), a los genes y proteínas involucrados en la remodelación cardiaca, como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), la angiotensina II (Ang II), la endotelina, y el

péptido natriurético atrial (ANP) (Shimoni *et al.*, 2005; Shimoni *et al.*, 2008; Cai, 2006).

Interesantemente, existe evidencia que la remodelación de los canales de potasio que se presenta en la diabetes, y específicamente los que regulan la corriente I_{to} y I_{Kss} , son controlados de una manera sensible al estado redox celular por medio de la integración de los sistemas Trx y Grx (Rozanski y Xu, 2002; Liang *et al.*, 2008). Por otra parte, Li *et al.* (2006) observaron que los corazones de ratas diabéticas muestran una disminución en la actividad de la TrxR y GR de aproximadamente 52% y 35% respectivamente en comparación de las ratas sanas. También encontraron que al inhibir la TrxR en ratas controles, se suprime el efecto de la insulina y sus agonistas (dicloroacetato) disminuyendo la densidad de la I_{to} . De igual forma la reducción en la amplitud de la corriente I_{to} se puede revertir al incrementar los niveles de GSH en el miocito (Rozansky y Xu, 2002; Shimoni *et al.*, 2005). Por lo que se ha postulado que los sistemas Trx y Grx conforman un mecanismo importante de reparación en el corazón que protege los canales iónicos y otras proteínas celulares del daño irreversible (Li *et al.*, 2006).

Igualmente, las atenuaciones de las I_{to} y I_{Kss} de los miocitos aislados de ratas con diabetes se pueden revertir al disminuir el estrés oxidativo por medio de la adición de la SOD o la apocinina (inhibidor de la NADPH oxidasa) (Shimoni *et al.*, 2005). A su vez, se ha reportado que la activación de la PKC por la hiperglucemia (ver Figura 4) específicamente la isoforma ϵ (que es la más común en el ventrículo de las ratas adultas) puede modular a la I_{to} y I_{ss} (Shimoni *et al.*, 1994; Shimoni *et al.*, 1998) y también regula las densidades de la I_{CaL} y la bomba Na^+-K^+ (Pandit *et al.*, 2003). Mientras que al aumentar los niveles de Ang II se atenúan las corrientes de K^+ e incrementa el estrés oxidativo (Shimoni *et al.*, 2005; Shimoni *et al.*, 2008). Interesantemente, estos efectos desaparecen al bloquear los receptores de Ang II (por medio de Losartan) (Raimondi *et al.*, 2004) o al agregar la enzima convertidora de angiotensina (ACE) (Shimoni *et al.*, 2005).

Con respecto a la alteración de las propiedades pasivas, se ha observado que el incremento de los EROs por la elevación de la Ang II están implicados en la

remodelación cardiaca de las conexinas, provocando la laterización que involucra la difusión de la cx-43 lejos de los discos intercalados hacia las paredes laterales de los miocitos. Incluso se ha observado que el estrés oxidativo activa al factor de transcripción c-Src, el cual regula la cx-43. Los niveles de cx se asocian inversamente con el riesgo arrítmico por lo que esto representa otro mecanismo dependiente de EROs en que puede aumentar este riesgo (Jeong *et al.*, 2012). Finalmente, otro mecanismo que también se asocia con la modificación de las “gap junctions” es que la activación de la PKC favorece la fosforilación post-traducciona de la cx-43. En la diabetes se presenta una fosforilación elevada de la cx-43 que suprime la comunicación intercelular y la conducción eléctrica que interfiere con la propagación del PA y en consecuencia puede llevar a presentar arritmias en el tejido ventricular cardiaco (Howarth *et al.*, 2008).

1.3 Antioxidantes dietarios

La epidemia de la diabetes alcanza altas proporciones en todo el mundo, por lo que hay una necesidad urgente para el desarrollo de estrategias de prevención rentables y eficaces. En este sentido un gran potencial radica en las intervenciones dietéticas diseñadas a gran escala. La composición de macronutrientes y el contenido de calorías de la dieta son los determinantes principales de la homeostasis de la glucosa y hay una lista cada vez mayor de alimentos, nutrientes o compuestos individuales que se han asociado con una incidencia aumentada o reducida de la diabetes mellitus (Thomas y Pfeiffer-2012).

Las plantas son de enorme importancia en cuestión de los EROs y antioxidantes por tres razones primordiales: 1) ellas son las que aportan el O_2^- , 2) están expuestas a altos niveles de O_2^- y por ello cuentan con suficientes defensas antioxidantes y sistemas de reparación contra el daño oxidativo, y 3) los estudios epidemiológicos han demostrado que dietas ricas en productos vegetales (frutas y verduras) están asociadas con un menor riesgo de desarrollar enfermedades como cáncer, diabetes, aterosclerosis y demencia (Halliwell, 2009).

Estos efectos benéficos de las frutas y los vegetales se atribuyen principalmente a los compuestos polifenólicos, puesto que la ingesta de los polifenoles en animales y humanos se asocia a disminución de dislipidemia y aterosclerosis; disfunción endotelial e hipertensión; activación de plaquetas y trombosis; proceso inflamatorio asociado con la inducción y perpetuación de la enfermedad cardiovascular (Fraga *et al.*, 2010). Además son polifenoles son los antioxidantes más abundantes en la dieta y su ingesta es más elevada con respecto a otras clases de fitoquímicos y antioxidantes dietarios. En específico el consumo de polifenoles es 10 y 100 veces mayor que el consumo de la vitamina C y E (Scalbert *et al.*, 2005).

Las estructuras químicas de los fenoles, los hacen ideales para acción antioxidante, neutralizador de radicales libres y queladores de metales y más poderosos en comparación que la vitamina C y E (Łata, 2009). Los polifenoles comprenden una gran diversidad de compuestos los cuáles se clasifican según se observa en la Figura 7. Se han identificado más de 4000 flavonoides en las plantas y aún siguen elucidando más estructuras nuevas hoy en día (Cheynier, 2005). Gracias a sus diferencias en estructura, biodisponibilidad, distribución y metabolismo, los compuestos flavonoides pueden tener diferentes efectos en la salud (Knekt *et al.*, 2002), por ejemplo, algunos de estos antioxidantes han demostrado prevenir la apoptosis por el estrés oxidativo en las células ya que inducen la expresión de enzimas antioxidantes como la CAT, SOD, y GSH-px (Wang *et al.*, 2010).

Existe evidencia que los flavonoides pueden actuar específicamente en estructuras moleculares como los canales iónicos cardiovasculares, por lo que pueden estar involucrados en la regulación del tono vascular y la actividad eléctrica cardíaca, siendo los canales iónicos el blanco de los flavonoides para ejercer su protección cardiovascular (Zitron *et al.*, 2005; Scholz *et al.*, 2010).

La prevención de la diabetes es mucho más eficiente que el tratamiento de la enfermedad y sus consecuencias. Aunque no hay medicamentos aprobados actualmente para la prevención en individuos de alto riesgo, es evidente que los

nutrientes que imitan sus mecanismos de acción podrían representar una alternativa natural muy útil. Con los alimentos que intervienen en la regulación de la homeostasis, hay un gran potencial para la identificación de estrategias de prevención nutricional simples y rentables (Thomas y Pfeiffer, 2012).

Hay evidencia de que la reducción de las concentraciones de glucosa induce la pérdida de peso, mejora el perfil lipídico, y el consumo de alimentos ricos en antioxidantes reduce el riesgo cardiovascular en personas con diabetes tipo 2 (Koloverou et al, 2016). Se ha descrito que las concentraciones de TNF-alfa y la homocisteína puede ser la base del mecanismo patogénico de la diabetes, lo que sugiere que la adopción de la dieta mediterránea puede ofrecer su efecto antidiabético través de una disminución en el estrés oxidativo y la inflamación subclínica (Koloverou et al, 2016).

La dieta mediterránea se ha relacionado con la reducción de la incidencia de enfermedades cardiovasculares y la mortalidad. Los componentes de la dieta mediterránea asociada con una mejor salud cardiovascular incluyen bajo consumo de carne y productos cárnicos, el consumo moderado de etanol (en su mayoría a partir de vino), y el alto consumo de verduras, frutas, frutos secos, legumbres, pescado y aceite de oliva. Es importante destacar que la dieta mediterránea se caracteriza por el uso diario de hierbas antioxidantes y especias (tales como ajo, cebolla, eneldo, orégano, y el curry en polvo) para aromatizar los alimentos y el consumo de vino tinto (Eposito y Giugliano, 2014). Las evidencias indican que la sinergia entre estos componentes da como resultado cambios beneficiosos en las rutas implicadas en el riesgo cardiometabólico, tales como lípidos, sensibilidad a la insulina, el estrés oxidativo, la inflamación y la vasorreactividad (Eposito y Giugliano, 2014).

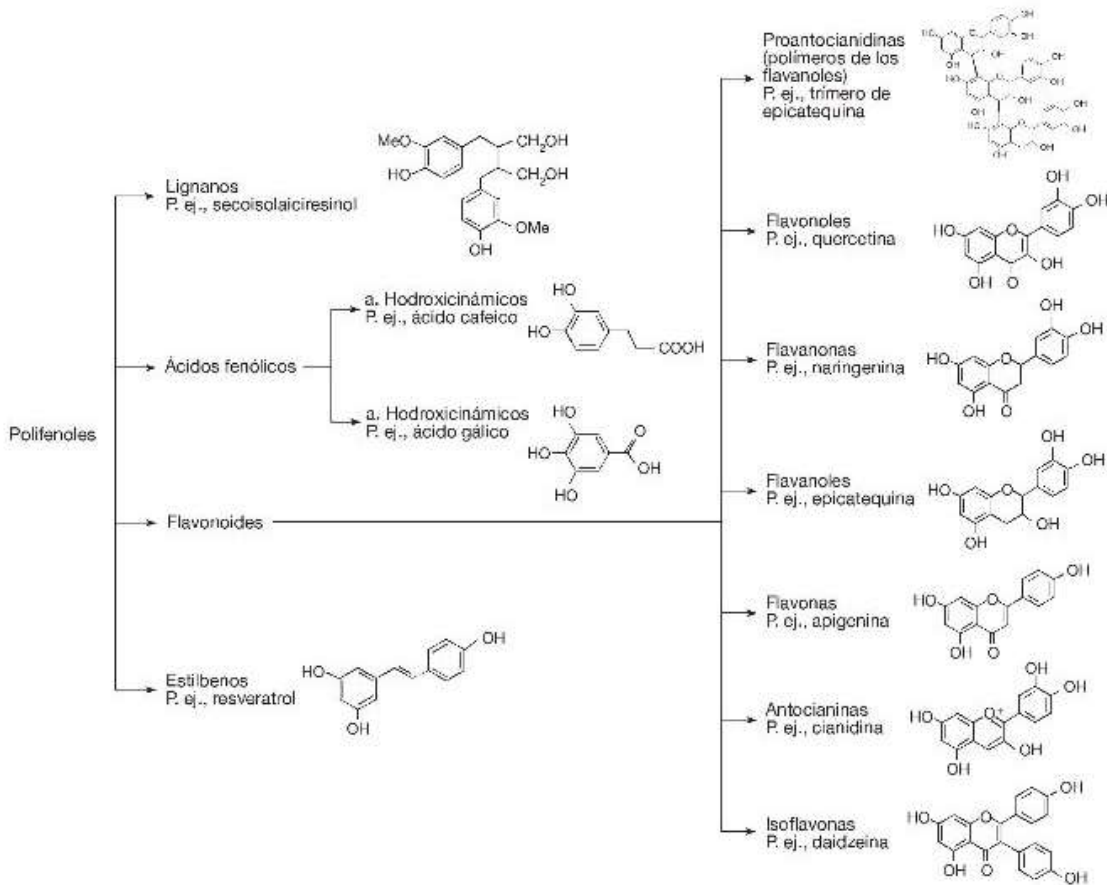


Figura 7. Clasificación de los polifenoles (Knekt *et al.*, 2002)

1.3.1 Manzana

La manzana (*Malus domestica*) pertenece a la familia de los *Rosaceae* para la cual existen cientos de variedades. En México, Red Delicious es una de las más importantes y su producción corresponde a aproximadamente a 250 000 toneladas anuales (http://gain.fas.usda.gov/Recent%20GAIN%20Publications/Fresh%20Deciduous%20Fruit%20Annual_Mexico%20City_Mexico_10-30-2015.pdf). Independiente de las diferentes variedades, el consumo de la manzana está ampliamente difundido en diversas culturas y es una de las principales fuentes de polifenoles en la dieta occidental (Peri *et al.*, 2005; Valavanidis *et al.*, 2009). En América se estima que es la segunda fuente más importante de flavonoides en la dieta (Łata, 2007).

La manzana posee excelentes propiedades antioxidantes siendo mayor que otras frutas que comúnmente se consumen como la uva roja, la fresa, el durazno, el limón, la pera, el plátano, la naranja y la piña (Boyer y Liu, 2004). La capacidad de neutralizar los radicales libres tiene una relación directa con el contenido total de polifenoles (Leontowicz *et al.*, 2002), puesto que la vitamina C sólo es responsable de 0.4% de ésta (Liu, 2002). Por otra parte, la manzana tiene una mayor concentración de polifenoles no asociados con azúcares en comparación de otras frutas, haciéndolos posiblemente más disponibles para su absorción.

La composición y concentración de estos fitoquímicos depende de muchos factores como la variedad de manzana, nutrientes disponibles, temperatura, grado de madurez (Bizjak *et al.*, 2013), particularmente a la exposición de la luz (Chen *et al.*, 2013), la cosecha, la posición del fruto en el follaje del árbol (Feng *et al.*, 2014) el almacenamiento y procesamiento de las manzanas (Francini y Sebastiani, 2013). Es de esperarse que los factores ambientales afecten la expresión de los genes involucrados en las rutas metabólicas de la síntesis de los compuestos antioxidantes, así como ya fue demostrado para la expresión de genes de la síntesis de antocianinas en la cáscara de la manzana (Feng *et al.*, 2013; Peng y Moriguchi, 2013; Vimolmangkang *et al.*, 2014). A su vez, la concentración y también varía entre la pulpa y la cáscara, puesto que los flavonoles que se encuentran en la cáscara no se encuentran en la pulpa (Petti y Scully, 2009).

1.3.2 Manzana y beneficios en su consumo

La evidencia que existe sobre los efectos benéficos de la manzana sobre la salud proviene principalmente de los estudios epidemiológicos. En donde se ha encontrado que el consumo de manzana esta inversamente relacionado con cáncer de pulmón, enfermedades del corazón (Rupasinghe *et al.*, 2008) asma y diabetes tipo 2 (Konopacka *et al.*, 2010).

En específico la protección cardiovascular de la manzana se ha evaluado en estudios *in vitro* e *in vivo* a partir de diferentes fuentes: cáscara entera, extracción de sus polifenoles, o por la utilización de un sólo polifenol (que se encuentra en la fruta). A partir de estudios *in vitro* se ha demostrado: la capacidad de fracciones

fenólicas extraídas de la cascara de la manzana de inhibir la oxidación del aceite de pescado (Sekhon-Loodu et al., 2013); la capacidad de algunos extractos fenólicos de funcionar como antihipertensivos (Balasuriya y Rupansinghe, 2012); el potencial de inhibir la oxidación del colesterol humano LDL (Thilakarathna et al., 2013); las acciones benéficas para reducir la oxidación y la inflamación intestinal (Denis et al., 2013); alta capacidad antioxidante de extractos de cascara de distintas variedades de manzana (Karaman et al., 2013; He y Liu, 2008); el potencial para funcionar como antiproliferativo de líneas celulares tumorales (He y Liu, 2008); Actividad limpiadora de radicales libres (Chinnici et al., 2004). De los estudios in vivo su acción protectora se ha relacionado principalmente con: 1) disminución de la grasa visceral en roedores (Kobori et al., 2011; Budak et al., 2011, Nakazato et al., 2008) y en humanos (Nagasako-Akazome et al., 2007); y 2) disminución de lípidos sanguíneos en roedores (Leontowicz et al., 2003; Bladé et al., 2010; Shishehbor et al., 2008, Salgado et al., 2008, Osada et al., 2006; Lam et al., 2008; Aprikian et al., 2001; Aprikian et al., 2002; Aprikian et al., 2003; Sanchez et al., 2008; González et al., 2015, Fhaty y Drees, 2016).

En estudios realizados directamente en humanos muestran resultados contradictorios. No obstante, existen diferencias entre los resultados obtenidos primordialmente por los diferentes tipos y cantidades empleadas en cada uno de ellos.

Por lo expuesto anteriormente, el objetivo principal del presente estudio, fue cuantificar las acciones de la cáscara de manzana sobre las propiedades electrofisiológicas del corazón de ratas macho Wistar con diabetes experimental.

1.3.3 La cáscara de manzana

Los polifenoles que contiene la manzana generalmente se concentran en la zona epidérmica (Łata, 2009; Kunradi Vieira, 2009), no obstante, se ha descrito que la cáscara contiene de tres a seis veces más flavonoides, además de glucósidos de quercetina de los cuales carece la pulpa (Wolfe *et al.*, 2003; Seipel *et al.*, 2009). Relacionado con estos últimos compuestos se sabe que el consumo de la

quercetina está asociado con la disminución del riesgo a desarrollar la diabetes (Knekt *et al.*, 2002; Boyer y Liu, 2004), además de que la catequina y la quercetina tienen efecto directamente sobre canales iónicos del corazón (Scholz *et al.*, 2010). Otros polifenoles con excelente actividad antioxidante que han sido identificados en la cascara de la manzana son la epicatequina y la procianidina B2 (Tsao *et al.*, 2005). Recientemente, se ha propuesto que las antocianinas son los compuestos fenólicos que más contribuyen al efecto antioxidante de la cascara de manzana (Bi *et al.*, 2014).

Los terpenoides (también llamados isoprenoides o terpenos) son una de las familias de fitoquímicos más grandes. Biológicamente, los terpenoides tienen funciones de defensa en la interacción entre las plantas y su medio ambiente. El ácido oleanólico (3 β -hidroxi-Olean-12-en-28-oico; OA) y su isómero, el ácido ursólico (3 β -hidroxi-urs- ácido 12-en-28-oico; UA), que son los dos principales triterpenos en la cáscara de manzana, se encuentran comúnmente en la cera cuticular de frutos y hojas de oliva, caqui, pera y algunas hierbas. De especial interés son los efectos beneficiosos para la salud del OA y el UA, y una variedad de patentes se han presentado en todo el mundo describiendo el beneficio de estos compuestos sobre la salud. Los efectos benéficos por ejemplo, incluyen la inducción de la apoptosis a través de la apoptosis mediante la inhibición de NF-kB y la activación de p53 y / o la caspasa-3. Otros efectos para la salud que se sugieren son actividad antidiabética través de la acción como un agente sensibilizador a la insulina, así como efectos antiinflamatorios (Lv *et al.*, 2015).

Es importante mencionar que cada año se procesan en el mundo millones de toneladas de manzana generando como desecho también millones de toneladas de cáscara (Henriquez *et al.*, 2010; Lavelli y Coti, 2011). Puesto que se ha observado que el procesado de las cáscaras de manzana tiende a conservar sus compuestos fenólicos y flavonoides (Boyler y Liu, 2004) resulta interesante utilizar ésta como un ingrediente en la dieta para incrementar la capacidad antioxidante de la dieta normal.

2 JUSTIFICACIÓN

La diabetes mellitus es una enfermedad con alta prevalencia en el mundo por lo que se ha convertido en un gran problema de salud. México no es la excepción, de hecho, se encuentra dentro de las principales causas de mortalidad. De las complicaciones de la diabetes, la cardiovascular es la primera causa de morbilidad y mortalidad. Además de la enfermedad coronaria y modificación de la presión arterial que se asocia a esta patología, se ha observado que la diabetes induce, a su vez, el deterioro de la estructura y el funcionamiento del tejido cardíaco conocido como cardiomiopatía diabética. Esta última hace que el corazón se vuelva más susceptible a sufrir arritmias que pueden provocar la muerte súbita. En la actualidad se considera al estrés oxidante como uno de los principales causantes de estas modificaciones en el corazón. El estrés oxidante puede ser contrarrestado con los antioxidantes dietarios. Los estudios epidemiológicos vinculan el consumo frecuente de manzana con bajo riesgo a desarrollar diabetes tipo 2 o enfermedades del corazón. Este efecto protector de la manzana es atribuido a los polifenoles que contiene e incluso es considerada como una fruta con excelentes propiedades antioxidantes. Interesantemente, es la cáscara de manzana la que es más rica en polifenoles y es un producto de desecho en la industria alimentaria. No obstante, a la fecha, no se han encontrado en la literatura estudios que determinen la acción directa de la cáscara de manzana sobre la actividad electrofisiológica del corazón, en condiciones de diabetes.

3 HIPÓTESIS

La ingesta de cáscara de manzana atenúa los daños causados por la diabetes mellitus 1 y 2 sobre el corazón

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar las modificaciones inducidas por la cáscara de manzana en ratas con diabetes mellitus en:

- 1) las propiedades electrofisiológicas del corazón
- 2) el perfil bioquímico

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar la composición de la cáscara de manzana Red Delicious
- Analizar y evaluar a 30 y 90 días la acción de la cáscara de manzana en ratas sanas, con diabetes mellitus 1 y 2 y controles sobre:
 - propiedades electrofisiológicas del corazón (APA, PRM, PRA, Duracion de los PA (30, 50, 90%), umbral intracelular y resistencia de entrada).
 - perfil bioquímico (HbA_{1C}, glucosa, insulina, triglicéridos, colesterol total y c-HDL).

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Obtención de la cáscara de manzana

La manzana Red Delicious fue adquirida en la central de abastos de Ciudad Juárez, Chihuahua, producto de la cosecha del 2011 y con el código PLU 4016. Para la obtención de la cáscara se empleó un pelador de manzanas manual después del lavado de la fruta. La cáscara se deshidrató en un liofilizador Labconco FreeZone de 6 L y se pulverizó hasta la obtención de un polvo fino el cual se empaco al vacío en bolsas de plástico protegidas de la luz a -20°C hasta su posterior uso.

5.2 Análisis de la cáscara de manzana

5.2.1 Análisis proximal

El análisis proximal de la cáscara de manzana se realizó de acuerdo a la metodología oficial indicada por la *Association of Official Analytical Chemist* (AOAC) de 1995. Brevemente, la humedad se determinó por deshidratación en estufa a 100°C y las cenizas de este residuo, se calcularon como el peso remanente después de calcinar la muestra en la mufla a 500°C durante 2 horas. El nitrógeno total se obtuvo por el método de Kjeldahl y el cálculo de la proteína total se realizó mediante la multiplicación del nitrógeno total por el factor de 6.25. La fibra se estimó después de la digestión ácida y alcalina y la grasa cruda se cuantificó empleando la metodología de Soxhlet. Los carbohidratos fueron obtenidos por diferencia de los componentes determinados anteriormente.

5.2.2 Análisis estructural por Resonancia Magnética Nuclear (RMN) y Espectrometría de Masas (EM)

El liofilizado de cáscara de manzana se suspendió en D₂O (700 µL), se centrifugó a 5000 rpm durante 15 min y el sobrenadante se analizó por RMN de ¹H y ¹³C en un espectrómetro Bruker AVANCE III a frecuencias de Larmor de 750 MHz

y 187,5 MHz, respectivamente. Para el análisis de espectrometría de Masas, las muestras se disolvieron en metanol y se analizaron en un espectrómetro de masas Bruker micrOTOF-Q II en los modos positivos y negativos con ionización química a presión atmosférica. Ambos estudios se realizaron bajo la dirección de en el Centro de Nanociencias y Micro y Nanotecnologías-IPN.

5.2.3 Evaluación de los polifenoles

La extracción de los fenoles se realizó empleando 20 g de la cáscara de manzana en polvo disuelta en 125 mL de metanol al 80%, dicha solución fue sonicada (SWBR27 Shel Lab Shaking Water Bath) por 30 minutos protegida de la luz. Posteriormente, el extracto se centrifugo (2000 x g) por 5 minutos y el sobrenadante resultante se recolecto realizando este procedimiento por triplicado. La eliminación del metanol de los tres sobrenadantes se realizó en un rotavapor (BUCHI Rotavapor R-3) a 45°C en vacío y el residuo fue liofilizado en un equipo Labconco FreeZone por 72 horas. Finalmente, el extracto se almacenó al vacío a menos 20°C.

El contenido total de fenoles se determinó con el método colorímetro de Folin-Ciocalteu modificado (Singleton *et al.*, 1965). Se mezcló 0.5 mL de una solución de cáscara de manzana (8 mg/mL en metanol al 80%) con 2.5 mL de reactivo Folin-Ciocalteu al 10% dejando reaccionar por 2 minutos a temperatura ambiente. Se agregó 2 mL de una solución Na₂CO₃ al 7.5% y la solución se incubó por 15 minutos a 50°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La absorbancia se midió a 760 nm con un espectrofotómetro (8452A Agilent Technologies Canada Inc). Para la cuantificación se utilizó una curva estándar de ácido gálico y los resultados se expresaron en de mg de equivalente del mismo (EAG) por 100 g de cáscara seca. La determinación de los isómeros del ácido clorogénico y el epicatequina se llevó a cabo en los laboratorios de la Compañía Silliker a Mérieux NutriSciences en Grand Praire, Texas, EUA.

5.3 Diseño biológico experimental

Se emplearon ratas machos de la cepa Wistar adquiridas en Rismart & Research Global Solutions en México DF, México. El cuidado de los animales se realizó con apego a la Norma Mexicana Oficial (NOM-062-ZOO-1999). Los animales se mantuvieron a temperatura constante a 25°C con ciclos de luz y oscuridad cada 12 horas. El alimento (dieta estándar PROLAB RMH 2500) y el agua se ofreció *ad libitum* durante todo el tiempo del experimento.

El procedimiento experimental consistió en dos fases de duración: la primera de 30 días y la última de 90 días. El protocolo se muestra resumido en la Figura 6.

Los subgrupos con cáscara (CC) recibieron una dosis diaria de 150 mg/kg de peso corporal de cáscara de manzana. El concentrado se disolvió con agua destilada en volúmenes pequeños y se administró por vía oral con una jeringa de tuberculina. La dosis estuvo equiparada al consumo diario de la cáscara de tres manzanas/día ingeridas por un hombre adulto con 70 kg de peso corporal.

Mientras que los subgrupos de Glibenclamida (Gli) recibieron una dosis diaria de 0.25 mg/kg de peso corporal disueltas en agua destilada en volúmenes pequeños con una jeringa de tuberculina en la boca de las ratas.

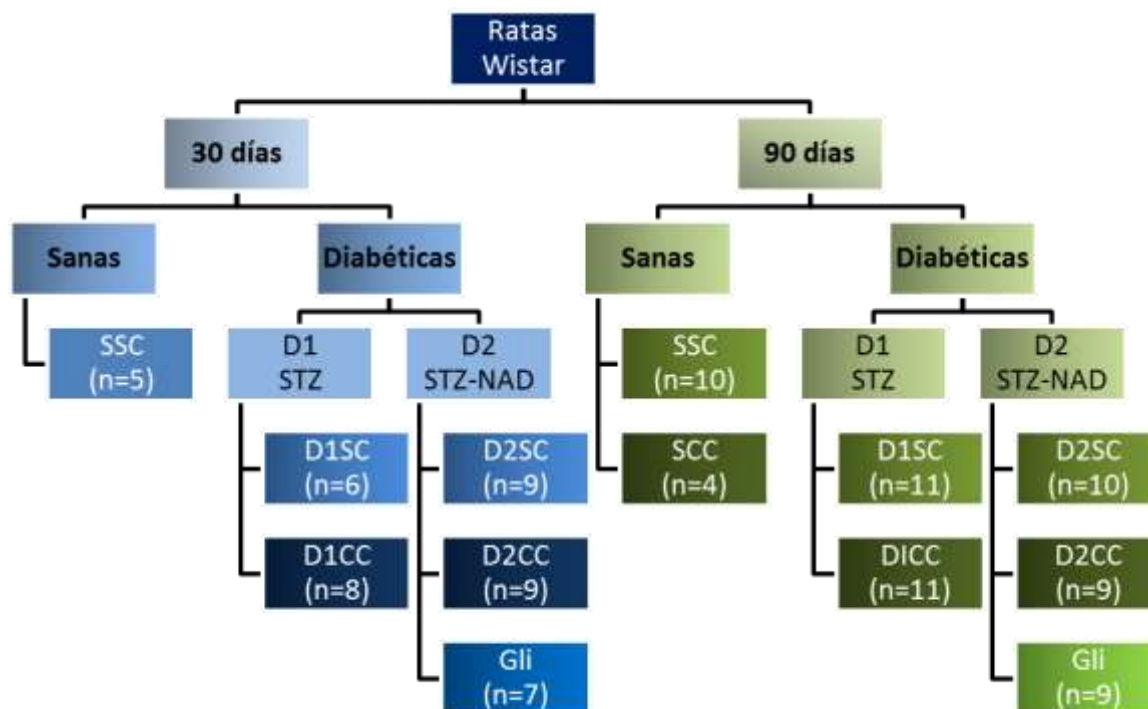


Figura 8. Diseño experimental

STZ=estrepotocina, NAD=nicotinamida, D1=Inducción con STZ, D2=Inducción con STZ-NAD, SSC=Sanas sin cáscara, SCC=Sanas con cáscara, D1SC=Diabetes tipo 1 sin cáscara, D1CC=Diabetes tipo 1 con cáscara, D2SC=Diabetes tipo 2 sin cáscara de manzana, D2CC=Diabetes tipo 2 con cáscara de manzana, Gli=Glibenclamida.

5.3.1 Inducción de la diabetes mellitus

La inducción de la diabetes mellitus tipo 1 se realizó mediante la aplicación única de 45 mg/kg por vía intraperitoneal de estreptozotocina (STZ, Sigma Chemical Company, n° catalogo 104-4) disuelta en buffer de citrato (composición, pH 4.8). Para la inducción de diabetes tipo 2 se empleó una inyección intraperitoneal de STZ seguida por una inyección de nicotinamida (NAD, Sigma Chemical Company) disuelta en solución salina 15 minutos después (Pari y Suma, 2010). Debido que el NAD es un antioxidante que ejerce un efecto protector sobre la acción citotóxica de STZ (mediada por estrés oxidante) no destruye totalmente

las células β pancreáticas, simulando una diabetes de tipo 2 (con parcial producción de insulina).

Con el objetivo de evitar la mortalidad debido a la hipoglucemia consecuente a la inyección con STZ las ratas se mantuvieron con agua azucarada de 60 mM *ad libitum*, durante una semana. La glucemia en ambos modelos de diabetes se confirmó ocho días posteriores a la inducción mediante un glucómetro comercial (OneTouch® Ultra® 2). Las ratas con una glucemia superior a 150 mg/dL se utilizaron para el estudio. En casos de no confirmarse la diabetes se procedió a inducirla nuevamente. Todos los experimentos se llevaron de acuerdo a los lineamientos establecidos por el Comité de ética para animales de experimentación de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez

5.4 Análisis bioquímicos

La hemoglobina glicosilada se evaluó por espectrometría en el laboratorio clínico Servalab (Puebla, México) por medio de kit Lavona Check A1c en un HbA_{1c} Analyzer. Los niveles plasmáticos de insulina se determinaron por quimioluminiscencia en el Laboratorio Italo Gaya (Puebla, México).

5.5 Experimentos electrofisiológicos

Las ratas se anestesiaron con pentobarbital sódico a una dosis de 50mg/kg el cual se mezcló con heparina. Una vez que se exploró que el espécimen no percibía dolor, se realizó un corte en toda la longitud de la línea media abdominal para tener acceso a la cavidad abdominal, posteriormente se realizó la punción cardiaca para la obtención de la sangre. Después se extrajo el corazón el cual fue colocado en una cámara para tejidos aislados y se superfundió con solución de Tyrode oxigenado con mezcla de 95% de O₂ y 5% de CO₂ a temperatura de 37°C. Finalmente se aislaron los músculos papilares del ventrículo izquierdo.

Los experimentos electrofisiológicos se realizaron en los músculos papilares. La preparación se estimuló a un ciclo básico de 500 milisegundos a través de electros bipolares de plata recubiertos con material aislante, excepto en la punta y

fueron colocados en la base del músculo papilar. Los estímulos fueron pulsos rectangulares de 1 milisegundo de duración e intensidad 1.5 veces el umbral, obtenidos de un generador de intervalos, marca Digitimer modelo D4030 y se pasaron a través de unidades de aislamiento marca Digitimer, modelo DS2. Cuando se determinó la propagación de respuestas prematuras, la preparación se estimuló regularmente a un ciclo básico de 500 milisegundos y después de aplicar ocho estímulos básicos se introdujo un estímulo de prueba a diferentes intervalos de tiempo a través del mismo par de electrodos de estimulación.

Los PA intracelulares se registraron con microelectrodos de vidrio llenos con una solución de KCl 3 M y con una resistencia en la punta entre 10 y 20 Megaohmios. La señal recogida por los microelectrodos pasaba a través de los respectivos amplificadores de alta impedancia de entrada, marca WPI, modelo 750 y HV Electrometer, modelo 400E y se registraba en la pantalla de un osciloscopio, marca Tektronix modelo TDS 3034B, los datos fueron almacenados en una computadora marca Dell modelo GX 520, para su posterior análisis.

5.5.1 Evaluación de las propiedades activas

Para evaluar las propiedades activas del miocito cardiaco se procedió a la medición de la amplitud, la duración del potencial de acción al 30%, 50% y 90%, así como la medición del Potencial de Membrana en Reposo (ver Figura 7 A). Además, se determinó el Periodo Refractario Absoluto y el inicio del periodo refractario relativo (ver Figura 9 Panel B).

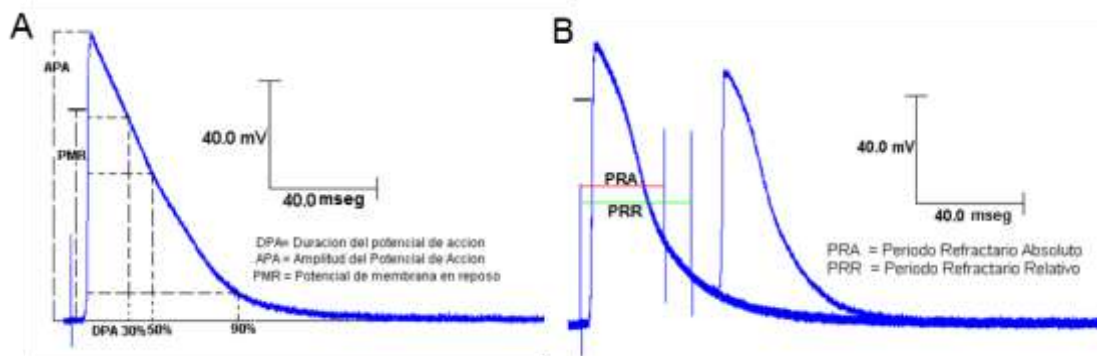


Figura 9. Mediciones del PA y Periodos Refractarios

5.5.2 Evaluación de las propiedades pasivas

La evaluación de las propiedades pasivas se realizó por medio de la determinación de los umbrales intracelulares y la resistencia de entrada de acuerdo al método de Méndez y Hernández (2001). La medición de la corriente umbral mínima necesaria para iniciar DPA se obtiene de manera directa como se muestra en la Figura 10 (color rojo). La resistencia de entrada se calcula con la función matemática de la forma $Y=K/X$, la cual corresponde a una hipérbola equilátera donde la K es una constante y tiene un valor de 30mV y los valores de Y son los umbrales intracelulares determinados experimentalmente.

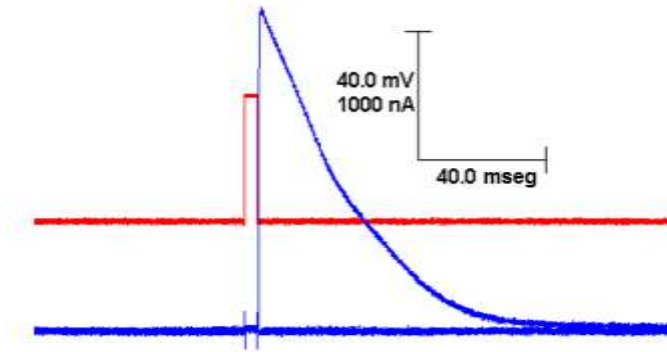


Figura 10. Mediciones del umbral intracelulares

6 RESULTADOS

6.1 Composición de la cáscara de manzana

La cáscara de manzana está compuesta principalmente de agua (aprox. 81%), carbohidratos (15%) y fibra cruda (1.6%). El contenido de polifenoles totales fue de 1100 μ GAE/100g en peso seco, mientras que los isómeros del ácido clorogénico y epicatequina estuvieron presentes a una concentración de 0.148 mg/g y 2.35 mg/g respectivamente. La determinación de los polifenoles totales por medio del método de Folin-Ciocalteu depende de la técnica empleada para la extracción de los polifenoles, así como las unidades empleadas para reportarlos por lo que dificulta la comparación de los resultados. No obstante, la determinación del ácido clorogénico y epicatequina en la cáscara concuerda con los publicados por otros autores y ambos polifenoles son los más abundantes en la manzana (Francini y Sebastiani, 2013).

Componente	%
Humedad	81.5
Ceniza	1.45
Proteína cruda	0.02
Grasa cruda	0.35
Carbohidratos	15
Fibra cruda	1.59

Tabla 3. Análisis de la composición de la cáscara de manzana

La fracción soluble acuosa de la cáscara de manzana se analizó por ^1H RMN mostrando un espectro complejo en el que las señales de los correspondientes hidrógenos anoméricos de numerosos azúcares fueron evidentes (Figura 11). Esencialmente, la presencia de glucosa se confirmó por la presencia de señales dobles características en 5.22 ppm. El análisis Bayesiano (Hao *et al.*,

2014) y la deconvolución del espectro reveló también la presencia de fructosa, sacarosa, D-xilosa, L-alanina, L-aspartato, L-glutamina, L-isoleucina, metilmalonato, clorogenato y ácido cafeico. El espectro de RMN de ^{13}C por su parte mostró las señales correspondientes a los carbonos anoméricos de fructosa y sacarosa y las formas de β - y α -glucosa a 98.26 y 102.14 ppm, respectivamente (Figura 11).

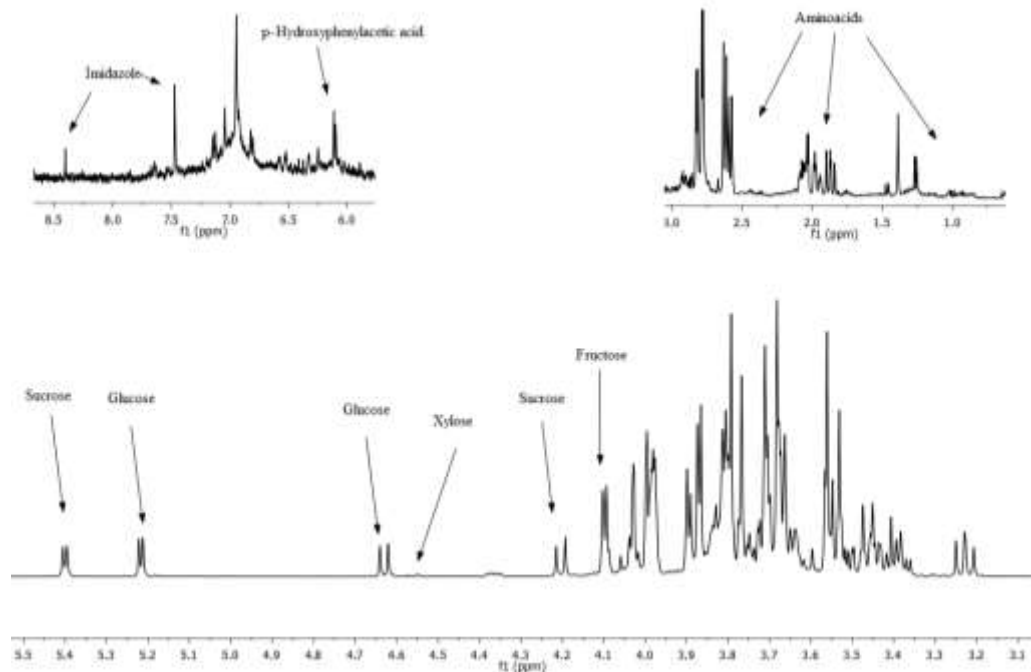


Figura 11. Espectro de RMN de ^1H en D_2O a 750 MHz de la cáscara de manzana

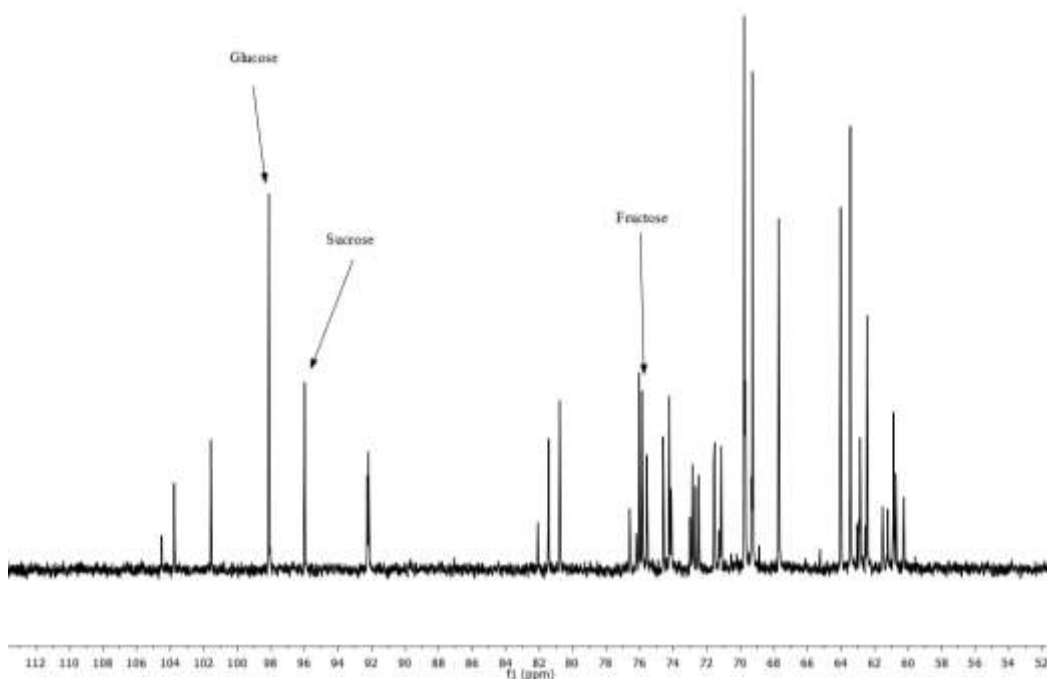


Figura 12. Espectro de RMN de ^{13}C en D_2O a 188.4 MHz de la cáscara de manzana

El espectro de masas de alta resolución en modo positivo de la cáscara de manzana reveló un pico más abundante de 203.0562 m/z, que corresponde al fragmento $[\text{C}_8\text{H}_{11}\text{O}_6]^+$, posiblemente perteneciente al maleato de dietilenglicol. El siguiente pico más abundante (219.0302 m/z) correspondió a un fragmento $[\text{C}_{11}\text{H}_7\text{O}_5]^+$, el cual es un producto conocido proveniente de la reordenación de cumarinas o flavonoides y que se ha descrito en análisis de algunas pieles frutales. Dichos compuestos generalmente están unidos a unidades de glucósidos, como pudo evidenciarse con los picos a 365.1071 y 381.0808 m/z, que representan la pérdida de un monómero de azúcar. El modo de ionización negativo demostró un patrón de fragmentación muy característico de al menos dos oligosacáridos. Uno de ellos compuesto de 5 unidades de glucosa, con un fragmento $[\text{C}_6\text{H}_{11}\text{O}_6]^-$ de 179.0592 m/z, y el segundo compuesto por 5 unidades de sacarosa, con el fragmento $[\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{O}_{11}]^-$ de 341.1095 m/z. (http://www.chemcalc.org/mf_finder/mfFinder_em_new revisado enero de 2015) (Figuras 13 y 14).

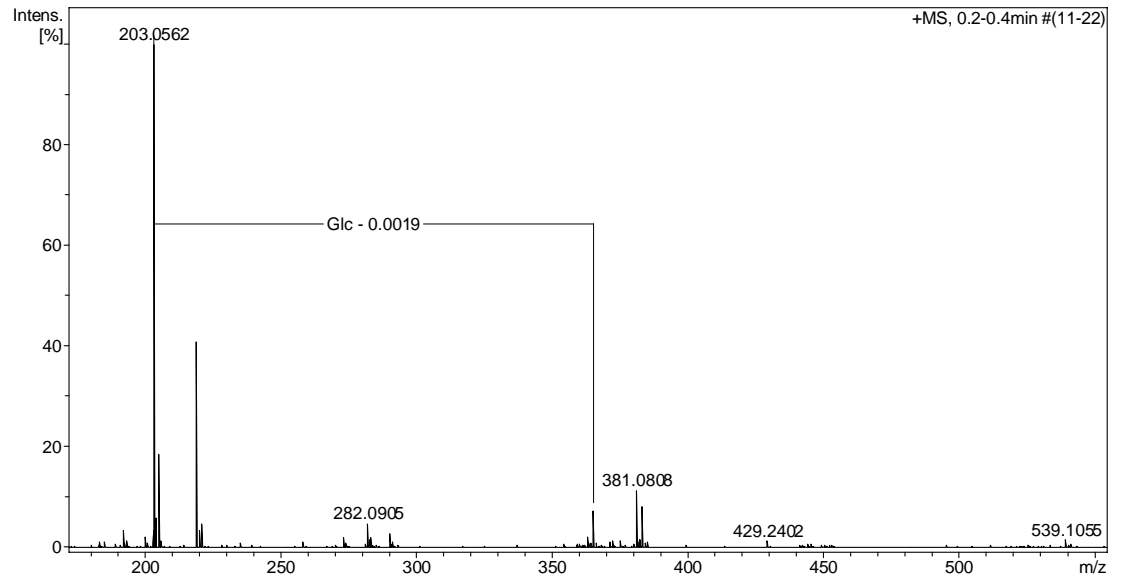
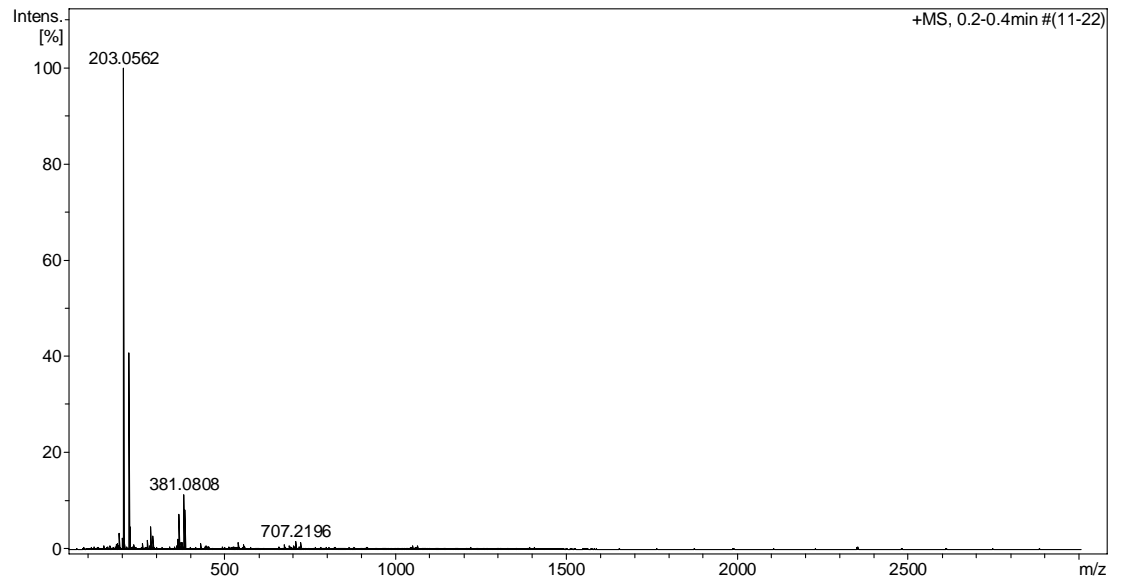


Figura 13. Espectro de Masas en MeOH modo positivo de la cáscara de manzana

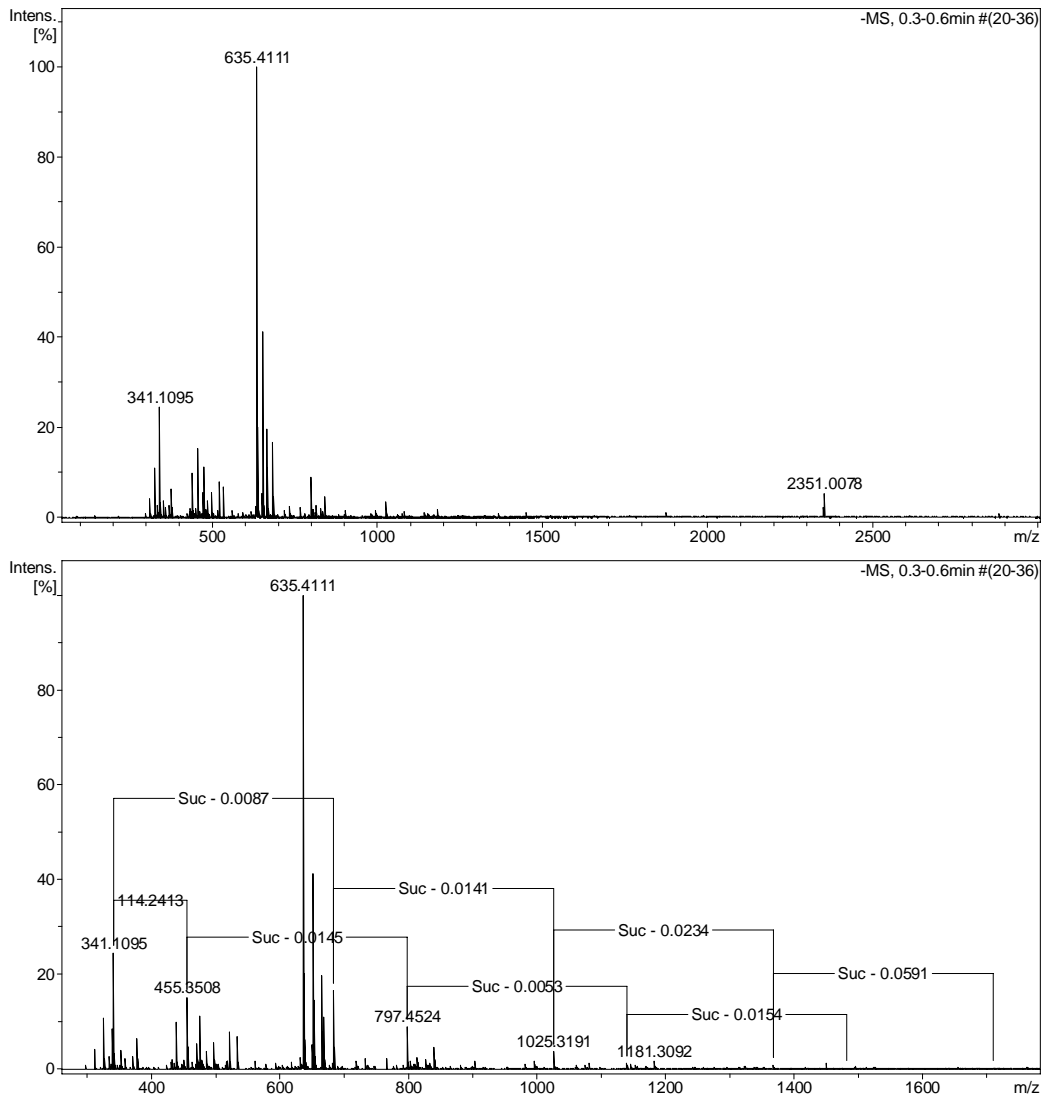


Figura 14. Espectro de Masas en MeOH modo negativo de la cáscara de manzana

6.2 Peso corporal y parámetros bioquímicos

A los 30 días, los pesos corporales en los grupos de D1 y D2 no mostraron diferencia con el grupo C (30d) con o sin tratamiento oral de cáscara de manzana. Por otro lado, a los 90 días, el grupo D1SC y D1CC evidenciaron un peso más bajo que el control, mientras que para el grupo D2SC esta disminución del peso fue revertida por el grupo con el tratamiento, grupo D2CC (Figura 15). Como era de

esperarse, los grupos tratados con glibenclamida (G) mantuvieron el peso sin diferencia de acuerdo con los controles, en ambos tiempos.

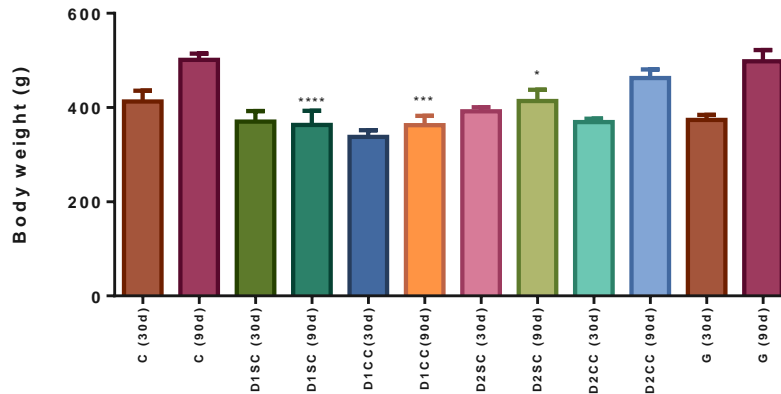


Figura 15. Diferencias en peso corporal expresadas en valores promedio y desviación estándar

* $p < 0.1$, ** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. Control correspondiente al tiempo.

Los niveles de glucosa para los grupos D1SC y D1CC, fueron elevados respecto a los grupos control (≥ 400 mg/dL) a los 30 y 90 días. Interesantemente el grupo D2SC presentó una elevación del nivel de glucosa a los 90 días y éste fue revertido para el grupo tratado D2CC. Los grupos G en ambos tiempos de tratamiento, mantuvieron los niveles de glucosa sin diferencia con respecto a los controles (Figura 16).

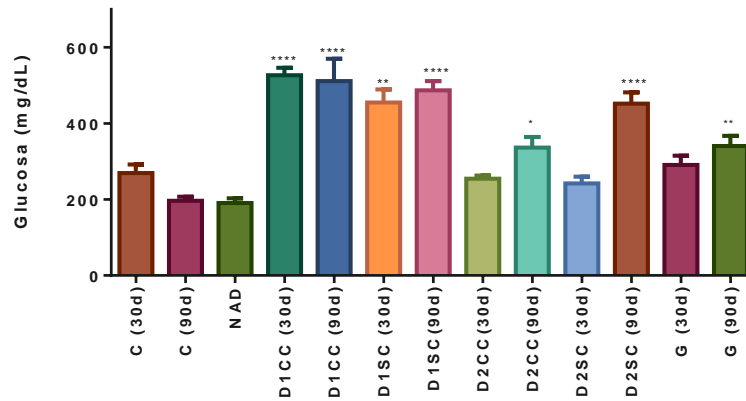


Figura 16. Diferencias en niveles de glucosa expresadas en valores promedio y desviación estándar

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control correspondiente al tiempo.

Los niveles de HbA_{1c}, por su parte, se elevaron con respecto a los grupos control para el modelo D1 a los 30 y 90 días con o sin tratamiento, mientras que, interesantemente para el modelo D2, los valores se elevaron a excepción del grupo D2CC a los 90 días de experimentación. Para los grupos G, se observó un ligero aumento con el tratamiento a largo plazo (Figura 17).

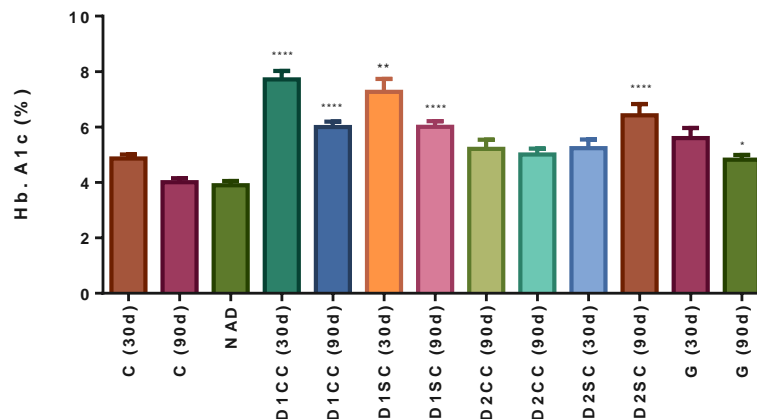


Figura 17. Diferencias en niveles de HbA_{1c} expresadas en valores promedio y desviación estándar

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control correspondiente al tiempo.

Finalmente, para los niveles de insulina, los grupos D1 presentaron una disminución a 30 y 90 días con y sin tratamiento, y para los grupos D2, dicha disminución sólo se observó a los 90 días, independientemente al consumo de cáscara de manzana. Con el tratamiento con G la disminución de insulina se observó sólo a los 90 días (Figura 18).

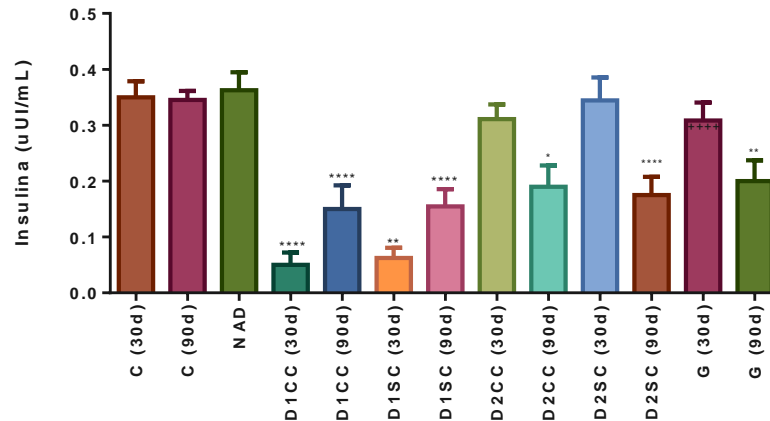


Figura 18. Diferencias en niveles de insulina expresadas en valores promedio y desviación estándar

* $p < 0.1$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$ vs. control correspondiente al tiempo

Como se muestra en las Figuras 19-22, para el perfil de lípidos: TC, TG, HDL y VLDL, el tratamiento con cáscara de manzana no mostró diferencias importantes entre los grupos de estudio. Sin embargo, las siguientes tendencias importantes se observaron, para el caso del TC (Figura 19), el grupo D1 presentó niveles altos a 30 días con o sin tratamiento y el grupo D2 niveles bajos e incluso menores con respecto a los controles. Para los TG el grupo D1 presentó niveles altos a 30 días en el grupo D1SC (Figura 20), mientras que para VLDL interesantemente, los grupos D1 a los dos tiempos de tratamiento, evidenciaron niveles altos sin el tratamiento (Figura 21). Finalmente los valores de HDL permanecieron sin cambios (Figura 22).

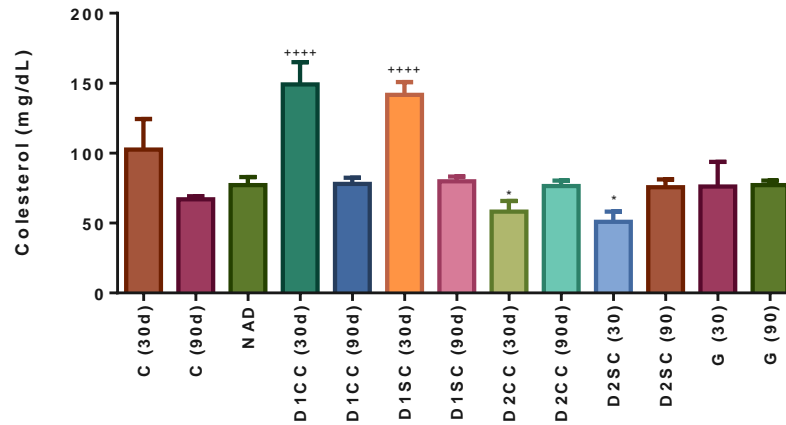


Figura 19. Diferencias en niveles de colesterol expresadas en valores promedio y desviación estándar

*p<0.1, ****p<0.0001 vs. control correspondiente al tiempo.

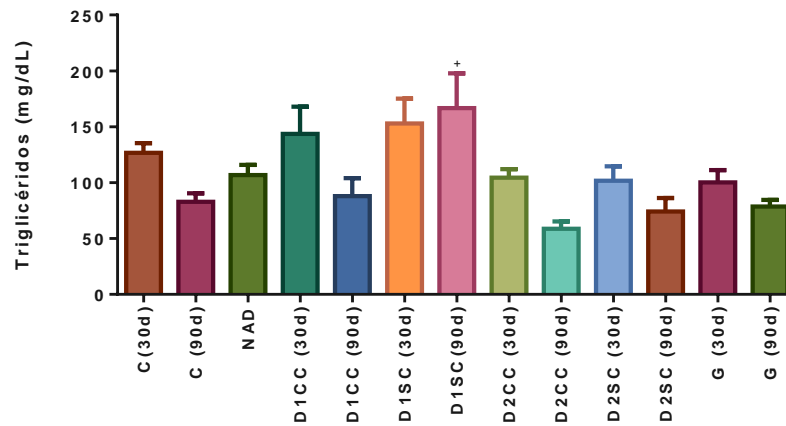


Figura 20. Diferencias en niveles de triglicéridos expresadas en valores promedio y desviación estándar

*p<0.1, vs. control correspondiente al tiempo.

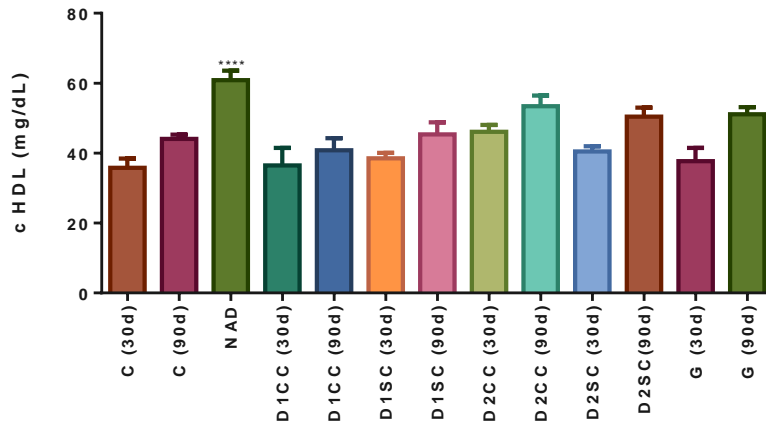


Figura 21. Diferencias en niveles de HDL expresadas en valores promedio y desviación estándar

*p<0.1, ***p<0.001 vs. control correspondiente al tiempo.

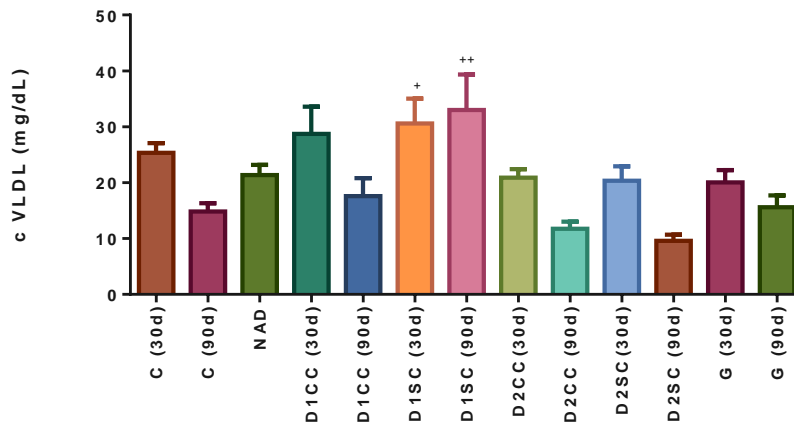


Figura 22. Diferencias en niveles de VLDL expresadas en valores promedio y desviación estándar

*p<0.1, **p<0.05 vs. control correspondiente al tiempo.

6.3 Potenciales de acción

6.3.1 Características de los potenciales de acción del corazón de ratas control y diabéticas

La diabetes tipo 1 prolongó la duración del PA a los 30 y 90 días, no obstante, a los 90 días aproximadamente triplicó la duración del PA que se presentó en los 30 días. La Figura 23 muestra los PA promedios superpuestos, registrados en los músculos papilares aislados de corazones provenientes de ratas control o sanas (rombo en azul) y diabéticas tipo 1 (círculo en rojo) de noventa días, evocados por un ciclo básico de 500 milisegundos.

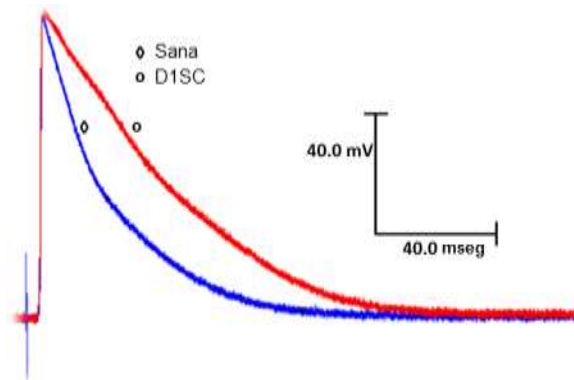


Figura 23. Cambios del PA en la diabetes tipo 1

Potenciales de acción representativos obtenidos de una célula del músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón de ratas control y diabética a un ciclo básico de 500 milisegundos

Con respecto a la diabetes tipo 2 se observó que a los 30 días hubo una reducción de la duración del potencial de acción (Figura 24). Mientras que a los 90 días la diabetes tipo 2 alargó la duración del PA al igual que la diabetes tipo 1 (Figura 25). La Figura 24 muestra como PA promedios de ratas con diabetes tipo 2 sin cáscara son mayores a los presentados por las ratas sanas.

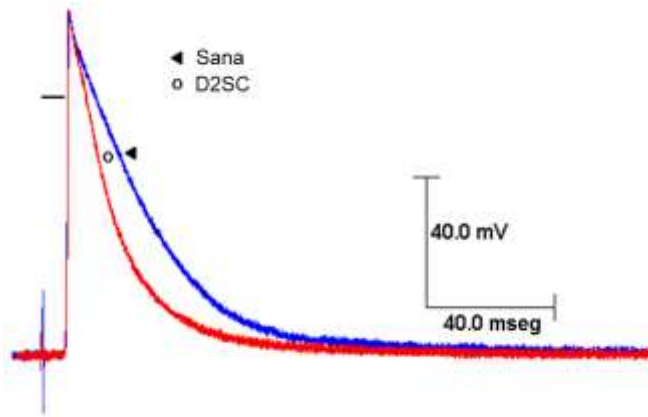


Figura 24. Cambios del PA en la diabetes tipo 2 a los 30 días

Potenciales de acción representativos obtenidos de una célula del músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón de ratas control y diabética a un ciclo básico de 500 milisegundos.

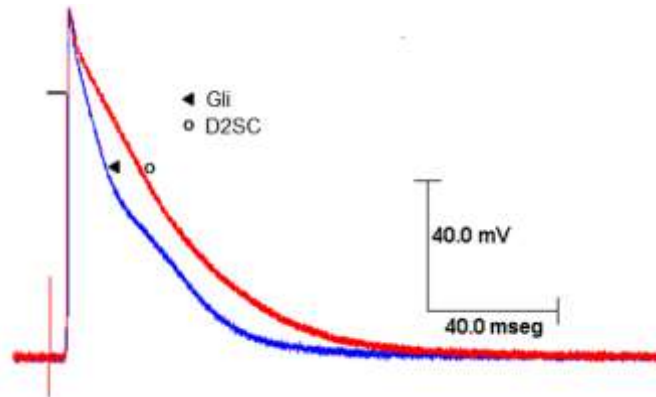


Figura 25. Cambios del PA en la diabetes tipo 2 a los 90 días

Potenciales de acción representativos obtenidos de una célula del músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón de ratas control y diabética tipo 2 a un ciclo básico de 500 milisegundos.

La Figura 26 muestra como la diabetes, a los 30 días, alteró significativamente la duración de los PA. La diabetes tipo 1 alargó las duraciones del 30, 50 y 90% con respecto a las sanas un 22.5, 19.1 y 25.2% respectivamente. Por lo contrario, la diabetes tipo 2 las disminuyó 26.3, 27.4 y 7.7% la duración del PA al 30, 50 y 90% en comparación a las sanas. El Periodo Refractario Absoluto (PRA) sólo se modificó de manera significativa en las ratas con D1 (aumento un 45.32%) con respecto a las ratas control.

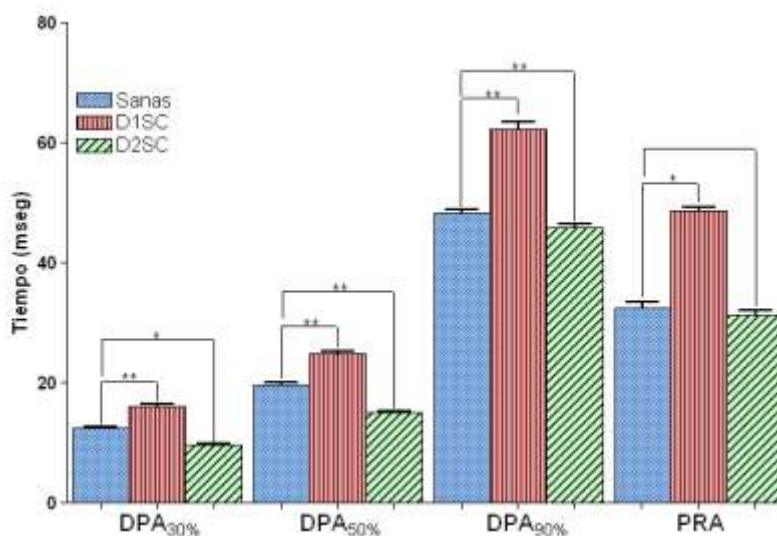


Figura 26. Duración del PA en ratas sanas, diabetes tipo 1 y tipo 2 sin cáscara (30 días)

Sanas (n=64), D1SC (n=174), D2SC (n=158); ** p<0.05, (*DPA= duración de los PA)

A los 90 días ambos tipos de diabetes aumentaron la duración de los PA (Figura 26). No obstante, la tipo 1 afectó en mayor medida el PA al 30 y 50% con un aumento de 65% para la primera y 57.2% para la segunda, en comparación de las sanas. De igual forma la diabetes tipo 2 aumentó significativamente la duración del PA al 30, 50 y 90% pero en menor media (14.8%, 12% y 6.3%, respectivamente). Los PRA aumentaron 34.8% en la D1 y 16.3% en la D2 en comparación al control.

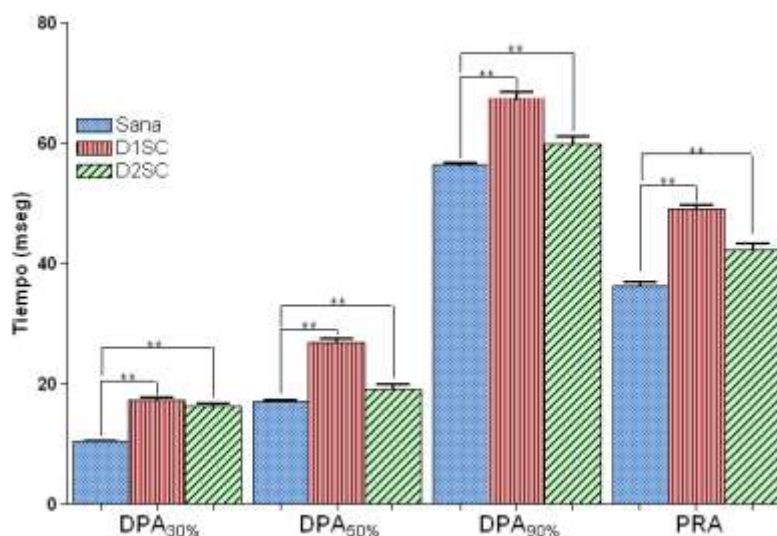


Figura 27. Duración del PA en ratas sanas, diabetes tipo 1 y tipo 2 sin cáscara (90 días)

Sanas (n=255), D1SC (n=276), D2SC (n=120); ** p<0.05 (*DPA= duración de los PA)

Dado que los efectos de la diabetes son más evidentes a los 90 días en las propiedades electrofisiológicas del corazón y por ende, la acción de la cáscara de manzana es más notoria en este periodo, a continuación se expondrán únicamente los resultados a los 90 días.

6.3.2 Características de los potenciales de acción del corazón de ratas diabéticas sin y con cáscara

La Figura 27 se observa que las ratas con diabetes tipo 1 que recibieron la cáscara de manzana por 90 días presentaron PA al 30, 50 y 90% significativamente menores a las mostradas por las ratas con diabetes tipo 1 pero que no recibieron la cáscara (9.53%, 45.18% y 13.24%, respectivamente). Por lo consiguiente, el PRA fue 18.53% menor en las ratas con cáscara en comparación a las sin cáscara.

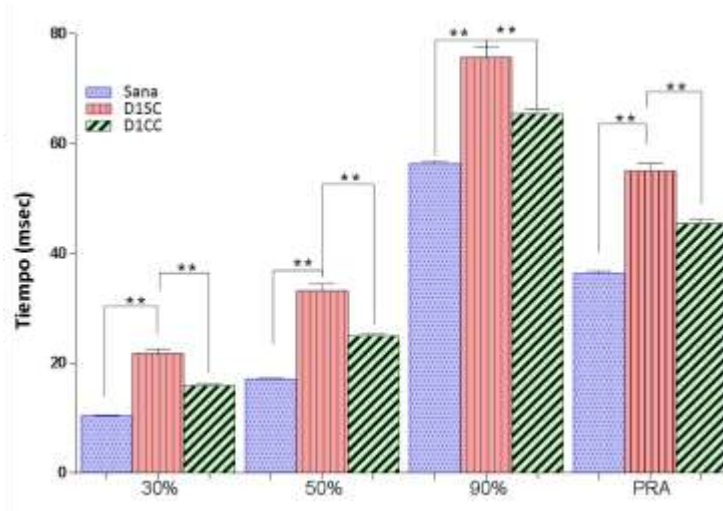


Figura 28. Duración de los PA de ratas control, diabetes tipo 1 sin cáscara y con cáscara por 90 días

Sanas (n=255), D1SC (n=110), D2SC (n=169); **p<0.05.

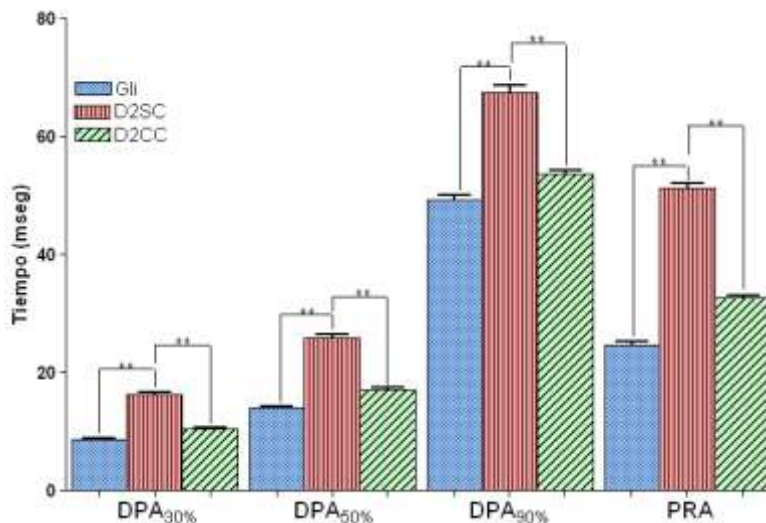


Figura 29. Duración de los PA en ratas con diabetes tipo 2 con Glibenclamida, sin y con cáscara (90 días)

Gli (n=73), D2SC (n=120), D2CC (n=216); *p<0.05, (*DPA= duración de los PA)

En la Figura 29 se puede ver como el subgrupo que no recibió la cáscara en la diabetes tipo 2 aumentó 9.4% en el PA 30%, 10.4 en el PA 50% y 13.4% en el PA 90% con respecto a las duraciones del subgrupo de glibenclamida (grupo

control para ratas con diabetes tipo 2). También los PRA aumentaron un 31.4% en las ratas sin cáscara, mientras que las ratas que recibieron la cáscara sólo aumento 1.7% en comparación a las de glibenclamida.

La Figura 30 es el resultado del promedio de los PA de ratas diabéticas con y sin 150 mg/kg de cáscara de manzana por 90 días.

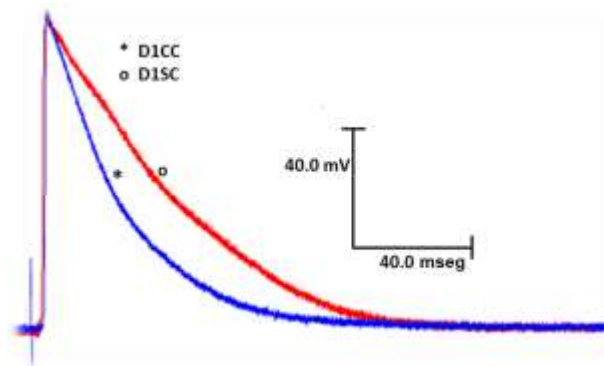


Figura 30. Acción de la cáscara de manzana sobre PA de ratas diabéticas tipo 1 (90 días)

Potenciales transmembrana típicos obtenidos en los músculos papilares del corazón de ratas diabéticas y diabéticas con cáscara de manzana a un ciclo básico de 500 milisegundos.

El efecto de la cáscara de manzana se puede observar en la Figura 30 donde están superpuestos los DPA promedios de ratas diabéticas tipo 2 con y sin 150 mg/kg de cáscara de manzana por 90 días.

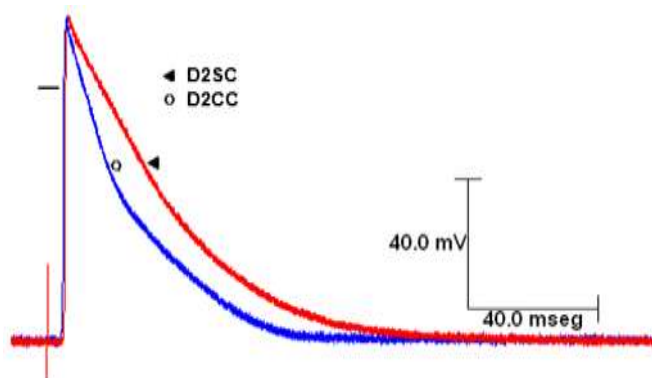


Figura 31. Acción de la cáscara de manzana sobre PA de ratas diabéticas tipo 2

6.4 Resistencia de entrada y de los umbrales intracelulares en los músculos papilares

6.4.1 Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en corazón de ratas sanas control y diabéticas

La Figura 32 señala los cambios entre los valores de resistencias de entrada y corrientes umbrales debidos a los efectos diabetogénicos. En los músculos papilares de ratas diabéticas se encuentran amplias variaciones de resistencias de entrada que oscilan entre 24 a 814.1 K Ω ; y de corrientes umbral de 36 a 1232 nanoamperios. Obsérvese el desplazamiento hacia valores altos en la resistencia de entrada y umbrales bajos en el corazón de ratas diabéticas.

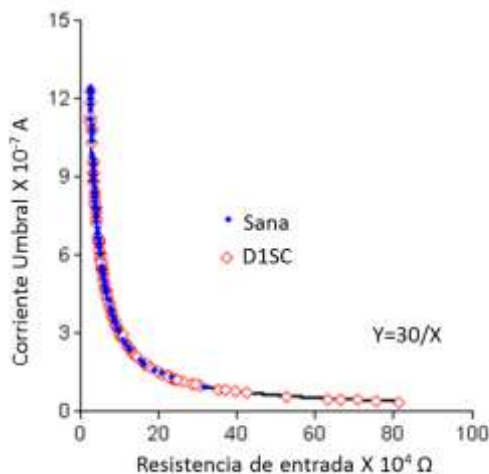


Figura 32. Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en las ratas control y ratas diabéticas

Relación obtenida en los músculos papilares del corazón de ratas control y con diabetes. La línea continua corresponde a la hipérbola equilátera teórica $Y=30/X$. Símbolos llenos, ratas control; símbolos vacíos, ratas diabéticas

En la diabetes tipo 2 se empleó como grupo control a las ratas que recibieron glibenclamida para observar los cambios entre los valores de resistencias de entrada y corrientes umbrales debidos a los efectos diabetogénicos

(Figura 33), en donde se puede apreciar que las ratas que recibieron glibenclamida presentan resistencias de entrada que oscilan entre 30 a 170 K Ω ; y de corrientes umbral de 17 a 1232 nanoamperios. Mientras que las ratas con diabetes tipo 2 pero sin glibenclamina ni cáscara los valores de resistencia de entrada varían de 30 a 290 K Ω .

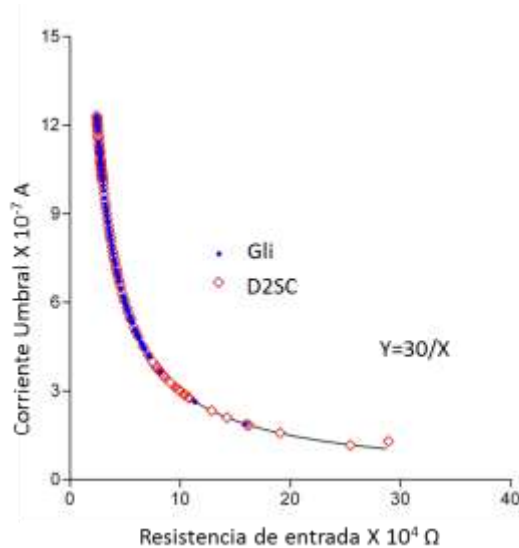


Figura 33. Comparación de la relación corriente umbral-resistencia de entrada de ratas con diabetes tipo 2 con glibenclamida y diabetes tipo 2 sin cáscara (90 días)

6.4.2 Cambios en la relación resistencia de entrada-corriente umbral en ratas diabéticas tipo 1 y 2 con y sin cáscara de manzana (150 mg/kg) durante 90 días

La Figura 34 muestra los efectos de la cáscara sobre los valores de resistencia de entrada-corrientes umbrales obtenidas en músculos papilares de ratas diabéticas y ratas diabéticas tratadas con cáscara. Resulta evidente observar la reducción de los efectos diabetógenos debido a la administración de la cáscara.

A los 90 días, como lo muestra la Figura 35, se aprecia que las ratas con diabetes tipo 2 tratadas con cáscara presentaron más datos con resistencias de entrada más altos hasta llegar a $33 \times 10^4 \Omega$, mientras que las ratas sin cáscara hasta $29 \times 10^4 \Omega$.

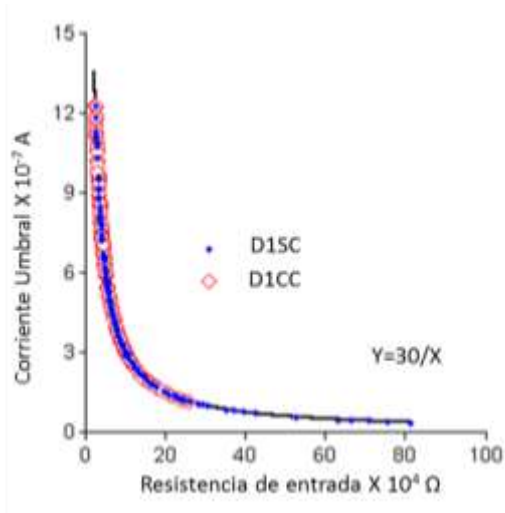


Figura 34. Cambios en las relaciones de resistencia de entrada-corriente umbral en ratas D1SC y D1CC durante 90 días. Símbolos llenos, D1SC; símbolos vacíos, D1CC

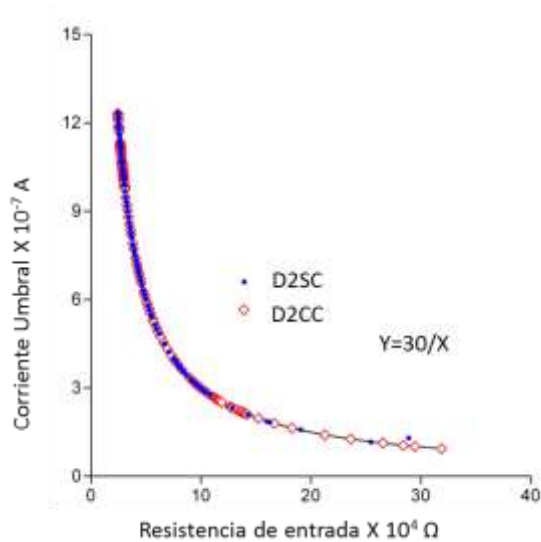


Figura 35. Comparación de la relación corriente umbral-resistencia de entrada de ratas con diabetes tipo 2 con glibenclamida, con y sin cáscara (90 días)

6.4.3 Relación resistencia de entrada vs corriente umbral en corazón de ratas sanas control y diabéticas

La Figura 36, nos muestra las relaciones entre músculos papilares de ratas sanas sin cáscara y con cáscara de manzana a una dosis de 150 mg/kg, durante un período de 90 días. Los valores para la resistencia de entrada encontrados en las ratas control van de 24 a 316.5 K Ω y sus correspondientes corrientes umbral van de 94 a 1232 nanoamperios. Se observan valores similares de resistencia de entrada y corrientes umbrales en ambos grupos.

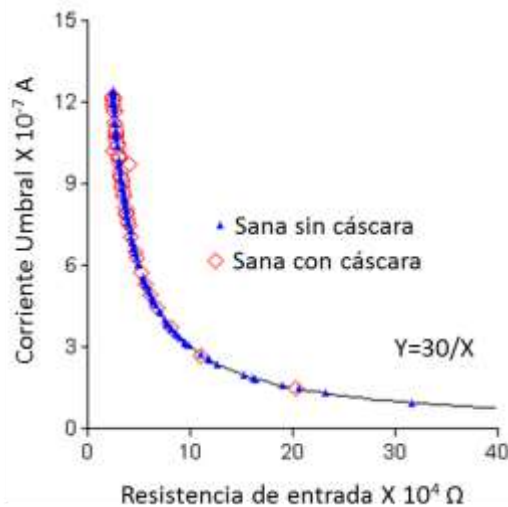


Figura 36. Relación resistencia de entrada-corriente umbral en ratas sanas sin y con cáscara (150 mg/kg)

Los valores de la resistencia de entrada fueron calculados usando la ecuación de la hipérbola equilátera $Y=K/X$; donde Y es la corriente umbral cuantificada experimentalmente y $K=30$ mV es el valor de la constante. Símbolos llenos, SSC; símbolos vacíos, SCC.

6.4.4 Propagación de respuestas prematuras y actividad re-entrante en ratas diabéticas

Las modificaciones en la resistencia de entrada y los umbrales intracelulares encontrados en los músculos papilares de ratas con diabetes, pueden hacer que la propagación de los PA se vuelva crítica y, en estas condiciones, pueda suscitarse

actividad bioeléctrica re-entrante que origine fibrilaciones ventriculares y muerte súbita.

La Figura 37, muestra la respuesta evocada por la aplicación de una extrasístole temprana en el músculo papilar de ratas diabéticas. El trazo superior corresponde a los PA registrados en la zona proximal al sitio de los electrodos de estimulación externa; el trazo inferior, a los PA registrados en un sitio distal a los electrodos de estimulación. La primera respuesta corresponde al último de una serie de ocho potenciales de acción evocados por estímulos básicos. La segunda respuesta corresponde a la actividad generada por un estímulo de prueba aplicado 40 milisegundos después del último estímulo básico. Se observa que al PA evocado por el pulso de prueba, le siguen dos potenciales de acción (asteriscos) que no fueron iniciados por estimulación, lo cual demuestra la hipersensibilidad del sincicio ventricular de las ratas diabéticas a generar actividad de potenciales de acción re-entrantes.

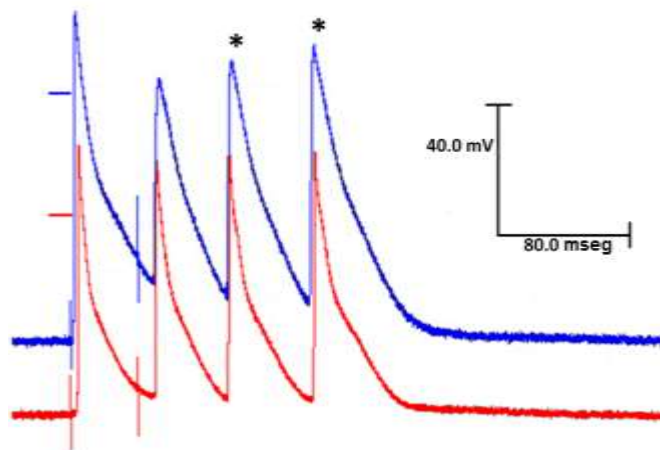


Figura 37. Actividad re-entrante iniciada por la aplicación de una extrasístole temprana

Los trazos mostrados corresponden a potenciales de acción registrados en músculos papilares de ratas diabéticas, en zona proximal (trazo superior) y zona distal (trazo inferior) al sitio de estimulación, a un ciclo básico de 500 milisegundos. Observe que posterior a la aplicación de la extrasístole, aparecen dos respuestas (asteriscos), no evocadas por estimulación las cuales corresponden al tipo de actividad re-entrante.

En la Figura 38, se muestra otro ejemplo de actividad re-entrante. El resultado proporciona evidencia adicional en favor de que, cuando se aplica un pulso de prueba temprano, la respuesta evocada va seguida de actividad re-entrante múltiple. En este caso, los tres últimos potenciales de acción re-entrantes se conducen en dirección retrógrada.

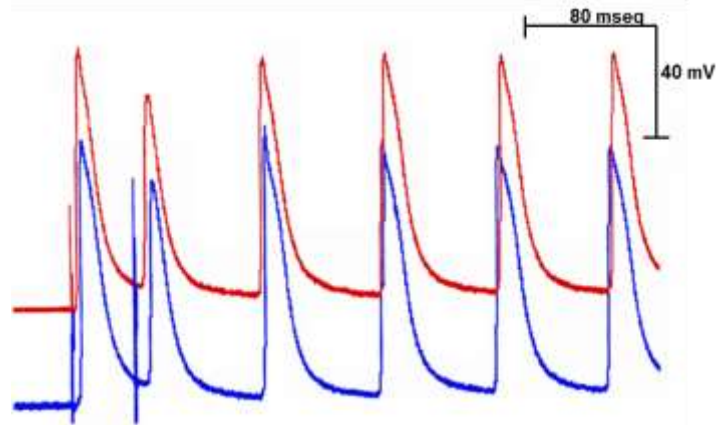


Figura 38. Cambio de dirección en la propagación del frente de onda

Observe que las tres primeras respuestas (básico, prueba y primera re-entrante) se propagan del sitio de estimulación hacia el resto de la preparación; en tanto que, las últimas tres respuestas re-entrantes siguientes se propagan en dirección opuesta.

7. DISCUSIÓN

7.1 Acciones de la cáscara de manzana sobre el perfil bioquímico

La investigación sobre los beneficios de los alimentos para la salud ha ido en aumento durante los últimos años. Estos estudios se han asociado a la ingesta de macro y micronutrientes para la prevención y/o tratamiento de una enfermedad, más allá de las funciones nutricionales básicas (Fulton *et al.*, 2014). Los resultados han tenido un impacto positivo para la industria de alimentos, especialmente en la industria de suplementos dietéticos, alimentos enriquecidos y funcionales, etc.

Existen hoy en día datos epidemiológicos, ensayos clínicos, *in vitro* e *in vivo*, que demuestran que los micronutrientes pueden ser útiles en el control de los trastornos metabólicos asociados con el envejecimiento como la obesidad y el cáncer. Entre los trastornos metabólicos, es evidente que la diabetes mellitus es una de las principales enfermedades que va en incremento año con año y su prevalencia es probable que aumente a 552 millones personas en 2030 a nivel mundial (Scully, 2012). La enfermedad cardiovascular es una de las principales complicaciones derivadas de la diabetes debido a que más del 50% de los pacientes sufren de eventos cardiovasculares (Laakso y Kuusisto, 2014; Cox *et al.*, 2014). Como resultado hay un creciente interés en la búsqueda alimentos como métodos profilácticos o preventivos para cardiopatías derivadas de la diabetes. En consecuencia, el presente estudio fue diseñado para evaluar los efectos positivos del consumo cáscara de manzana en dos modelos de ratas diabéticas, STZ y STZ-NA, así como también su efecto positivo en los problemas cardiovasculares secundarios.

El modelo de inducción de la diabetes con STZ es uno de los modelos animales más importantes a nivel mundial ya que simulan la diabetes mellitus humana. La acción diabetogénica potente de la STZ resulta al daño de las células β pancreáticas, que son la única fuente de insulina y por lo tanto este modelo se considera que comparte características de la D1. Una de las variaciones de este

modelo fue desarrollado por Masiello (Masiello *et al.*, 1998) basado en la administración de dos compuestos STZ y NA, éste último protege parcialmente las células β contra STZ, y por tanto se relaciona con los cambios observados en la D2.

Los resultados de este estudio estuvieron de acuerdo con la pérdida de peso, la hiperglucemia, hipoinsulinemia y niveles altos de hemoglobina glucosilada características para la D1, a 30 y 90 días de la inducción. Para el grupo D2, estos cambios se observaron sólo a los 90 días y están de acuerdo con estudios previos utilizando éste mismo modelo de inducción (Godwin y José, 2014). Sin embargo, es importante señalar que la mayoría de los estudios con el modelo STZ-NA se han llevado a cabo a 30 o 45 días post-inducción, y hay muy pocos informes de los efectos de este modelo en períodos de inducción más largos, este trabajo por lo tanto, contribuye a proporcionar más información a la caracterización completa de este modelo experimental de diabetes mellitus.

Los principales resultados de este estudio demostraron que el consumo diario de cáscara de manzana puede tener un efecto anti-hiperglucémico y capaz de mantener el peso corporal y los niveles de HbA_{1c} cerca de los niveles normales en los animales de experimentación, en el modelo D2. Este resultado, puede deberse a una posible interferencia en la absorción de la glucosa por el alto contenido de fibra en la cáscara de manzana, la cual fue demostrada por la presencia de azúcares y oligosacáridos complejos observados en el análisis proximal (Tabla 1) y con los resultados de RMN y MS (Figuras 11-14). Además, es conocido que la fibra dietética reduce la velocidad de la absorción de glucosa según estudios para la especie *Hanes Averrhoa* en los cuales se observó que la fibra adsorbe cantidades de glucosa a partir del almidón y retrasa la hidrólisis de la α -amilasa (Chau *et al.*, 2004). Con respecto a la mezcla compleja de hidratos de carbono que se encuentra en la piel de manzana, junto con la presencia de polifenoles y oligosacáridos éstos pueden dar lugar a la inhibición de diferentes hidrolasas que se encuentran en el tracto gastrointestinal, como ha sido documentados (Chau *et al.*, 2004). Adicionalmente, la existencia de

glicoflavonoides, sugeridos por las técnicas de RMN y MS, se puede inhibir la α -glucosidasa y la reducción de la absorción de monosacáridos en el intestino (Schmidt *et al.*, 2012). Asimismo, el medicamento acarbose el cual contiene tres unidades de monosacáridos y un aminoazúcar ya se utiliza con éxito en el tratamiento de la diabetes (Hoffmann y Spengler, 1997). Por lo anterior, la existencia de oligosacáridos complejos en el cultivar Red Delicious sugiere que su consumo puede ser útil en el tratamiento de la D2.

Por otro lado, el metabolismo lipídico alterado es un sello distintivo de la diabetes, esta se caracteriza por la disminución de HDL y LDL y aun aumento en TG y CT. Estos efectos combinados con la hiperglucemia resultan en una amenaza significativa de complicaciones cardiovasculares en pacientes diabéticos. En el modelo de diabetes D2CC, es decir los animales que consumieron cáscara de manzana, mostraron una mejoría modesta en el perfil de lípidos en suero, TG y HDL específicamente en al final del período de 90 días.

7.2 Actividad eléctrica del corazón con diabetes

7.2.1 Propiedades activas

Los pacientes con diabetes tipo 1 y 2 presentan el síndrome de QT largo, el cual está asociado al aumento de la duración de los potenciales de acción del músculo ventricular.

Los resultados obtenidos muestran claramente que la duración de los potenciales de acción aumenta en los músculos papilares del corazón de ratas diabéticas tipo 1. El retardo en la fase de repolarización cuantificado en los potenciales de acción en las ratas control y con diabetes es significativo y concuerda con las obtenidas por otros autores (Fein *et al.*, 1983; Magyar *et al.*, 1992; Jourdon y Feuvray, 1993; Shimoni *et al.*, 1994; Shimoni *et al.*, 1995). Adicionalmente, el alargamiento en la duración del potencial de acción fue más acentuado al 30% que al 90%. Son varias las corrientes iónicas que intervienen para la repolarización del potencial de acción en el miocardio ventricular de la rata.

La fase temprana de la repolarización ventricular se lleva a cabo por la activación de dos corrientes de potasio (I_{K^+}), la I_{to} y la I_K (Apkon y Nerbone, 1991), mientras que la fase tardía de la repolarización es debida a la activación de la corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+} , responsable del alargamiento final de la repolarización del potencial de acción (Mitchell *et al.*, 1984). Asimismo, el aumento observado en la fase temprana de la repolarización de los potenciales de acción en las ratas diabéticas, es debido a la disminución de las corrientes de potasio (Magyar *et al.*, 1992; Shimoni *et al.*, 1994; Shimoni *et al.*, 1995); en tanto que, el retardo en la fase final de la repolarización se atribuye a un aumento de la corriente del intercambiador Na^+/Ca^{2+} originando una sobrecarga de Ca^{2+} en los miocitos ventriculares (Lopez *et al.*, 1988; Nobe *et al.*, 1990; Lagadic-Gossman *et al.*, 1996).

El modelo de diabetes tipo 2 en nuestro trabajo presentó un acortamiento de la duración del PA a los 30 días, mientras que a los 90 días incrementó significativamente la duración del PA con respecto al control. Estos resultados coinciden con lo reportado por un modelo de diabetes tipo 2 inducido por una dieta alta en fructosa ofrecida por 4 a 10 semanas (Shimoni *et al.*, 1998) y el modelo de diabetes tipo 2 espontánea de ratones (*db/db*) a las 12 semanas de edad (Shimoni *et al.*, 2001; Shimoni *et al.*, 2003, Shimoni *et al.*, 2004), respectivamente. La diferencia estriba en el progreso de la primera etapa de la diabetes tipo 2 existe un aumento de la insulina capaz de incrementar la corriente de potasio (específicamente la I_{Kss}) disminuyendo la duración de los PA (Shimoni *et al.*, 1998). No obstante, conforme progresa la D2 existe una atenuación de las corrientes de potasio provocando el incremento de la duración del PA comparable a la observada en la D1 a pesar de mostrar niveles de insulina mayores a los encontrados en las ratas con D1 (Shimoni *et al.*, 2001; Shimoni *et al.*, 2003, Shimoni *et al.*, 2004), como se mostró nuestro estudio. Estos resultados confirman que a pesar que la insulina puede modular la repolarización del miocardio a través de las corrientes de potasio (Shimoni *et al.*, 1998), existen otros mecanismos que modulan de estas corrientes como la angiotensina II (Ang II), la proteína-cinasa C (PKC) o el estado redox que son alterados en la diabetes (Shimoni *et al.*, 2003; Shimoni *et al.*, 2005; Shimoni *et al.*, 2008; Rozanski y Xu, 2002; Liang *et al.*, 2008).

7.2.2 Organización del sincium ventricular (propiedades pasivas)

El conocimiento de la organización estructural del sincicio ventricular se hace posible a través del estudio de sus propiedades funcionales pasivas y activas. Lo anterior implica determinar primero las características de la generación y propagación de sus PA. Con ello se favorece la comprensión de su comportamiento como sincicio funcional; y la importancia que representa la geometría estructural de la organización del sincicio ventricular cardiaco. Este estudio se llevó a cabo en músculos papilares aislados del ventrículo izquierdo del corazón de ratas. En consecuencia, antes de considerar la discusión e interpretación de los resultados obtenidos en los experimentos en donde analizamos la organización del sincicio funcional ventricular, debemos de considerar las siguientes acepciones:

Méndez y Hernández 2001 establecieron un método experimental que permitió explorar al sincicio ventricular del corazón de mamífero, desde punto de un punto de vista electrofisiológico. Los resultados obtenidos por estos autores pusieron de manifiesto las siguientes características del sincicio funcional ventricular:

- 1.- La resistencia de entrada y corriente umbral se relacionan de forma inversa.
- 2.- La organización funcional del sincicio de los tejidos ventriculares en el músculo papilar del ventrículo izquierdo del corazón de la rata, es irregular en términos de los valores de la resistencia de entrada y de la corriente umbral para iniciar un potencial de acción, no obstante que mantienen el mismo valor de la constante, $K=30$ mV.
- 3.- La excitabilidad celular en términos de corriente umbral, es diferente en cada uno de los sitios explorados de la preparación del músculo papilar.

Considerando estos hallazgos concluyeron que la masa ventricular constituye un sincicio ventricular heterogéneo bajo condiciones fisiológicas, y que tal heterogeneidad del sincicio se debe a que la distribución espacial de los *nexus* no

es uniforme en los diferentes sitios del corazón. Esta aseveración no implica alteraciones del funcionamiento del sincicio ventricular en condiciones fisiológicas durante la propagación del latido cardiaco. No obstante, en condiciones patológicas (diabetes tipo 1) la heterogeneidad del sincicio podría acentuarse (Figura 30) y presentarse las condiciones para el desarrollo de arritmias letales. La mayor heterogeneidad encontrada en el corazón de las ratas diabéticas tipo 1 incluye zonas de tejido en el músculo papilar con valores de resistencia de entrada más altos y menores umbrales intracelulares. Esto último implica, la existencia en el músculo papilar, de zonas de tejido con menor densidad de *nexus*. Este fenómeno observado con altos valores de resistencia de entrada y bajos valores de corriente umbral está firmemente respaldado por los estudios que reportan que en la diabetes tipo 1 disminuye la expresión de conexina 43; además, de la redistribución de sus *nexus* (Okruhlicova *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2006).

Las modificaciones acentuadas de los valores de resistencia de entrada y umbrales intracelulares encontrados en los músculos papilares de ratas diabéticas, vuelven crítica la propagación de los potenciales de acción. En estas condiciones, un frente de onda proveniente de zona de resistencia baja (alto umbral) hacia otra de resistencia alta (bajo umbral) se propaga fácilmente. Sin embargo, el caso contrario de una zona de alta resistencia (bajo umbral) en contacto con otra de baja resistencia (alto umbral), encontrará mayor dificultad de propagación, ya que la corriente despolarizante proporcionada por el frente de onda, es insuficiente para alcanzar el umbral. Por consiguiente, se lleva a cabo el bloqueo de propagación en el sitio de baja resistencia, y se facilita la actividad re-entrante (Sayniuk y Mendez, 1971). Las Figuras 34 y 35 muestran claramente que esto es lo que ocurre.

A partir de los resultados obtenidos en los músculos papilares de ratas diabéticas, se desprende que, los fenómenos exhibidos en la propagación de respuestas prematuras son el resultado de propagación discontinua. En estas condiciones, se añaden dos factores que pueden causar bloqueo de conducción en el sincicio ventricular: 1) La pequeña eficacia de los potenciales de acción prematuros, como estímulo fisiológico y 2) La irregularidad en la resistencia de

entrada y los umbrales intracelulares para iniciar potenciales de acción propagados (excitabilidad celular). Es bien sabido, que la propagación del PA en zonas de tejido cuya excitabilidad se encuentra disminuida (resistencia de entrada baja), se realiza mediante potenciales electrotónicos (Mendez y Moe, 1966) y que la magnitud y desarrollo temporal de tales potenciales, depende de la geometría de organización del sincicio.

El estudio actual presenta dos hallazgos importantes: 1) Modificaciones concomitantes en la resistencia de entrada–umbrales intracelulares en el corazón de ratas diabéticas y, 2) Las alteraciones en la propagación de respuestas prematuras. Estos fenómenos, nos permiten proporcionar una explicación adecuada al fenómeno arritmogénico mostrado por el corazón en situaciones patológicas como la diabetes; y crea una comprensión parcial respecto a la alta vulnerabilidad del corazón a presentar fibrilación ventricular y muerte súbita.

7.3 Acciones de la cáscara de manzana

La cáscara de manzana a una dosis de 150mg/kg disminuyó significativamente el aumento de la duración del potencial de acción que se presenta en la diabetes en ambos tipos (1 y 2) (Figuras 29-31), y consecuentemente el periodo refractario disminuyó. Resultados similares a los nuestros han sido obtenidos por otros autores (Sunagawa *et al.*, 2014), en donde muestran que su extracto de polifenoles de la manzana disminuye la duración de los potenciales de acción, en los miocitos ventriculares del corazón del ratón con cardiopatía dilatada. Tal disminución en la DPA, es el resultado del aumento que origina el extracto de polifenoles sobre la corriente de K^+ (I_{K1}). Los resultados obtenidos en los músculos papilares de ratas diabéticas con tratamiento pueden ser explicados si asumimos que, la cáscara de manzana tiene el o los mismos tipos de polifenoles y a similares concentraciones a los reportados por Sunagawa *et al.* (2014) en sus extractos de manzana. En consecuencia, podrían causar un aumento en la corriente de K^+ transitoria saliente (I_{Kto}), que es la más afectada en los miocitos ventriculares del corazón de ratas diabéticas (Shimoni *et al.*, 1994; Shimoni *et al.*, 1995). Desde luego es necesario medir esta corriente, en los

miocitos ventriculares de las ratas diabéticas, para poder proporcionar una afirmación sólida.

A su vez, la cáscara atenúa el aumento de la resistencia de entrada y la disminución de la corriente umbral en la diabetes tipo 1 donde se ve fuertemente afectada por la diabetes (Figura 35). El aumento en la heterogeneidad del sincicio ventricular en las ratas diabéticas tipo 1, ocurre por una disminución en la expresión de la conexina 43 y por ende ocurre redistribución espacial de los *nexus* (Lin *et al.*, 2006; Okruhlicova *et al.*, 2002). Sunagawa *et al.* (2014) presentan evidencias respecto de algunos polifenoles presentes en un extracto de manzana que causan aumento en la expresión de conexina 43, la cual aumenta la densidad e interconexión de *nexus* en los miocitos cardiacos. Es probable que esa misma acción de los polifenoles contenidos en el extracto de manzana sea semejante a la acción de los polifenoles en el liofilizado de la cáscara de manzana en nuestras ratas con diabetes tipo 1 y en consecuencia, el aumento de la expresión de la conexina 43 disminuya la vulnerabilidad del corazón a las arritmias.

En cuanto la diabetes tipo 2, no se observó este efecto puesto que para este tipo de diabetes no hubo cambios significativos en el aumento de la resistencia de entrada (Figura 35). Cabe mencionar que los estudio de la expresión de conexina 43 y su redistribución espacial únicamente se han realizado en diabetes tipo 1.

Por último a las ratas sanas que recibieron la misma dosis de cáscara se puede observar que se mantuvo la heterogeneidad del sincicio ventricular, observado en los músculos papilares de ratas sanas (Figura 36).

8. Conclusiones

- La cáscara de manzana Red Delicious está compuesta principalmente de agua (81%), carbohidratos (15%), fibra cruda (1.6%), polifenoles (1100 μ GAE/100g) y glucósidos.
- En los perfiles bioquímicos la cáscara de manzana mantiene los niveles de glucosa y HbA_{1c} similares al control a los 90 días de tratamiento para el modelo de diabetes tipo 2, demostrando un beneficio de su consumo para estas condiciones.
- La cáscara de manzana tiene los siguientes efectos en los músculos papilares aislados del corazón de ratas diabéticas:
 - Disminuye significativamente el aumento de la duración del potencial de acción
 - Disminuye el periodo refractario absoluto.
- Por lo anterior, el consumo de cáscara de manzana tiene un efecto protector que puede disminuir la probabilidad de arritmias cardíacas.

9. Bibliografía

- ADA. American Diabetes Association. Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. *Diabetes Care* 37(S1) (2014) 81-90, 2014
- Al-Dallen SM, Chavez Rodriguez T, Martinez Sanchez, Ferreira Bega E, Leon Fernandez OS. El equilibrio redox en la diabetes y sus complicaciones. *Acta Farm Bonaerense* 23 (2) (2004) 231-242.
- AOAC. Association Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 16. ed., Washington: AOAC, 1995. 1018 p.
- Apkon M, Nerbonne JM. Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes. *Journal of General Physiology*. 97 (1991): 973–1011.
- Aprikian O, Busserolles J, Manach C, Mazur A, Morand C, Davicco MJ, Besson C, Rayssiguier Y, Rémésy C, Demigné C. Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J Nutr* 132 (2002) 1969-1976.
- Aprikian O, Duclos V, Guyot S, Besson C, Manach C, Bernalier A, Morand C, Rémésy C, Demigné C. Apple Pectin and Polyphenol-Rich Apple Concentrate Are More Effective Together Than Separately On Cecal Fermentations and Plasma Lipids in Rats. *J Nutr*. 133 (2003) 1860-1865.
- Aprikian O, Levrat-Verny MA, Besson C, Busserolles J, Rémésy C, Christian, Demigné C. Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol-fed rats. *Food Chem*. 75 (4) (2001) 445-452.
- Barr L, Dewey MM y Berger W. Propagation of action potentials and the structure of the nexus in cardiac muscle. *J Gen Physiol*. 48 (1965) 797-823.
- Bi X, Zhang J, Chen C, Zhang D, Li P, Ma F. Anthocyanin contributes more to hydrogen peroxide scavenging than other phenolics in apple peel. *Food Chemistry* 152 (2014): 205–209.

- Bladé C, Arola L, Salvadó MJ. Hypolipidemic effects of procyanidins and their underlying biochemical and molecular mechanisms. *Mol Nutr Food Res*. 54 (1) 2010 37-59.
- Boyer J, Liu RH. Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr J*. 12 (2004) 3-5.
- Budak NH, Kumbul Doguc D, Savas CM, Seydim AC, Kok Tas T, Ciris MI, Guzel-Seydim ZB. Effects of apple cider vinegars produced with different techniques on blood lipids in high-cholesterol-fed rats. *J Agric Food Chem*. 59 (12) (2011) 6638-6644.
- Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med*. 41 (6) (2006); 851-61.
- Chau CF, Chen CH, Lin CY. (2004) Insoluble fiber-rich fractions derived from *Averrhoa carambola*: hypoglycemic effects determined by in vitro methods. *LWT-Food Sci Technol*, 37, 331–5.
- Cheyrier V. Polyphenols in foods are more complex than often thought. *Am J Clin Nutr*. 2005 81(1 Suppl) (2005) 223-229.
- Cox AJ, Azeem A, Yeboah J, et al. (2014). Heart Rate–Corrected QT Interval Is an Independent Predictor of All-Cause and Cardiovascular Mortality in Individuals with Type 2 Diabetes: The Diabetes Heart Study. *Diabetes Care*, 37, 1454-61.
- Delmar M, Coombs W, Taffer SM. Estructura Molecular Regulación y Función de las uniones comunicantes. Bases electrofisiológicas de las arritmias cardiacas. CENEDIC Universidad de Colima, México (2007) 21-39.
- Dewey MM, Barr L. A study of structure and distribution of the nexus. *J of Cell Biol*. 23 (1964): 553-585.
- Esposito K, Giugliano D. Mediterranean diet and type 2 diabetes. *Diabetes Metab Res Rev*. 1, (2014) 34-40.

- Fein FS, Aronson RS, Nordin C, Miller-Green B, Sonnenblick EH. Altered myocardial response to ouabain in diabetic rats: Mechanics and electrophysiology. *J Mol Cell Cardiol*, 1983, 15: 769–784.
- Filomeni G, Rotilio G, Ciriolo MR. Cell signalling and the glutathione redox system. *Biochemical Pharmacology* 64 (2002) 1057-1064.
- Fraga CG, Galleano M, Verstraeten SV, Oteiza PI. Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Mol Aspects Med.* 6 (2010) 435-445.
- Francini A, Sebastiani L. Phenolic Compounds in Apple (*Malus x domestica* Borkh.): Compounds Characterization and Stability during Postharvest and after Processing, *Antioxidants*, 2, (3) (2013): 181-193.
- Fulton SL, McKinley MC, Young IS, et al. (2014). The effect of increasing fruit and vegetable consumption on overall diet: a systematic review and meta-analysis. *Crit Revi Food Sci*, Accepted Manuscript.
- Godwin SE, Jose MA. (2014). Effect of Asparagus Racemosus against streptozotocin-nicotinamide induced type-2 diabetes mellitus with special reference to diabetic nephropathy in rats. *Int J Pharm Chem Sci*, 3, 367-75.
- Gollewsky E. Die entwicklung des skelet-und herzmuskelgewebes der Säugethiere. *Arch Mikrosk Anat.* 60 (1902) 111-156.
- Halliwell B. The wanderings of a free radical. *Free Radical Biology & Medicine* 46 (2009) 531-542.
- Heidenhain M. Ueber die structur des menschlichen herzmuskels. *Anat Anz.* 20 (1901) 33-41.
- Henriquez C, Speisky H, Chiffelle I, Valenzuela T, Araya M, Simpson R, Almonacid S. Development of an ingredient containing apple peel, as a source of polyphenols and dietary fiber. *J Food Sci.* 75 (6) (2010) 172-178.

- Hoffmann J, Spengler M. (1997). Efficacy of 24-week monotherapy with acarbose, metformin, or placebo in dietary-treated NIDDM patients. *Am J Med*, 103, 483-90.
- Howarth FC, Chandler NJ, Kharche S, Tellez JO, Greener ID, Yamanushi TT, Billeter R, Boyett MR, Zhang H, Dobrzynski H Effects of streptozotocin-induced diabetes on connexin43 mRNA and protein expression in ventricular muscle. *Mol Cell Biochem*. 319(1-2) (2008) 105-114.
- Jeong E, Liu M, Sturdy M, Gao G, Varghese ST, Sovari AA, Dudley SC Jr.. Metabolic stress, reactive oxygen species, and arrhythmia. *J Mol Cell Cardiol*. 52 (2) (2012) 454-463.
- Jourdon P, Feuvrai D. Calcium and Potassium Currents in Ventricular Myocytes Isolated from Diabetic Rats. *J Physiol*. 470 (1993) 411-429.
- Kaneto H, Katakami N, Matsuhisa M, Matsuoka TA. Role of reactive oxygen species in the progression of type 2 diabetes and atherosclerosis. *Mediators Inflamm* (2010) 1-11.
- Katz AM. *Physiology of the Heart*. Lippincott Williams & Wolter Kluwer, Philadelphia USA, 5 Edition (2011).
- Kléber G, Rudy Y. Basic Mechanisms of cardiac impulse propagation and associated arrhythmias. *Physiol Rev*. 84 (2004) 431-488.
- Knekt P, Kumpulainen J, Järvinen R, Rissanen H, Heliövaara M, Reunanen A, Hakulinen T, Aromaa A. Flavonoid intake and risk of chronic diseases. *Am J Clin Nutr*. 76(3) (2002) 560-568.
- Kobori M, Masumoto S, Akimoto Y, Oike H. Chronic dietary intake of quercetin alleviates hepatic fat accumulation associated with consumption of a Western-style diet in C57/BL6J mice. *Mol Nut Food Res*. 55 (2011) 530-540.

- Koloverou E, Panagiotakos DB, Pitsavos C, Chrysohoou C, Georgousopoulou EN, Grekas A, Christou A, Chatzigeorgiou M, Skoumas I, Tousoulis D, Stefanadis C; ATTICA Study Group. Adherence to Mediterranean diet and 10-year incidence (2002–2012) of diabetes: correlations with inflammatory and oxidative stress biomarkers in the ATTICA cohort study *Diabetes Metab Res Rev* 32 (2016), 73–81.
- Konopacka D, Jesionkowska K, Kruczyńska D, Stehr R, Schoorl F, Buehler A, Egger S, Codarin S, Hilaire C, Höller I, Guerra W, Liverani A, Donati F, Sansavini S, Martinelli A, Petiot C, Carbó J, Echeverria G, Iglesias I, Bonany J. Apple and peach consumption habits across European countries. *Appetite*. 55(3) (2010) 478-483.
- Kunradi Vieira FG, da Silva Campelo Borges GS, Copetti C, Valdemiro Gonzaga L, da Costa Nunes E, Fett R. Activity and contents of polyphenolic antioxidants in the whole fruit, flesh and peel of three Apple cultivars. *Archivs Latinoamericanos de Nutricion*, 59 (1), (2009) 101-106.
- Laakso M, Kuusisto J. (2014). Insulin resistance and hyperglycaemia in cardiovascular disease development. *Nat Rev Endocrinol*, 10, 293-302.
- Lagadic-Gossman D, Buckler KJ, Le Prigent K, Feuvray D. Altered Ca²⁺ - handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats. *Am J Physiol* 270 (1996): H1529-H1537.
- Lam CK, Zhang Z, Yu H, Tsang SY, Huang Y, Chen ZY. Apple polyphenols inhibit plasma CETP activity and reduce the ratio of non-HDL to HDL cholesterol. *Mol Nutr Food Res*. 52 (2008) 950-958.
- Łata B, Trampczyńska A, Paczesna J. Cultivar variation in Apple peel and whole fruit phenolic composition. *Scientia Horticulturae* 121 (2009) 176-181.
- Łata B. Relationship between Apple Peel and the whole fruit antioxidant content: Year and cultivar variation. *J Agric Food Chem*. 55 (2007) 663-671.

- Lavelli V, Corti S. Phloridzin and other phytochemicals in apple pomace: Stability evaluation upon dehydration and storage of dried product. *Food Chemistry*. 129 (2011) 1578-1583.
- Leontowicz, H.; Gorinstein, S.; Lojek, A.; Leontowicz, M.; Ciz, M.; Soliva-Fortuny, R.; Park, Y. S.; Jung, S. T.; Trakhtenberg, S.; Martin-Belloso, O. Comparative content of some bioactive compounds in apples, peaches and pears and their influence on lipids and antioxidant capacity in rats. *J. Nutr. Biochem.* 13 (2002) 603-607.
- Li X, Li S, Xu Z, Lou MF, Anding P, Liu D, Roy SK, Rozanski GJ. Redox control of K⁺ channel remodeling in rat ventricle. *J Mol Cell Cardiol.* 40(3) (2006) 339-349.
- Li X, Xu Z, Li S, Rozanski GJ. Redox regulation of Ito remodeling in diabetic rat heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288(3) (2005) 1417-1424.
- Liang H, Li X, Li S, Zheng M-Q, Rozanski GJ. Oxidoreductase regulation of K_v currents in rat ventricle. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 44 (2008) 1062-1071.
- Lin H, Ogawa K, Imanaga I, Tribulova N. Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart. *Molecular and Cellular Biochemistry.* 290 (1-2) (2006): 69–78.
- Liu Y, Gutterman DD. Oxidative stress and potassium channel function. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology.* 29 (2002) 305-311.
- Liu, M. Cardiac sodium channel mutations: why so many phenotypes? *Nat. Rev. Cardiol.* 11 (2014), 607-6015.
- Lopez JR, Banyasz T, Kovacs T, Sreter FA, Szücs G. Defective myoplasmatic Ca²⁺ homeostasis in ventricular muscle in diabetic cardiomyopathic rats (abstract). *Biophys J.* 53 (1988) 161a.
- Lv.Y. Triterpenes and Phenolic Compounds in Apple Fruit (*Malus domestica* Borkh). Variation due to Cultivar, Sun Exposure, Rootstock, Harvest Maturity,

- Bruising, Fungi Inoculation, Ozone Treatment and Storage Conditions. 2016. Doctoral Thesis.
- Magyar J, Rusznak Z, Szentesi P, Szücs G, Kovacs L. Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes. *J Mol Cell Cardiol.* 24 (1992): 841–853.
- Masiello P, Broca C, Gross R, et al. (1998). Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide. *Diabetes*, 47, 224–9.
- Méndez C, Hernández V. Inverse relation between input resistance and threshold current in canine cardiac syncytium. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 12 (3) (2001): 337-342.
- Mendez C, Moe GK. Some characteristics of transmembrane potentials of AV nodal cells during propagation of premature beats. *Circulation Research.* 19 (1966): 993-1008.
- Mitchell MR, Powell T, Terrar DA, Twist VW. The effects of ryanodin, EGTA and low-sodium on action potentials in rat and guinea-pig ventricular myocytes:evidence for two inward currents during the plateau. *Br J Pharmacol.* 81 (1984) 543–550.
- Nagasako-Akazo Y, Kanda T, Ohtake Y, Shimasaki H, Kobayashi T. Apple polyphenols influence cholesterol metabolism in healthy subjects with relatively high body mass index. *J Ole Sci.* 56 (8) (2007) 417-428.
- Nakazato K, Song H, Waga T. Effects of dietary apple polyphenols on adiposetissues weights in Wistar rats. *J Agric Food Chem.* 56 (2008) 830-836.
- Nobe S, Aomine M, Arita M, Ito S, Takaki R. Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca²⁺ channel. *Cardiovasc.* 24 (1990): 381–389.

NORMA Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Okruhlicova L, Tribulova N, Misějkova M, Kučka M, Stetka R, Slezak J, Manoach M. Gap junction remodeling is involved in the susceptibility of diabetic rats to hypokalemia-induced ventricular fibrillation. *Acta Histochemica*. 104 (4) (2002): 387–391.

Oré R, Castillo O, Sandoval M, Valdivieso R, Oriondo R, Woolcott O, Durand J, Tello L. Respuesta del sistema antioxidante en varones sanos, frente a hiperglucemia aguda inducida. *Anales de la Facultad de Medicina*. 70 (3) (2009) 186-192.

Osada K, Suzuki T, Kawakami Y, Senda M, Kasai A, Sami M, Ohta Y, Kanda T, Ikeda Mitsuo. Dose-dependent hypocholesterolemic actions of dietary Apple polyphenol in rata fed cholesterol. *Lipids*. 41 (2006) 133-139.

Pandit SV, Giles WR, Demir SS. A mathematical model of the electrophysiological alterations in rat ventricular myocytes in type-I diabetes. *Biophys J*. 84(2 Pt 1) (2003) 832-841.

Pappano AJ, Wier, WG. Excitation: The Cardiac Action Potential. *Cardiovascular Physiology*. Elsevier Mosby, United States of America, 10 Edition (2013) 11-30.

Pari L, Suma S. Antihyperglycemic and antilipideperoxidative effects of flavanoid naringin in streptozotocin-nicotinamide induce diabetic rats. *Int J Biol Med Res*. 1 (4) (2010) 206-210.

Peri L, Pietraforte D, Scorza G, Napolitano A, Fogliano V, Minetti M. *Free Radical Biology & Medicine* 39 (2005) 668-681.

Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J Dent*. 37 (2009) 413-423.

Rahnema P, Shimoni Y, Nygen A. Reduced conduction reserve in the diabetic rat heart: role of iPLA2 activation in the response to ischemia. *Am J Physiol*

- Heart Circ Physiol. 300 (2011) 326–334.
- Raimondi L, De Paoli P, Mannucci E, Lonardo G, Sartiani L, Banchelli G, Pirisino R, Mugelli A, Cerbai E. Restoration of cardiomyocyte functional properties by angiotensin II receptor blockade in diabetic rats. *Diabetes*.53 (7) (2004) 1927-1933.
- Rosado-Perez J. Mendoza-Núñez VM. Mini-revisión: Inflamación crónica y estrés oxidativo en la diabetes mellitus. *Bioquímica*. 32 (2) (2007) 58-69.
- Rozanski GJ, Xu Z. A metabolic mechanism for cardiac K⁺ channel remodelling. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 29 (1-2) (2002) 132-137.
- Rudy Y, Siva JR. Computation biology in the study of cardiac ion channels and cell electrophysiology. *Quarterly Reviews of Biophysics* 39 1 (2006) 57-116.
- Rupasinghe HPV, Wang L, Huber GM, Pitts NL. Effect of baking on dietary fibre and phenolics of muffins incorporated with apple skin powder. 107 (2008) 1217-1224.
- Salgado JM, Curte F, Mansi DN. Effect of gala Apple (*Malus domestica* Borkh) on lipidemia of hyperlipidemic rats. *Ciêc Tecnol Aliment*. 28 (2) (2008) 477-484.
- Sanchez D, Muguera B, Molulay L, Hernandez R, Miguel M, Aleixandre A. Highly methoxylated pectin improves insulin resistance and other cardiometabolic risk factors in Zucker Fatty Rats. *J Agric Food Chem*. 56 (2008) 3574-3581.
- Sayniuk BI, Mendez C. A Mechanism for reentry in canine ventricular tissue. *Cir Res*. 28 (1971) 3-15.
- Scalbert A, Johnson IT, Saltmarsh M. Polyphenols: antioxidants and beyond. *Am J Clin Nutr*. 81 (S) (2005) 215-217.
- Schmidt JS, Lauridsen MB, Dragsted LO, et al. (2012). Development of a bioassay-coupled HPLC-SPE-ttNMR platform for identification of α -glucosidase inhibitors in apple peel (*Malus domestica* Borkh.). *Food Chem*, 135, 1692–9.

- Scholz EP, Zitron E, Katus HA, Karle CA. Cardiovascular ion channels as a molecular target of flavonoids. *Cardiovascular Therapeutics*. 28 (2010) 46-52.
- Scully S. (2012) Diabetes in numbers. *Nature*, 485, S2-S3.
- Seipel M, Pirovani ME, Guemes DR, Gariglio NF, Piagentini AM. Características Fisicoquímicas de los frutos de tres variedades de manzanas cultivadas en la región centro-este de la provincia de Santa Fe. *Ciencias Agrarias* 8 (1) (2009) 27-36.
- Shimoni Y, Chen T, Emmett T, Kargacin G. Aldosterone and the autocrine modulation of potassium currents and oxidative stress in the diabetic rat heart. *Births Journal of Pharmacology* 154 (2008) 675-687.
- Shimoni Y, Chuang M, Abel ED, Severson DL. Gender-dependent attenuation of cardiac potassium currents in type 2 diabetic db/db mice. *J Physiol*. 555 (2) (2004):345-354.
- Shimoni Y, Chuang M, Abel ED, Severson. Gender-dependent attenuation of cardiac potassium currents in type 2 diabetic db/db mice. *J Physiol* 555 (2) (2003) 345-354.
- Shimoni Y, Ewart HS, Severson D. Type I and II models of diabetes produce different modifications of K⁺ currents in rat heart: role of insulin. *J Physiol* 507 2 (1998) 485-496.
- Shimoni Y, Firek L, Severson D, Giles W. Short-term diabetes alters K⁺ currents in rat ventricular myocytes. *Cir Res*. 74 (1994) 620-628.
- Shimoni Y, Hunt D, Chen K, Emmett T, Kargacin G. Differential Autocrine modulation of atrial and ventricular potassium currents and of oxidative stress in diabetic rats. *Am J Physiol Heart Cir Physiol*. 290 (2005) 1879-1888.

- Shimoni Y, Hunt D, Chuang M, Chen KY, Kargacin G, Severson DL. Modulation of potassium currents by angiotensin and oxidative stress in cardiac cells from the diabetic rat. *J Physiol.* 567(15) (2005) 177-190.
- Shimoni Y, Liu XF. Sex differences in the modulation of K⁺ currents in diabetic rat cardiac myocytes. *J Physiol.* 550.2 (2003) 401-412.
- Shimoni Y, Rattner JB. Type 1 diabetes leads to cytoskeleton changes that are reflected in insulin action on rat cardiac K⁺ currents. *Am J Physiol.* 281 (2001) 575-585.
- Shimoni Y, Severson D, Giles W. Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle. *J Physiol.* 488 (3) (1995): 673-688.
- Shimoni Y. Inhibition of the formation or action of angiotensin II reverses attenuated K⁺ currents in type 1 and type 2 diabetes. *J Physiol.* 537(15) (2001) 83-92.
- Shishehbor F, Mansoori A, Sarkaki AR, Jalali MT, Latifi SM. Apple cider vinegar attenuates lipid profile in normal and diabetic rats. *Journal of Biological Sciences.* 11 (23) (2008) 2634-2638.
- Singleton VL, Rossi JA. Colorimetry of Total Phenolics with Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Reagents. *Am. J. Enol. Vitic.*, 1965, 16 (3): 144-158.
- Sjostran FS, Anderson CE. Electron microscopy of the intercalated disc of cardiac muscle tissue. *Experientia.* 10 (1954) 369-370.
- Sjostrand FS, Anderson CE, Dewey MM. Ultrastructure of the intercalated disc of frog, mouse and guinea-pig cardiac muscle. *J Ultrastructure.* 34 (1958): 409-425.
- Sunagawa T, Shimizu T, Matsumoto A, Tagashira M, Kanda T, Shirasawa T, Nakaya H. Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase-deficient mice: prevention by a dietary antioxidant polyphenol. *Bio Med Research International.* (2014) 1-12.

- Thomas T, A.F.H. Pfeiffer Diabetes/metabolism research and reviews review article. *Diabetes Metab Res Rev* 28 (2012) 25–49.
- Tsao R, Yang R, Young JC, Zhu H. Polyphenolic Profiles in Eight Apple Cultivars Using High-Performance Liquid Chromatography (HPLC). *J. Agric. Food Chem.* 51 (2003): 6347–6353.
- Tsao R, Yang R, Xie S, Sockovie E, Khanizadeh S. Which Polyphenolic Compounds Contribute to the Total Antioxidant Activities of Apple?. *J. Agric. Food Chem.* 53 (2005): 4989–4995.
- Valavanidis A, Vlachogianni T, Psomas A, Zovoili A, Siatis V. Polyphenolic profile and antioxidant activity of five Apple cultivars grown under organic and conventional agricultural practices. *International Journal of Food Science and Tecnology.* 44 (2009) 1167-1175.
- Vassort G, Turan B. Protective role of antioxidants in diabetes-induce cardiac dysfunction. *Cardiovasc Toxicol* 10 (2) (2010) 73-86.
- Waczykpuková I, Cagalinec M, Ulicna O, Slezák P, Ziegelfhoffer A. Biophysical Investigation on Left Ventricular Myocytes in Rats with Experimentally Induce Diabetes. *Physiol. Fes* 59 (suppl 1) (2010) 9-17.
- Wang S, Melnyk JP, Tsao R, Marcone MF. How natural dietary antioxidants in fruits, vegetables and legumes promote vascular health. *Food Research International* (2010).
- Watanabe K, Thandavarayan RA, Harima M, Sari FR, Gurusamy N, Veeraveedu PT, Mito S, Arozal W, Sukumaran V, Laksmanan AP, Soetikno V, Kodama M, Aizawa Y. Role of differential signaling pathways and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy. *Curr Cardiol Rev.* 4 (2010): 280-290.
- Weidmann S. The diffusion of radiopotassium across intercalated disk of mammalian cardiac muscle. *J Physiol.* 187 (1966) 323-342.

- Weidmann S. The electrical constants of Purkinje fibers. *J Physiol.* 118 (1952) 384-360.
- Wolfe KL, Liu RH. Apple peels as a value-added food ingredient. *J Agric Food Chem.* 51(6) (2003) 1676-1683.
- Wright JA, Richards T, Becker DL. Connexins and diabetes. *Cardio Res Pract* (2012) 1-8.
- Xu Z, Patel KP, Lou MF, Rozanski GJ. Up-regulation of K(+) channels in diabetic rat ventricular myocytes by insulin and glutathione. *Cardiovasc Res.* 53(1) (2002) 80-88.
- Young ME, McNulty P, Taegtmeyer H. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part II: Potential Mechanisms. 105 (2002) 1861-1870.
- Zhang Y, Tocchetti CG, Krieg T, Moens AL. Oxidative and nitrosative stress in the maintenance of myocardial function. *Free Rad Biomed.* 53 (2012): 1531-1540.
- Zitron E, Scolz E, Owen RW, Lück S, Kiesecker C, Thomas D, Katthöfer S, Niroomand F, Kiehn J, Kreye VAW, Katus HA, Schoels W, Karle CA. QTc Prolongation by grapefruit Juice and its potential pharmacological. Basis HERG Channel Blockade by Flavonoides. *Circulation.* 111 (2005) 835-838.

Research Article

The Actions of Lyophilized Apple Peel on the Electrical Activity and Organization of the Ventricular Syncytium of the Hearts of Diabetic Rats

Elideth Martínez-Ladrón de Guevara,¹ Nury Pérez-Hernández,²
Miguel Ángel Villalobos-López,³ David Guillermo Pérez-Ishiwara,²
Juan Santiago Salas-Benito,² Alejandro Martínez Martínez,¹
and Vicente Hernández-García¹

¹Institute of Biomedical Sciences, Autonomous University of Ciudad Juárez, 32310 Ciudad Juárez, CHIH, Mexico

²National School of Medicine and Homeopathy, National Polytechnic Institute, 07320 Mexico City, DF, Mexico

³Centre for Research in Applied Biotechnology, National Polytechnic Institute, 90700 Tepetlilla, TLAX, Mexico

Correspondence should be addressed to Vicente Hernández-García; vicherna@uacj.mx

Received 27 August 2015; Revised 27 September 2015; Accepted 29 September 2015

Academic Editor: Hiroshi Okamoto

Copyright © 2016 Elideth Martínez-Ladrón de Guevara et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

This study was designed to examine the effects of lyophilized red delicious apple peel (RDP) on the action potentials (APs) and the input resistance-threshold current relationship. The experiments were performed on isolated papillary heart muscles from healthy male rats, healthy male rats treated with RDP, diabetic male rats, and diabetic male rats treated with RDP. The preparation was superfused with oxygenated Tyrode's solution at 37°C. The stimulation and the recording of the APs, the input resistance, and the threshold current were made using conventional electrophysiological methods. The RDP presented no significant effect in normal rats. Equivalent doses in diabetic rats reduced the APD and ARP. The relationship between input resistance and threshold current established an inverse correlation. The results indicate the following: (1) The functional structure of the cardiac ventricular syncytium in healthy rats is heterogeneous, in terms of input resistance and threshold current. Diabetes further accentuates the heterogeneity. (2) As a consequence, conduction block occurs and increases the possibility of reentrant arrhythmias. (3) These modifications in the ventricular syncytium, coupled with the increase in the ARP, are the adequate substrate so that, with diabetes, the heart becomes more arrhythmogenic. (4) RDP decreases the APD, the ARP, and most syncytium irregularity caused by diabetes.

1. Introduction

The cultivation of the apple (*Malus domestica*) for human consumption dates back centuries, and apples are now estimated to be the third most commonly consumed fruit, after bananas and citrus [1]. Epidemiological studies have related the ingestion of one apple or more a day to the prevention of pulmonary and colon cancers [2], cardiovascular disease, type 2 diabetes, pulmonary disorders, and Alzheimer's disease [3]. Some apple components have even been found to have beneficial effects with regard to cognitive loss with ageing, osteoporosis, gastrointestinal protection, and the maintenance of body weight [4]. The protective

effects are attributed to phytochemical compounds such as triterpenes and polyphenols due to their antioxidant properties. Furthermore, the apple contains large amounts of free polyphenols [5]. However, the composition of phytochemicals depends on factors including the variety, cultivation conditions, harvesting, soil, and climate, in addition to the type of fruit tissue that is considered (peel, pulp, and seed). The peel contains the greatest amount of polyphenols because it is the main physical, chemical, and biological protection of the fruit from the external environment [1].

The relationship between oxidative stress with diabetes and its micro- and macrovascular complications has been known for years, but the mechanisms involved have only

relatively recently begun to be understood. Interestingly, the redox state and diabetic cardiomyopathy that involves both mechanical and electrical cardiac dysfunction [6] are closely related [7] and are responsible for an increased vulnerability to developing heart arrhythmias and sudden death. Nonetheless, to date, there has been only one study, which indicates that red delicious apple peel (RDP) has direct actions on the heart's electrical activity with diabetic cardiomyopathy [8]. Within this context, the objectives of this study are (1) to evaluate and compare the action of the 50 mg/kg dose of RDP on the duration of cardiac action potentials (APs) at 30, 50, and 90% in normal and diabetic rats and (2) to analyse the functional organization of the ventricular syncytium through the input resistance versus threshold current curve of the hearts of control rats, control rats with RDP, diabetic rats, and diabetic rats with RDP administered daily for 90 days. The results obtained indicate that (1) RDP induced a significant decrease in action potential duration (APD) and absolute refractory period (ARP); (2) the cardiac syncytium in healthy animals and in those with diabetes is heterogeneous, in terms of input resistance and intracellular thresholds. However, in animals with diabetes, this irregularity is more accentuated; and (3) RDP administered orally to diabetic rats attenuates the irregularities of the relationship between input resistance and threshold current.

2. Methods

2.1. Apple Peel. The production of apple varieties in Mexico is mainly concentrated on the Golden Delicious and Red Delicious varieties [9]. Only red apple varieties contain anthocyanins; these flavonoids are responsible for the red and blue tones occurring in various fruits, such as grapes, berries, and figs. For this reason we decided to use the Red Delicious variety, which also has the highest concentration of free polyphenols [10–12].

Red Delicious apples, harvested in 2011, were purchased in the market of Ciudad Juárez, CHIH. To obtain the apple peels, a manual peeler was employed once the fruit was washed. The peels were immediately stored at -80°C . The lyophilization was performed using a 6-litre Labconco FreeZone lyophilizer. Once the peels were lyophilized, they were pulverized to obtain a fine powder that was vacuum-packed in plastic bags, shielded in black plastic bags, and stored at -20°C until being utilized. Thus, the biological activity of the polyphenols was preserved.

The proximate analysis of the RDP was performed according to the official methodology outlined by the Association of Official Analytical Chemists (AOAC) [13]. The total nitrogen was determined by the Kjeldahl technique, and the crude protein was calculated by multiplying the total nitrogen by 6.25. The crude fat was quantified by the Soxhlet technique. The carbohydrates were quantified by means of the difference of the other components. The fibre was quantified after their acid and alkaline digestion.

Phenol extraction was performed using 20 g of RDP dissolved in 125 mL of 80% methanol. The total phenolic content was determined with the modified Folin-Ciocalteu colorimetric method [14]. The measurement was compared to

a standard curve of gallic acid, and the results were expressed in units of mg of gallic acid equivalent (GAE) per 100 g dry weight.

The determination and quantification of the isomers of chlorogenic acid and epicatechin were performed in the laboratories of the Siliker Company at Mérieux NutriSciences in Grand Prairie, TX, USA.

2.2. Animal Model. The male Wistar rats that were used were acquired from Rismart and Research Global Solutions in Mexico City. The rats were maintained at a constant temperature of 25°C with a LD 12:12 cycle. Both food and water were always offered *ad libitum*. The treatment period was equivalent to 90 days, and 36 rats were utilized. They were divided into four groups: control ($n = 10$), control with RDP treatment ($n = 4$), type 1 diabetes ($n = 11$), and type 1 diabetes with RDP treatment ($n = 11$).

2.2.1. Groups with Apple Peel. The groups treated with RDP received a daily dose of 150 mg/kg. The concentrate was dissolved in distilled water in small volumes and administered orally with a tuberculin syringe. The dose was equated to the daily consumption of the peels of three apples/day ingested by an adult man weighing 70 kg.

2.2.2. Induction of Diabetes Mellitus. The induction of diabetes mellitus type 1 was accomplished using a single intraperitoneal administration of 45 mg/kg of streptozotocin (STZ, Sigma Chemical Company) dissolved in a citrate buffer at pH 4.8. To decrease the mortality due to the hypoglycaemia generated by the STZ, 60 mM of sugar water was provided *ad libitum* for one week. The glycaemia of the blood was determined at eight days after STZ injection using a commercial blood glucose metre (OneTouch Ultra 2). For this study, only those rats with glycaemia values above 150 mg/dL were used. All experiments were performed according to the guidelines established by the Ethics Committee for Experimental Animals of the Autonomous University of Ciudad Juárez.

2.2.3. Electrophysiological Experiments. Prior to experimentation, the rats were anesthetized with sodium pentobarbital at 50 mg/kg and 0.2 units of heparin/mL. Once an animal was anesthetized, its abdomen was opened; from this area, cardiac puncture was performed, and a 4 mL blood sample was obtained. Then, proceeding to the isolation of the heart, it was placed in an isolated tissue chamber and continuously perfused with oxygenated Tyrode's solution at 37°C . Under these conditions and by dissection of the left ventricle, the left ventricular papillary muscles were isolated. The preparation thus obtained was stimulated through external bipolar silver electrodes coated with insulating material, except for the tip, at a basic cycle of 500 milliseconds. The stimuli were rectangular pulses of one millisecond in duration and an intensity 1.5 times the threshold, obtained from a Digitimer model D4030 pulse generator and passed through a Digitimer model DS2 stimulus isolation unit. When the propagation of premature responses (extrasystoles) was explored, the preparation was stimulated regularly at a basic cycle of 500 milliseconds and, after applying eight

basic stimuli, a test stimulus was introduced through the same pair of stimulation electrodes at different time intervals. The intracellular action potentials were obtained using glass microelectrodes filled with 3M KCl solution and with a tip resistance of between 10 and 20 megaohms. The signal obtained by the microelectrodes was passed through high input impedance amplifiers, WPI model 750, and an HV Electrometer model 400E. The recording of the APs was performed on the screen of a Tektronix model TDS3034B oscilloscope. The records were stored on a Dell model GX520 computer for further quantitative analysis.

2.2.4. Biochemical Analyses. The quantifications of glucose and glycosylated haemoglobin (HbA_{1c}) were determined at 90 days by spectrometry in the Servalab Clinical Laboratory (Puebla, Mexico). To determine the glucose concentration, a Glucose PAP kit (ELITech Clinical Systems) was used in a Vitros DT60 Chemistry System, whereas the HbA_{1c} was performed with a LabonaCheck A_{1c} kit in an HbA_{1c} Analyser. The evaluation of the plasma insulin levels was performed by chemiluminescence in the Italo Gaya Laboratory (Puebla, Mexico).

2.3. Statistical Analysis. The data were analysed with Graph-Pad Prism version 4.00 for Windows (GraphPad Software, La Jolla, California, USA). The numerical results are expressed as mean values \pm SEM (standard error of the mean). The differences observed between the control and the treated groups were assessed using unpaired two-tailed Student's *t*-test. Values were considered statistically significant at $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Analysis of the Apple Peel. Table 1 shows the principal components and their values in % of RDP. The polyphenol content was 1,100 μ g GAE/100 g dry weight. Specifically, the isomers of chlorogenic acid and epicatechin were present at a concentration of 0.1148 and 2.35 mg/g dry weight, respectively. The determination of the total polyphenols by means of the Folin-Ciocalteu method depends on the extraction of the polyphenols and the units used to report them; thus, it is difficult to compare the results. However, the levels of chlorogenic acid and epicatechin in the peels are in line with those published by other authors [2]. Both chlorogenic acid and epicatechin are the most abundant polyphenols in the apple [4].

3.2. Criteria for Considering Diabetogenesis in Wistar Rats. Table 2 presents variables relating to the body weight and biochemical blood parameters of the rats 90 days after diabetes mellitus was induced.

3.3. Action Potentials

3.3.1. Characteristics of the Action Potentials (APs) of the Hearts of the Control Rats and the Diabetic Rats. Figure 1 shows the overlapping mean APs, recorded in the isolated papillary muscles of hearts from the control rats (blue

TABLE 1: Analysis of the composition of the lyophilized apple peel (RD).

Component	%
Moisture	81.5
Ash	1.45
Crude protein	0.02
Crude fat	0.35
Carbohydrates	15
Crude fibre	1.59

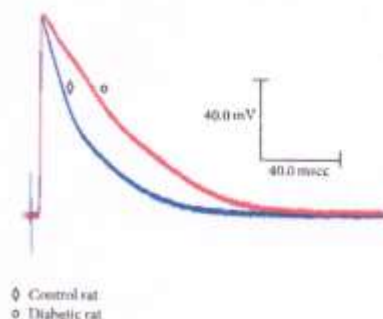


FIGURE 1: Changes in the action potential with diabetes. Representative action potentials obtained from a cell of the papillary muscle of the left ventricle of the heart of control rats and diabetic rats at a basic cycle of 500 milliseconds.

diamond) and the diabetic rats (red circle), evoked by a basic 500-millisecond cycle.

Figure 2 shows the result of averaging the APs of the diabetic rats and the diabetic rats treated for 90 days with 150 mg/kg of RDP.

Figure 3 summarizes the APD at 30, 50, and 90% and the ARP of the control rats, the diabetic rats, and the diabetic rats treated with RDP.

3.4. Modifications Occurring in the Ventricular Syncytium Muscle with Diabetes

3.4.1. Determination of the Input Resistance and Intracellular Thresholds in the Papillary Muscles of Control Rats and Diabetic Rats Using the Method [14]. Concisely, (1) the papillary heart muscles of the rat present a syncytial geometric organization and (2) to evaluate the possible potential changes of this syncytial organization, it is necessary to quantify the parameters of the input resistance and the threshold current (necessary to evoke a propagated AP).

To quantify the input resistance and the threshold current, two microelectrodes penetrating the same cell were used. The microelectrodes were cemented or glued, aligned under a microscope, and separated between their tips at a distance of approximately 10 μ m. The microelectrodes were mounted in a double micromanipulator (Narishige MD-4)

TABLE 2: Body weight and biochemical parameters of the rats after 90 days of treatment.

	Weight (g)	Glucose (mg/dL)	Insulin (μ UI/mL)	HbA _{1c} (%)
Control (n = 11)	501.00 \pm 13.22	196.50 \pm 10.33	0.3455 \pm 0.01575	4.282 \pm 0.3009
D (n = 11)	363.20 \pm 29.80*	487.10 \pm 23.98*	0.1545 \pm 0.03423*	6.009 \pm 0.1984*
D + RDP (n = 8)	366.40 \pm 10.67*	511.50 \pm 58.35*	0.1500 \pm 0.03727*	6.000 \pm 0.1753*

Mean \pm SEM. * $p < 0.05$, control versus diabetes.

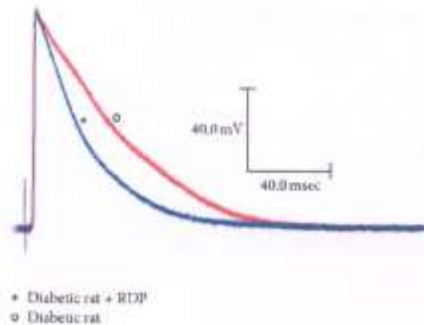


FIGURE 2: Action of the apple peel on the action potentials of diabetic rats. Typical transmembrane potentials obtained in the papillary muscles of the heart of diabetic rats and diabetic rats with apple peel at a basic cycle of 500 milliseconds.

with independent vertical movement. With this system, it was possible to impale the two microelectrodes in the same cell or in two adjacent cells connected by their *nexus*. Under these strict conditions, depolarizing or hyperpolarizing current pulses were injected through one microelectrode, and, with the other, the changes in the transmembrane potential were recorded.

Figure 4 shows the steps that were followed to quantify the input resistance and the intracellular thresholds in the papillary muscles of the control rats. The top trace in Figure 4(a) shows the injection of three constant current hyperpolarizing pulses, in late diastole, with a duration of 7.0 milliseconds and intensities of 35, 68, and 100 nanoamperes, and their corresponding variations in the membrane potential of 5, 10, and 16 millivolts (lower trace). By plotting the change in membrane potential with respect to the injected current, a straight line is obtained, with a slope that is the value of the input resistance. In Figure 4(b), the current polarity is inverted, and a pulse of depolarizing current is injected. The pulse duration is 7.0 milliseconds, and its intensity is gradually increased until it can evoke an action potential. In this case, the intracellular threshold is 805.5 nanoamperes. Figure 4(c) shows the simultaneity and the same configuration of the depolarization phase of the action potentials recorded in the same cell by both of the microelectrodes. Finally, in Figure 4(d), the zero potential of both action potentials recorded in the same cell is obtained. Therefore, it is important to note that the value of

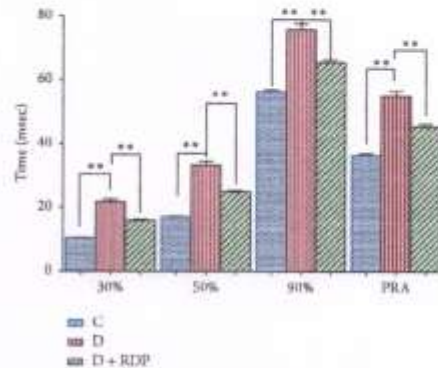


FIGURE 3: Mean values \pm SEM of the quantified parameters of the action potentials recorded in the papillary muscles of the hearts of control rats (n = 225), diabetic rats (n = 110), and diabetic rats receiving apple peel for 90 days (n = 169) at a basic cycle of 500 milliseconds. The symbols (**) indicate that the differences between the different groups are significant ($p < 0.05$).

the input resistance of the cell will be valid provided that the requirements shown in Figures 4(c) and 4(d) are met.

Using this procedure, sufficient data on the input resistance and threshold current were obtained in the control rats to show that their product (ohms \times amperes = volts) equals a mean value of 30 mV. In other words, the experimental results are fitted to the theoretical curve of an equilateral hyperbola in the form $Y = K/X$, where K is a constant with a value equalling 30 mV; and the XY product (resistance \times current) is the drop in potential that corresponds to the value of the constant, K , with units in volts. These experimental relationships are shown in Figure 5, with a function, F , and $p < 0.05$. In this graph, the experimental values of the input resistance ranged between 24 and 171.4 K Ω , and the minimum current threshold necessary to initiate propagated responses ranged from 175 to 1,220 nanoamperes.

Because the preparation of the papillary muscle of the rat heart maintains its force of contraction, the duration of the impalement of the microelectrodes is brief. Determining the threshold is achieved by small amplitude steps of increasing current until initiating an AP; consequently, our threshold values lacked absolute precision. Therefore, if the input resistance and threshold current are adequately related, with the equation of an equilateral hyperbola with constant value, $K = 30$ mV, then we can quantify the intracellular thresholds

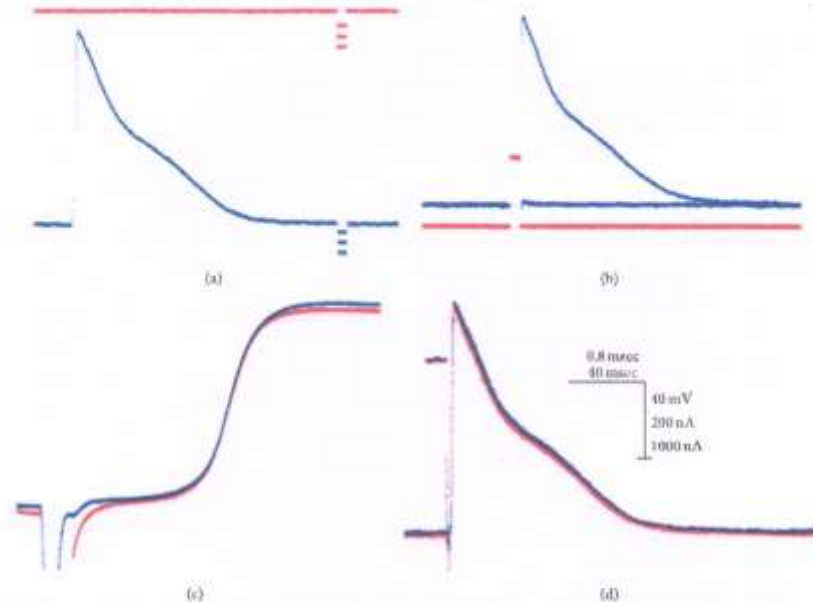


FIGURE 4: Procedure for determining the input resistance. Steps followed to quantify the input resistance and the intracellular thresholds in the papillary muscles of the hearts of the control rats: (a) injection of the pulse current in late diastole to evaluate the input resistance; (b) determination of the intracellular threshold; (c) simultaneous and shape of the depolarization phase of the action potentials; (d) zero potential of both records obtained from the same cell.

more precisely and explore more of the cells in the papillary muscles, impaling two independent microelectrodes at different sites in the preparation. Thus, we can inject the current in smaller steps through one electrode up to the threshold and record the propagated AP through the other. Under these conditions, the input resistance values can be calculated with the equation of the equilateral hyperbola: $Y = K/X$.

3.4.2. Relationship between Input Resistance and Threshold Current in the Hearts of the Control Rats and the Control Rats with Treatment. To make the electrode impalement technique more efficient, obtain a greater amount of experimental data, and have more precise current threshold values, the microelectrode recording the APs remains fixed somewhere in the biological preparation, and the other microelectrode is impaled into many other sites of the papillary muscle for the determination of their thresholds. These data are now used to calculate their corresponding input resistance.

Figure 6 shows the relationships between the papillary muscles of the control rats and the papillary muscles of the control rats treated with 150 mg/kg of RDP over a 90-day period. The values for the input resistance found in the control rats are between 24 and 316.5 K Ω , and their corresponding threshold currents range from 94 to 1,232 nanoamperes. Similar input resistance and threshold current values were observed in both groups.

3.4.3. Relationships between Input Resistances and Threshold Currents in the Control Rats and the Diabetic Rats. Figure 7 shows the changes between the input resistance and threshold current values due to the diabetogenic effects. Wide variations in input resistances, ranging from 24 to 814.1 K Ω , in threshold currents, ranging from 36 to 1,232 nanoamperes, and the resting membrane potential of -77.50 ± 0.3554 mV ($n = 109$) were found in the papillary muscles of the diabetic rats, while in the control rats the variations in input resistance range from 24 to 316.5 K Ω and corresponding threshold current ranges from 1,232 to 94 nanoamps with a resting membrane potential of -76.62 ± 0.5664 mV ($n = 252$). Observe the displacement towards higher input resistance values and low thresholds in the hearts of the diabetic rats.

3.4.4. The Input Resistance-Threshold Current Relationship in the Diabetic Rats and the Diabetic Rats with RDP Treatment. Figure 8 shows the effects of RDP on the input resistance-threshold current values obtained in the papillary muscles of the diabetic rats and the diabetic rats treated with RDP. The results clearly indicate a reduction in diabetogenic effects due to the administration of the RDP, based on the values of the input resistance and threshold current.

3.4.5. Propagation of Premature Responses and Reentrant Activity in the Diabetic Rats. The modifications in the input

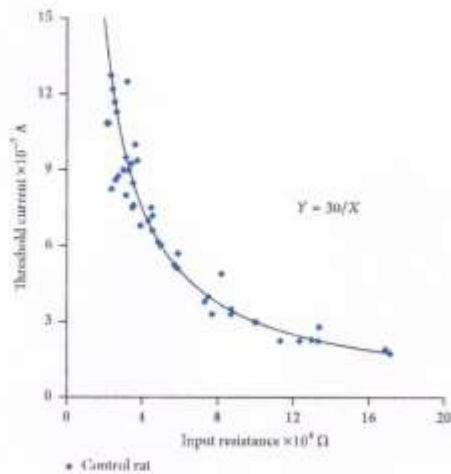


FIGURE 5: Fit relationship of the experimental input resistance-current threshold values (blue) with respect to the theoretical curve (black). Values obtained in the cells of the papillary muscle of the heart of the control rats. The continuous curve corresponds to an equilateral hyperbola defined by the equation $Y = K/X$, where $K = 30$ mV. For each input resistance value, there is a corresponding threshold current value adequately conforming to the theoretical curve, which is established by the statistical analysis of $R^2 = 0.92$ and $p < 0.05$.

resistance and the intracellular threshold found in the papillary muscles of the rats with diabetes can cause the propagation of APs that may become critical; under these conditions, reentrant bioelectrical activity may arise which initiates ventricular fibrillations and sudden death.

Figure 9 shows the response evoked by the application of an early extrasystole in the papillary muscle of diabetic rats. The upper trace corresponds to the APs recorded in the area proximal to the site of the external stimulation electrodes; the lower trace corresponds to the APs recorded in a site distal to the stimulation electrodes. The first response corresponds to the last of a series of eight APs evoked by basic stimuli. The second response corresponds to the activity generated by a test stimulus applied 40 milliseconds after the last basic stimulus. It is observed that the AP evoked by the test pulse is followed by two APs (asterisks) that were not initiated by stimulation, which demonstrates the hypersensitivity of the ventricular syncytium of diabetic rats to generate reentrant action potential activity.

Another example of reentrant activity is shown in Figure 10. This result provides additional evidence that when a test pulse is applied early, the evoked response is followed by multiple reentrant activity. In this case, the last two reentrant action potentials are conducted in a retrograde direction.

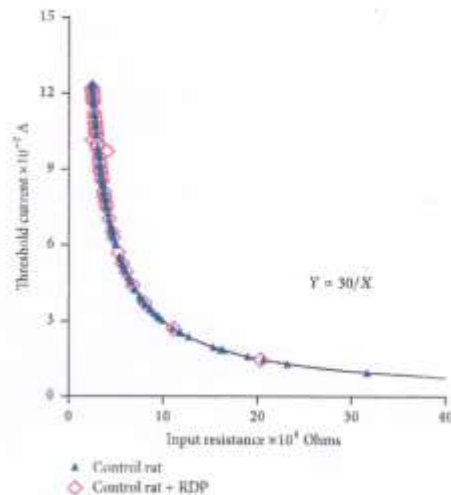


FIGURE 6: Input resistance-current threshold relationship in control rats and control rats with RDP treatment (150 mg/kg). The values of the input resistance were calculated using the equation of the equilateral hyperbola, $Y = K/X$, where Y is the threshold current quantified experimentally and $K = 30$ mV is the constant value. Filled symbols: control rats; unfilled symbols: control rats + RDP.

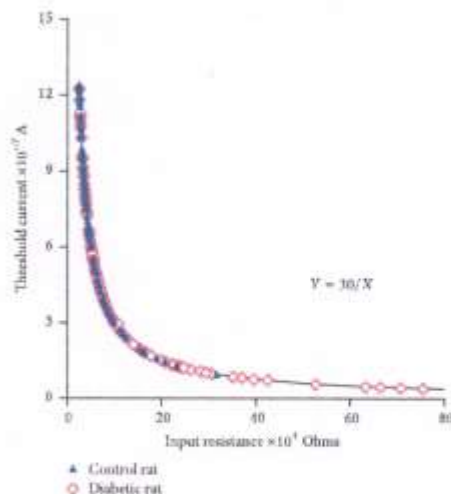


FIGURE 7: Input resistance versus threshold current relationship in the control rats and diabetic rats. The relationship obtained in the papillary muscle of the heart of the control rats and the rats with diabetes. The continuous line corresponds to the theoretical equilateral hyperbola, $Y = 30/X$. Filled symbols: control rats; unfilled symbols: diabetic rats.

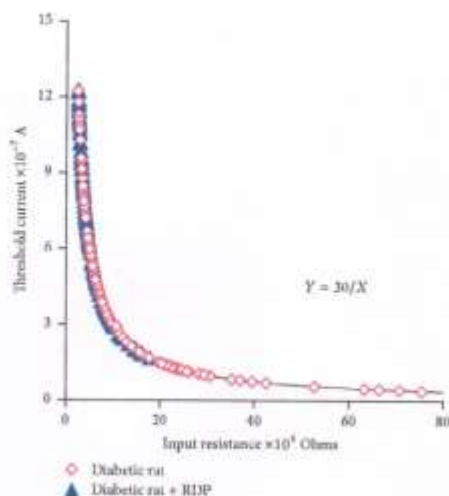


FIGURE 8: Changes in the input resistance-current threshold relationships in diabetic rats and diabetic rats treated with RDP; 150 mg/kg for 90 days. Filled symbols: diabetic rats; unfilled symbols: diabetic + RDP.

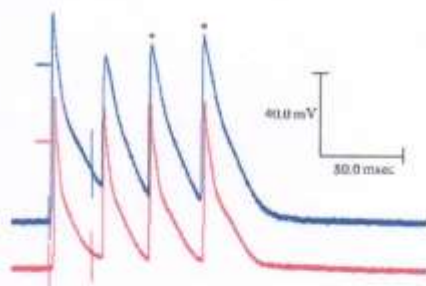


FIGURE 9: Reentrant activity initiated by the application of an early extrasystole. The traces shown correspond to action potentials recorded in the papillary muscles of diabetic rats, in the area proximal (upper trace) and the area distal (lower trace) to the stimulation site, at a basic cycle of 500 milliseconds. Observe that, after the implementation of the extrasystole, two responses (asterisks) not evoked by stimulation appear, corresponding to a type of reentrant activity.

4. Discussion

This study was designed with the purpose of obtaining solid experimental evidence of the effects of RDP on diabetic cardiomyopathy. A well-established model of diabetes induced by streptozotocin in the rat was used for this purpose [15, 16]. The effects of RDP were quantified with the electrophysiological parameters of the papillary muscle

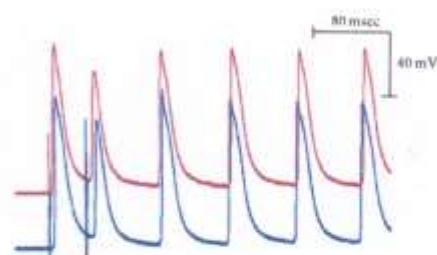


FIGURE 10: Change of direction in the propagation of the wavefront. Observe that the first three responses (basic, test, and first reentrant) are propagated from the stimulation site towards the rest of the preparation, whereas the last three following reentrant responses propagate in the opposite direction.

of the hearts of male Wistar rats. The electrophysiological properties studied included (1) the duration of the ARP and APs at 30, 50, and 90% of their repolarization and (2) the organization of the ventricular syncytium muscle in terms of the input resistance-current threshold relationship in control rats, control rats treated with RDP, diabetic rats, and diabetic rats treated with RDP.

It is important and necessary to clarify that we are unable to provide an adequate explanation of or the mechanisms that are involved in the actions and effects of the RDP for the following reasons: (1) This is the first study in which the action of RDP is assessed, (2) All of the biologically active components of RDP are not known, (3) Their concentrations and pharmacokinetic and pharmacodynamic properties prevent us from formulating an explanation. Considering the foregoing and with the aforementioned reservations, we interpret the actions of RDP on the hearts of diabetic rats.

4.1. Action Potentials. The results obtained clearly show that the duration of the action potentials increases in the papillary heart muscles of the diabetic rats compared to the control rats (Figures 1 and 3) [16–20]. Additionally, the increase in the duration of the action potential is more pronounced at 30% than at 90%. There are several ionic currents that intervene spatially and temporally in the repolarization of the action potential in the ventricular myocardium of the rat. The early phase of ventricular repolarization is performed by the activation of two potassium currents (I_{Kr}^{-1}), the transient outward current (I_{to}) and the delayed rectifier current (I_{K}) [21], whereas the late phase of repolarization is due to the activation of the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger current, which is responsible for the final elongation of the repolarization of the action potential [22]. Furthermore, the increase observed in the early phase of the repolarization of the action potentials in the diabetic rats is due to the decrease in the potassium currents, I_{to} and I_{K} [16, 18, 20], whereas the increase in $APD_{50\%}$ is attributed to the increase in the Na^{+}/Ca^{2+} exchanger current, causing an overload of Ca^{2+} in the ventricular myocytes [23–25].

Figures 2 and 3 show that the supplementation of apple peels to the diabetic rats for 90 days after having induced diabetes significantly decreased the duration of the action potentials and the ARP. Results similar to those shown in this study have been obtained by other authors [26]. It has been reported that the polyphenols contained in apple extract decrease the duration of the action potential in the ventricular myocytes of the mouse heart with dilated cardiomyopathy. Such a decrease in the APD is the result of an increased K^+ current (I_{K1}), induced by the polyphenols extract. The results obtained in the papillary muscles of diabetic rats with treatment can be explained if we assume that the RDP has the same types of polyphenols and is at concentrations similar to those found in the apple extracts tested [25]. Consequently, the RDP could cause an increase in the transient outward K^+ current (I_{Kt}), given that it is the principal K^+ current affected in the ventricular myocytes of the hearts of diabetic rats [16, 20]. Indeed, it is necessary to measure this current in the ventricular myocytes of the diabetic rats to provide a more sustainable affirmation.

4.2. Organization of the Ventricular Syncytium of the Rat Heart. Our study was conducted in the isolated papillary muscles of the left ventricle of the rat heart. Before considering the interpretation of the results, in which the organization of the ventricular functional syncytium was analysed, we must consider the following factors:

- (1) The first work in which the organization of the ventricular functional syncytium was analysed [27] was developed in the right anterior papillary muscle of the dog heart. This preparation has been used extensively in studies of heart electrophysiology. The morphologies of the intracellular action potentials revealed the existence of three functionally distinct areas in the right anterior papillary muscle of the dog heart [28]. The proximal and middle thirds are composed of muscle tissue and specialized conduction tissue. The distal third contains only ventricular muscle. The same authors designated the end portion of the conduction tissue as terminal Purkinje fibres. The terminal Purkinje fibres establish low-resistance electrical contact with the ventricular muscle fibres and give rise to the Purkinje-muscle junctions. In this manner, the preparation of the papillary muscle of the dog provides a syncytium composed of different cellular elements that can be easily identified.
- (2) Nonetheless, the rat is an experimental model widely used in cardiac electrophysiology studies. To date, there is no interest in performing the classification made in the anterior papillary muscle of the dog in the papillary muscle of the left ventricle of the rat [28]. With that condition, it is assumed that there is a similar functional structure in their proximal and middle thirds (composed of specialized conduction fibres and ordinary ventricular muscle cells). This asseveration is supported by the similarity of the input resistance values evaluated in the proximal and middle thirds (high resistance values and low thresholds).

Low resistance values and high thresholds are found in the distal third, which indicates that the distal third may possibly be composed exclusively of muscle tissue. Thus, the homology is considered applicable in all mammals.

4.2.1. The Input Resistance-Threshold Current Relationship in the Papillary Muscles of the Control Rats. The knowledge of the structural organization of the ventricular syncytium is made possible through the study of its active and passive functional properties. The foregoing involves first determining the characteristics of the generation and propagation of its APs. In making these determinations, understanding its behaviour as a functional syncytium is favoured, in addition to the importance that it represents for the structural geometry of the organization of the cardiac ventricular syncytium. It also helps to explain, under normal conditions, the proper propagation of the APs, even when there is a low margin of safety for the propagation [29].

It was observed that the experimental data on the input resistance-threshold current obtained in the cardiac syncytial system of the rat fit an equilateral hyperbola (Figures 5, 6, 7, and 8) and that the values of the input resistance and intracellular thresholds change, with relatively broad ranges.

These results show the following characteristics of the mammalian ventricular functional syncytium [27]:

- (1) The input resistance and threshold current are inversely related.
- (2) The functional organization of the ventricular syncytium in the left papillary muscle of the rat heart is irregular in terms of the values of the input resistance and the current threshold for initiating an action potential. However, they maintain the same constant value; $K = 30$ mV.
- (3) In terms of the threshold current, the cellular excitability is different in each of the explored sites of the papillary muscle preparation.

Therefore, in relatively small areas, the extension of the abundance of low resistance junctions can be an important parameter that can determine and explain the hyperbolic nature of the relationship between the input resistance and the current threshold [27]. With this experimental evidence, it is possible to explain the results obtained. We conclude that the papillary heart muscles from the control rats constitute an irregular syncytium and that the principal cause for this lack of homogeneity is the possible nonuniformity of the spatial distribution of the *nexus* (Figures 5 and 6). Similarly, the experimental data indicate that the smaller the value of the input resistance, the higher the threshold current. The only way we can explain this fact is by assuming that the density of the *nexus* varies from one small area to the next. The small areas that we refer to would be the amount of cells needed to permit the formation of the wavefront [30], and, under these circumstances, every initiation of a wavefront will have a different threshold and, consequently, will present a different *nexus* density. The results shown in Figures 5 and 6 indicate

the lack of homogeneity in the ventricular syncytium of the hearts of the control rats.

4.2.2. The Input Resistance-Threshold Current Relationship in the Papillary Muscles of the Diabetic Rats. The irregularity of the ventricular syncytium of the hearts of healthy rats does not imply ventricular electrophysiological abnormalities. However, under pathological conditions such as diabetes (Figure 7), the heterogeneity of the cardiac syncytium is accentuated in these new conditions and increases the probability of the development of lethal arrhythmias. The greater heterogeneity found in the heart of the diabetic rats includes areas of tissue in the papillary muscle with higher input resistance values and lower intracellular thresholds, which implies the existence of areas of tissue with less *nexus* density in the papillary muscle. This phenomenon, observed with high input resistance values and low threshold current values, is firmly supported by studies in diabetic rats in which the decreases in the expression of connexin 43 were found, in addition to the redistribution of their *nexus* [31, 32].

4.2.3. Reentrant Activity in the Ventricular Syncytium of the Diabetic Rats. The accentuated changes in the values of the input resistance and the intracellular thresholds found in the papillary muscles of the diabetic rats become critical to the propagation of the APs. Under these conditions, a wavefront originating from a low-resistance area (high threshold) to high-resistance area (low threshold) propagates easily. However, the opposite case, in which an area of high resistance (low threshold) comes into contact with an area of low resistance (high threshold), faces greater difficulty in propagation because the depolarizing current provided by the wavefront is insufficient for reaching the threshold. Consequently, blocking of the propagation occurs at the site of low resistance, and reentrant activity is facilitated [33]. Figures 9 and 10 clearly show that this phenomenon occurs.

With regard to the results obtained in the papillary muscles of the diabetic rats, it follows that the phenomena exhibited in the propagation of premature responses are the result of discontinuous propagation. Under these conditions, two factors that can cause conduction block in the ventricular syncytium are added: (1) the small efficacy of the premature action potentials, as physiological stimulus, and (2) the irregularity in the input resistance and the intracellular threshold for initiating propagated action potentials (cellular excitability). It is well known that the propagation of the AP in areas of tissue whose excitability is found to be reduced (low input resistance) is performed through electronic potentials [30] and that the magnitude and temporal development of such potentials depend on the organizational geometry of the syncytium.

This study presents two important findings: (1) simultaneous modifications in the input resistance-intracellular threshold in the hearts of diabetic rats and (2) the alterations in the propagation of premature responses. These phenomena allow us to provide an adequate explanation of the arrhythmogenic phenomenon shown by the heart in pathological situations such as diabetes; furthermore, they produce a partial understanding with respect to the high vulnerability

of the heart in presenting ventricular fibrillation and sudden death.

4.2.4. Action of the RDP on the Input Resistance-Threshold Current Relationship in the Papillary Muscles of the Hearts of the Control Rats and the Diabetic Rats. Under normal conditions, the daily ingestion of at least one apple is sufficient to decrease the incidence of cardiovascular disease and/or diabetic cardiomyopathy. The dose of RDP provided to the healthy rats for 90 days maintained the heterogeneity of the ventricular syncytium observed in the papillary muscles of the healthy rats (Figure 6). However, the oral supplementation of RDP to the diabetic rats attenuated the increase in the input resistance and the decrease in the threshold current (Figure 8). We noted above (Figure 7) that the increase in the heterogeneity of the ventricular syncytium in the diabetic rats occurs due to a decrease in the density of the *nexus*, which causes an increase in the input resistance values and a decrease in the intracellular thresholds. These changes are supported by the decreased expression of connexin 43, and, therefore, the spatial redistribution of the *nexus* occurs [31, 32]. In the papillary muscles of the diabetic rats with RDP, lower input resistance values and higher current thresholds were found. These magnitudes were similar to those obtained in the control rats. The latter indicates that, in the papillary muscles of the diabetic rats with RDP, there are areas of tissue with a greater density of *nexus*. This observed phenomenon can be explained if we consider that the alterations that occur in the diabetic rats may also occur in dilated cardiomyopathy in the mouse. In this model of dilated cardiomyopathy [26], it was reported that oral supplementation of the mice with an extract of polyphenols contained in the apple increased the expression of connexin 43; consequently, there was an increase in the density and interconnection of the *nexus* in the cardiac myocytes.

Finally, the decrease in the amplitudes of the heterogeneities of the ventricular syncytium and the decrease in the absolute refractory period are two factors that favour the disappearance of the critical propagation of action potentials. Therefore, the heart becomes less vulnerable to arrhythmias. We conclude that apple peel has protective effects on diabetic cardiomyopathy.

5. Conclusions

- (1) The ventricular syncytium of the control rats is heterogeneous.
- (2) In diabetic cardiomyopathy, the organization of the ventricular syncytium muscle proceeds with functional modifications that are evaluated in terms of input resistance and threshold current.
- (3) The propagation of premature responses is associated with conduction blocks.
- (4) The hearts of rats with induced diabetes are more vulnerable to reentrant arrhythmias.
- (5) The apple peel achieves its protective action by reducing the ARP and attenuating the modifications that the ventricular syncytium suffers during diabetes.

Abbreviations

APD: Action potential duration
 GAE: Gallic acid equivalents
 STZ: Streptozotocin
 AP: Action potential
 ARP: Absolute refractory period
 RDP: Red Delicious apple peel.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests regarding the publication of this paper.

Acknowledgment

The authors would like to express their gratitude to the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT, Mexico) (National Council of Science and Technology) for the economic scholarship awarded (no. 60485).

References

- [1] T. K. McGhie, S. Hudault, R. C. M. Tanker, and J. T. Christler, "Apple peels, from seven cultivars, have lipase-inhibitory activity and contain numerous uronic acids as identified by LC-ESI-QTOF-HRMS," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 1, pp. 482–491, 2012.
- [2] A. Francini and L. Sebastiani, "Phenolic compounds in apple (*Malus x domestica* Borkh.): compounds characterization and stability during postharvest and after processing," *Antioxidants*, vol. 2, no. 3, pp. 181–193, 2013.
- [3] D. A. Hyslop, "A comprehensive review of apples and apple components and their relationship to human health," *Advances in Nutrition*, vol. 2, no. 5, pp. 408–420, 2011.
- [4] C. M. Andre, J. M. Greenwood, E. G. Walker et al., "Anti-inflammatory procyanidins and triterpenes in 109 apple varieties," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 60, no. 42, pp. 10546–10554, 2012.
- [5] J. Bizjak, M. Mikulic-Petkovsek, F. Stampar, and R. Veberic, "Changes in primary metabolites and polyphenols in the peel of 'braeburn' apples (*Malus domestica* Borkh.) during advanced maturation," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 61, no. 43, pp. 10283–10292, 2013.
- [6] A. Nygren, M. L. Olson, K. Y. Chen, T. Emmett, G. Kargacin, and Y. Shimoni, "Propagation of the cardiac impulse in the diabetic rat heart: reduced conduction reserve," *Journal of Physiology*, vol. 580, no. 2, pp. 543–560, 2007.
- [7] N. T. Aggarwal and J. C. Makielski, "Redox control of cardiac excitability," *Antioxidants and Redox Signaling*, vol. 18, no. 4, pp. 432–468, 2013.
- [8] E. Martínez-Ladron de Guevara, N. Pérez-Hernández, M. A. Villalobos-López, F. Félix Durán, and V. Hernández García, "Actions of the apple peel on electrical activity of the heart of rats with type 1 diabetes," in *Proceedings of the 1st PanAmerican Congress of Physiological Sciences*, abstract 04-36, p. 83, Foz de Iguaçu, Brazil, 2014.
- [9] Secretariat of Finance and Public Credit, "Panorama of the apple," April 2014, [http://www.financiarural.gob.mx/informacionsectorial/Panoramas/Panorama%20Manzana%20\(abr%202014\).pdf](http://www.financiarural.gob.mx/informacionsectorial/Panoramas/Panorama%20Manzana%20(abr%202014).pdf).
- [10] U. Imeh and S. Khokhar, "Distribution of conjugated and free phenols in fruits: antioxidant activity and cultivar variations," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 50, no. 22, pp. 6301–6306, 2002.
- [11] R. Tsao, H. Yang, J. C. Young, and H. Zhu, "Polyphenolic profiles in eight apple cultivars using high-performance liquid chromatography (HPLC)," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 21, pp. 6347–6353, 2003.
- [12] K. Wolfe, X. Wu, and R. H. Liu, "Antioxidant activity of apple peels," *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 51, no. 3, pp. 609–614, 2003.
- [13] Association Official Analytical Chemists (AOAC), *Official Methods of Analysis*, AOAC, Washington, DC, USA, 16th edition, 1995.
- [14] V. L. Singleton and J. A. Rossi Jr., "Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents," *American Journal of Enology and Viticulture*, vol. 16, no. 3, pp. 144–158, 1965.
- [15] E. S. Fein, L. B. Kornstein, J. E. Strobeck, J. M. Capasso, and E. H. Sonnenblick, "Altered myocardial mechanics in diabetic rats," *Circulation Research*, vol. 47, no. 6, pp. 922–933, 1980.
- [16] Y. Shimoni, L. Firek, D. Severson, and W. Giles, "Short-term diabetes alters K⁺ currents in rat ventricular myocytes," *Circulation Research*, vol. 74, no. 4, pp. 620–628, 1994.
- [17] E. S. Fein, R. S. Aronson, C. Nordin, B. Miller-Green, and E. H. Sonnenblick, "Altered myocardial response to ouabain in diabetic rats: mechanics and electrophysiology," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 15, no. 11, pp. 769–784, 1983.
- [18] J. Magyar, Z. Rusznák, P. Szentesi, G. Szűcs, and I. Kovács, "Action potentials and potassium currents in rat ventricular muscle during experimental diabetes," *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, vol. 24, no. 8, pp. 841–853, 1992.
- [19] P. Jourdon and D. Feuvray, "Calcium and potassium currents in ventricular myocytes isolated from diabetic rats," *The Journal of Physiology*, vol. 470, no. 1, pp. 411–429, 1993.
- [20] Y. Shimoni, D. Severson, and W. Giles, "Thyroid status and diabetes modulate regional differences in potassium currents in rat ventricle," *The Journal of Physiology*, vol. 488, no. 3, pp. 673–688, 1995.
- [21] M. Apkon and J. M. Nerbonne, "Characterization of two distinct depolarization-activated K⁺ currents in isolated adult rat ventricular myocytes," *Journal of General Physiology*, vol. 97, no. 5, pp. 973–1011, 1991.
- [22] M. R. Mitchell, T. Powell, D. A. Terrar, and V. W. Twist, "The effects of ryanodine, EGTA and low sodium on action potentials in rat and guinea-pig ventricular myocytes: evidence for two inward currents during the plateau," *British Journal of Pharmacology*, vol. 81, no. 3, pp. 543–550, 1984.
- [23] J. R. Lopez, T. Banyasz, T. Kavacs, F. A. Sreter, and G. Szűcs, "Defective myoplasmic Ca²⁺ homeostasis in ventricular muscle in diabetic cardiomyopathic rats," *Biophysical Journal*, vol. 53, article 161a, 1988, (abstract).
- [24] S. Nobe, M. Nomine, M. Arii, S. Ito, and R. Takaki, "Chronic diabetes mellitus prolongs action potential duration of rat ventricular muscles: circumstantial evidence for impaired Ca²⁺ channel," *Cardiovascular Research*, vol. 24, no. 5, pp. 381–389, 1990.
- [25] D. Lagadic-Gossmann, K. I. Buckler, K. Le Prigent, and D. Feuvray, "Altered Ca²⁺ handling in ventricular myocytes isolated from diabetic rats," *The American Journal of Physiology—Heart*

- and *Circulatory Physiology*, vol. 270, no. 5, pp. H1529–H1537, 1996.
- [26] T. Sunagawa, T. Shimizu, A. Matsumoto et al., "Cardiac electrophysiological alterations in heart/muscle-specific manganese-superoxide dismutase deficient mice: prevention by a dietary antioxidant polyphenol," *BioMed Research International*, vol. 2014, Article ID 704291, 12 pages, 2014.
- [27] C. Mendez and V. Hernandez, "Inverse relation between input resistance and threshold current in canine cardiac syncytium," *Journal of Cardiovascular Electrophysiology*, vol. 12, no. 3, pp. 337–342, 2001.
- [28] K. Matsuda, A. Kamillama, and T. Hoshi, "Configuration of the transmembrane potential of the Purkinje-muscle fiber junction and its analysis," in *Electrophysiology and Ultrastructure of the Heart*, pp. 177–187, Grune & Stratton, New York, NY, USA, 1967.
- [29] C. Mendez, W. J. Mueller, and X. Uguet, "Propagation of impulses across the Purkinje fiber-muscle junctions in the dog heart," *Circulation Research*, vol. 26, no. 2, pp. 135–150, 1970.
- [30] C. Mendez and G. K. Moe, "Some characteristics of transmembrane potentials of AV nodal cells during propagation of premature beats," *Circulation Research*, vol. 19, no. 6, pp. 933–1010, 1966.
- [31] H. Lin, K. Ogawa, I. Imanaga, and N. Tribulova, "Remodeling of connexin 43 in the diabetic rat heart," *Molecular and Cellular Biochemistry*, vol. 290, no. 1-2, pp. 69–78, 2006.
- [32] I. Okruhlicova, N. Tribulova, M. Milejkova et al., "Gap junction remodelling is involved in the susceptibility of diabetic rats to hypokalemia-induced ventricular fibrillation," *Acta Histochemica*, vol. 104, no. 4, pp. 387–391, 2002.
- [33] B. I. Sasyniuk and C. Mendez, "A mechanism for reentry in canine ventricular tissue," *Circulation Research*, vol. 28, pp. 3–15, 1971.