



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“EVALUACIÓN DE LA PROGRESIÓN DE DAÑO MIOCÁRDICO EN RATAS ASOCIADO A DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA”

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

TMO NATALIA VERÓNICA ASTUDILLO CORRAL

**Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez (PhD)
Codirector de Tesis: Dr. Rienzi Díaz Navarro
Ivo Carrasco Wong (PhD)**

FECHA: DICIEMBRE 2020



**Facultad de Medicina
Escuela de Medicina**

“EVALUACIÓN DE LA PROGRESIÓN DE DAÑO MIOCÁRDICO EN RATAS ASOCIADO A DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA”

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Médicas,
mención en Biología Celular y Molecular**

TMO NATALIA VERÓNICA ASTUDILLO CORRAL

**Director de Tesis: Sebastián San Martín Henríquez (PhD)
Codirector de Tesis: Dr. Rienzi Díaz Navarro
Ivo Carrasco Wong (PhD)**

FECHA: DICIEMBRE 2020



Facultad de Medicina

Escuela de Medicina

Magíster en Ciencias Médicas Mención Biología Celular y Molecular

“EVALUACIÓN DE LA PROGRESIÓN DE DAÑO MIOCÁRDICO EN RATAS ASOCIADO A DIABETES INDUCIDA CON ESTREPTOZOTOCINA”

Este trabajo se realizó bajo la supervisión de Dr. Sebastián Martín Henríquez en el Laboratorio de Ciencias básicas de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso” y ha sido aprobado por los miembros de la Comisión:

Dr. XXXX XXXXX
Presidente Comisión

Dr. XXX XXXXXX
Profesor Informante

Dr. XXXX XXXXXX
Profesor Informante

Dr. XXXX XXXXXX
Director de Tesis

**Viña del Mar, Chile
2020**

DEDICATORIA/AGRADECIMIENTOS.

"La perseverancia no es un valor que nos permite aparentar. Perseverar es la forma que tenemos para demostrar que realmente queremos conseguir aquellos que nos proponemos"- José Moreno López.

Primero, agradecer a mis padres, por ser quienes mi inculcaron una base, y potenciaron a lograr todo lo que me proponga, estando en las buenas y en las malas.

A mi pareja Leonardo, por aguantar todos estos años de estudio, trabajo, sin dar paso atrás de mis locuras y nuevas metas. Por apoyar y ayudar desde un principio hasta el final mis proyectos.

Segundo, mis profesores, Sebastián e Ivo. Su fe y confianza en creer en mí no solo 1 vez, sino luego de 3 proyectos de tesis. Agradecer por nunca bajar la guardia y junto a mí, proponernos nuevas tareas y aprendizajes. Ajustarse a mis tiempos, trabajos, para siempre terminar lo que nos propusimos.

A Juan por compartir sus conocimientos y por su ayuda técnica en la metodología de estudio.

Finalmente, a Dr. Rienzi, por permitirme llevar a cabo la continuación de su tesis de estudio y por su pasión en la investigación.

Sin todos ustedes, no lo hubiese logrado.

ABREVIATURAS

DM	Diabetes mellitus
MCD	Miocardopatía diabética
ENS	Encuesta Nacional en Salud
HbA1c	Hemoglobina glicosilada
ADA	American Diabetes Association
GB	Glicemia basal
SOG	test de sobrecarga oral con glucosa
OMS	Organización mundial de la salud
Tyr	receptor de residuo de tirosina
PIK3	fosfatidilinositol 3-quinasa
InsR	receptor de insulina
STZ	estreptozotocina
ROS (ERO)	especies reactivas de oxígeno
XOD	xantina oxidasa
O ₂	aniones superóxido
AGEs	productos finales de la glicosilación avanzada
IRS1	receptor de insulina 1
IC	insuficiencia cardiaca
AVE	accidente vascular encefálico
IAM	infarto agudo al miocardio
ECV	enfermedades cardiovasculares
HTA	Hipertensión arterial
NHE	actividad del intercambio sodio/hidrogeno
GLUT (1/4)	transportadores de glucosa
ATP	adenosina trifosfato
PKC	proteína kinasa C
PARP-1	polimerasa 1
NFκB	factor nuclear
GADPH	gliceraldehído fosfato deshidrogenasa
MEC	matriz extracelular

PPAR- α	receptores de peroxisoma alfa
TNF- α	Factor de necrosis tumoral alfa
LPF	Lipofuscina
TMZ	Trimetazidine
CTRL	Control

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	13
1. DIABETES.....	13
1.1 <i>Diabetes tipo 1</i>	14
1.2 <i>Diabetes tipo 2</i>	15
1.3 <i>Diabetes gestacional</i>	15
1.4 <i>Páncreas</i>	15
1.4.1 <i>Histología del Páncreas</i>	16
1.4.2 <i>Insulina</i>	16
1.4.3 <i>Resistencia a la Insulina</i>	17
1.4.4 <i>Receptores de Insulina</i>	18
1.4.5 <i>Tratamiento con Insulina</i>	19
2. DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE COMO MODELO DE ESTUDIO.....	20
2.1 <i>Estreptozotocina</i>	21
3. CORAZÓN.....	23
3.1 <i>Histología cardíaca</i>	23
3.2 <i>Hipertrofia y Fibrosis</i>	24
4. MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA.....	26
5. DAÑO CELULAR EN MIOCARDIO ASOCIADO A DIABETES.....	28
5.1 <i>Estrés oxidativo</i>	28
5.2 <i>Glucotoxicidad</i>	28
5.3 <i>Lipotoxicidad</i>	30
5.4 <i>Lipofuscina</i>	32
METODOLOGÍA.....	36
2. INDUCCIÓN DE DIABETES CON ESTREPTOZOTOCINA.....	37
3. MEDICIÓN DE GLICEMIA.....	37
4. MEDICIÓN DE PARAMETROS.....	38
5. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO.....	39
6. MANIPULACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS.....	40
7. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO.....	41
7.1 <i>Cuantificación nuclear para el estudio de Hipertrofia</i>	41
7.2 <i>Cuantificación de colágeno para el estudio de Fibrosis</i>	43
7.3 <i>Cuantificación de depósito de Lipofuscina</i>	45
8. PROCESAMIENTO DE DATOS: ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	47
RESULTADOS.....	49
1. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA.....	49
1.1 <i>Peso</i>	49
1.2 <i>Glicemias</i>	50
1.3 <i>Otros parámetros</i>	50
2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA.....	51

2.1	<i>Hipertrofia</i>	54
2.2	<i>Fibrosis</i>	57
2.3	<i>Lipofuscina</i>	60
DISCUSIÓN		62
CONCLUSIONES		68
ANEXOS		69
1.	ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA-BEA072-16	69
2.	PROTOCOLO DE TINCIÓN HISTOPATOLÓGICO.....	70
BIBLIOGRAFÍA		73

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Histología del páncreas humano.
Figura 2.	Receptor de insulina.
Figura 3.	Mecanismo de la Estreptozotocina.
Figura 4.	Histología cardiaca con tinción de rutina Hematoxilina-eosina.
Figura 5.	Elementos metabólicos y bioquímicos en la MCD de la glucotoxicidad
Figura 6.	Cadena de señalización de la Lipotoxicidad
Figura 7.	Grafico peso promedio de ratas en estudio
Figura 8.	Grafico promedio glicemias de ratas en estudio
Figura 9.	Depósito de colágeno por área estudiada
Figura 10.	Análisis de los depósitos de LPS por área estudiada

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I.	Criterios diagnóstico de diabetes.
Tabla II.	Diseño experimental modelo estudio
Tabla III.	Unidades de administración de insulina de acuerdo a los niveles de glicemia en base a estudio piloto.

ÍNDICE DE IMÁGENES

Imagen 1.	Inducción de sueño.
Imagen 2.	Toma de Medida: peso (gr).
Imagen 3.	Procedimiento quirúrgico mediante una esternotomía

Imagen 4. Molde metálico para seccionamiento transversal de piezas pequeñas.

Imagen 5. Muestras cardíacas seccionadas para análisis morfológico

Imagen 6. Cuantificación nuclear para estudio de Hipertrofia

Imagen 7. Cuantificación depósito de colágeno para estudio de fibrosis.

Imagen 8. Cuantificación depósitos de Lipofuscina.

Imagen 9-11. Análisis microscópicos teñidos con Hematoxilina y eosina (40x): Hallazgos microscópicos

Imagen 12. Corte histológico representativos del estudio de Hipertrofia del tejido cardíaco de ratas del estudio

Imagen 13. Corte histológico representativos del estudio de Fibrosis del tejido cardíaco de ratas en estudio

Imagen 14. Corte histológico representativos del estudio de Lipofuscina del tejido cardíaco de ratas en estudio

RESUMEN

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades más comunes a nivel mundial. La miocardiopatía diabética (MCD) suele presentarse en pacientes con DM tipo 1 y 2, y además se ha observado en modelos murinos de DM, inducidos por estreptozotocina (STZ), sin la preexistencia de una enfermedad coronaria previa. La MCD, se caracteriza por impactar la función del tejido cardíaco como también su estructura, generando hipertrofia y fibrosis.

Lo anterior se describe en los cardiomiocitos como un estado final de una serie de eventos celulares; que derivan, en parte, de una disminución en la captura de los radicales libres en pacientes diabéticos sumado a una reducción en la contractibilidad cardíaca, rigidez del miocardio y alteración en la relajación cardíaca generando la hipertrofia cardiomiocítica, además de depósito de colágeno, conocido como fibrosis intersticial cardíaca. En el caso de la hiperglicemia, sus complicaciones y del estrés oxidativo generan, en conjunto, que la captura de los radicales libres quede disminuida significativamente en pacientes diabéticos.

Basado en lo anterior, la **hipótesis** de este proyecto es que la condición hiperglicémica **genera un daño morfológico en el tejido cardíaco, vinculado a estrés oxidativo, fibrosis e hipertrofia previo a la MCD.**

Para responder a ello, el objetivo general es **determinar la temporalidad y progresión de cambios histológicos cardíacos, hipertrofia y fibrosis, relacionados con la ocurrencia de un estado redox que han sido descritos en diabetes inducida por STZ en ratas.**

Se les inducirá diabetes artificialmente con STZ durante 2, 4, 8 y 12 semanas. En dichos puntos temporales se evaluará histológicamente la presencia y progresión de hipertrofia, fibrosis del miocardio, así como también marcadores de daño celular, específicamente depósitos de lipofuscina en el miocardio.

Palabras claves: *Diabetes mellitus, estreptozotocina, cardiomiocito*

INTRODUCCIÓN

1. DIABETES

La diabetes mellitus (DM) es una de las enfermedades no trasmisibles más comunes en el mundo¹ y representa uno de sus principales problemas sanitarios². Según la Encuesta Nacional de Salud (ENS) 2016-2017, la prevalencia de esta enfermedad en la población chilena es 12,3% del total de la población^{3 4}. La prevalencia mundial de la DM en adultos ha tenido un incremento progresivo y se estima alcanzará un 7,7% para el 2030³ adquiriendo un rango de pandemia

La DM es una enfermedad metabólica crónica caracterizada por hiperglicemia⁴ producto de una disminución en su secreción y/o deficiencia en su acción⁵, hormona producida y secretada por las células β de los islotes Langerhans del páncreas, cuya función es favorecer la incorporación de la glucosa de la sangre al interior de las células, donde es utilizada como fuente de energía⁶. Una falla en la regulación de la insulina, conduce a una alteración en el metabolismo de los carbohidratos, proteínas y lípidos, lo cual aumenta las concentraciones de glucosa en sangre y orina, así como también de lípidos en sangre⁷. Existen múltiples procesos fisiopatológicos involucrados en la aparición de la DM, que varían desde la destrucción autoinmune de las células β del páncreas hasta alteraciones que producen resistencia a la acción de la insulina⁸. La hiperglicemia secundaria puede dañar significativamente los vasos sanguíneos gatillando el desarrollo de enfermedad vascular aterosclerótica, especialmente en la retina (retinopatía diabética), el corazón (enfermedad coronaria), el riñón (nefropatía diabética), las extremidades inferiores (enfermedad vascular periférica), pudiendo también afectar los nervios periféricos (neuropatía diabética)⁹.

Estas complicaciones se asocian a un significativo incremento de la morbilidad y mortalidad a largo plazo¹⁰. La DM se presenta clínicamente con algunos síntomas clásicos, como la polidipsia, polifagia y poliuria¹¹. El diagnóstico precoz de la DM permite el manejo temprano de esta enfermedad reduciendo las complicaciones¹².

La hemoglobina glicosilada (HbA1c) constituye el mejor parámetro de control glicémico,

ya que se correlaciona con la aparición de complicaciones micro y macrovasculares a largo plazo y porque proporciona información sobre el grado de control en los 2-4 meses previos¹³. La prueba de HbA1c es un examen de sangre de seguimiento diagnóstico tanto para el estadio de prediabetes como para la DM2, que mide el nivel promedio de glucosa (azúcar en sangre) durante los últimos 3 meses¹⁴. La American Diabetes Association (ADA), propone criterios que evalúa incluir a la HbA1C como prueba con valor diagnóstico para la DM, en donde se demostraron los correspondientes umbrales de glicemia basal (GB) y de glicemia a las 2h tras un test de sobrecarga oral con glucosa (SOG)¹⁵. Los criterios diagnósticos son los que se observan en la tabla I.

Criterios diagnósticos:
1. HbA1C $\geq 6,5\%$. La prueba debe realizarse en un laboratorio utilizando un método que sea certificado por el NGSP y estandarizado para el ensayo DCCT.
2. Glucosa plasmática en ayunas $\geq 126\text{mg/dl}$ ($7,0\text{mmol/l}$). El ayuno se define como ausencia de ingesta calórica durante por lo menos 8h.
3. Glucosa en plasma $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol/l}$) a las 2h durante un TTOG. La prueba debe realizarse según lo descrito por la OMS, utilizando una carga de glucosa equivalente a 75g de glucosa anhidra disuelta en agua.
4. Síntomas clásicos de hiperglucemia o crisis de hiperglucemia, y glucosa plasmática casual (al azar) $\geq 200\text{mg/dl}$ ($11,1\text{mmol}$).

Tabla I. Criterios diagnóstico de diabetes. Síntomas clásicos: poliuria, polidipsia, adelgazamiento sin motivo aparente. Causal o al azar: en cualquier momento del día. NGSP: National Glycohemoglobin Standardization Program (Programa Nacional para la Normalización de la Glicohemoglobina). DCCT: diabetes control and complications Trial (Control de la diabetes y sus complicaciones). HbA1C: hemoglobina glicosilada.

La Organización mundial de la salud (OMS)¹⁶ describe 3 tipos de diabetes:

1.1 Diabetes tipo 1

Conocida como insulino dependiente o diabetes juvenil, la cual es caracterizada por la producción deficiente de insulina en el organismo, requiriendo inyecciones diarias de insulina para controlar los niveles de hiperglicemia. Es de causa desconocida y actualmente no hay forma de prevenirla, es activada por factores genéticos y

ambientales. Se caracteriza por la destrucción parcial o total de las células β de los islotes de Langerhans, con la consiguiente incapacidad para producir insulina¹⁷. Los síntomas asociados son diuresis, polidipsia, polifagia, pérdida de peso, alteraciones a la vista, cambio de carácter y decaimiento¹⁸.

1.2 Diabetes tipo 2

Conocida como no insulino dependiente o de inicio en etapa adulta. Se produce debido a que el organismo no usa la insulina debidamente, generando una resistencia a ésta. Primero, el páncreas produce insulina adicional para compensar, pero con el tiempo el páncreas no puede producir suficiente insulina para mantener los niveles normales de glucosa en la sangre¹⁹. El riesgo se ve determinado por factores genéticos y metabólicos combinados con la edad avanzada, sobrepeso y obesidad, asociados a una mala alimentación y sedentarismo. Los síntomas pueden ser parecidos a los de la diabetes tipo 1 pero menos intensos como polifagia, polidipsia, cansancio, cambios bruscos de humor, visión borrosa, heridas sin cicatrizar, infecciones frecuentes²⁰.

En el 2010 la cifra de diabéticos tipo 2 ascendió a 225-230 millones, e incluso se espera que afecte a 380 millones para el 2025 y alcance una cifra de 438 millones para el 2030, sobretodo en la población de 45 a 64 años en los países tercermundistas²¹.

1.3 Diabetes gestacional

Trastorno transitorio o permanente que se produce durante el embarazo. Las mujeres con diabetes gestacional y sus recién nacidos tienen un mayor riesgo de padecer ciertas complicaciones en el embarazo y parto, tales como malformaciones fetales y sobrevida corta²². Los síntomas son los clásicos de una diabetes (descritos en la DM tipo 1 y 2)²³.

1.4 Páncreas

El páncreas es una glándula alargada en la que se describe anatómicamente una cabeza, un cuerpo y una cola. El páncreas es un órgano que consta de 2 poblaciones celulares diferentes, endocrinas y exocrinas²⁴.

1.4.1 Histología del Páncreas

Una capa delgada de tejido conjuntivo laxo forma una capsula alrededor de la glándula dividiendo el parénquima en tabiques incompletos en lobulillos mal definidos²⁵. El páncreas exocrino consiste en células acinares que secretan enzimas digestivas como la amilasa, lipasa, proteasa y nucleasas, que se liberan en el conducto pancreático²⁶. Los islotes pancreáticos, la porción de células endocrinas, corresponden aproximadamente el 2% del páncreas. Cada islote está compuesto por 5 tipos de células: células productoras de insulina, células β (65-80%), células productoras de somatostatina, células δ (10%), células PP que contienen y secretan polipeptidos pancreáticos (1%) y las células α que secretan glucagon²⁷ (Figura 1). En los islotes de roedores, las células β se encuentran predominantemente en el centro y con células α y δ en la periferia formando un manto ^{28 29}.

1.4.2 Insulina

La insulina es una hormona pancreática, de 5.8kD, que se compone de 51 aminoácidos. Es liberada por las células β de los islotes de langerhans en respuesta a niveles elevados de nutrientes en sangre, con funciones energéticas como el metabolismo de la glucosa, lípidos y proteínas, promoviendo, además, la división y el crecimiento celular a través de efectos mitogénicos ³⁰.

La insulina se libera en respuesta al aumento de la glicemia, y su principal función es mantener la concentración de glucosa sanguínea en un rango de 80-105 mg/dl³¹. Su acción es mediada por cascadas de señalización intracelular, en las cuales la fosforilación inicial del receptor de residuo de tirosina (Tyr) lleva una serie de eventos de fosforilación-desfosforilación de cinasas de Tyr y serina/treonina (Ser/Thr). Las células β del páncreas son capaces de reconocer el incremento de glucosa y liberar insulina a los 30 segundos, y la insulina se une a transportadores de proteína de la sangre que conduce a macro y micronutrientes a los miocitos, hepatocitos y adipocitos. Las proteínas GLUT1 son los transportadores basales de glucosa que no varían en la superficie celular, en cambio los GLUT4 son transportadores inducibles de glucosa que se desplazan por la superficie celular en respuesta a la insulina³².

Sin embargo, existe la resistencia a la insulina, que se produce cuando existe un aumento de la glucosa en sangre (hiperglicemia), genera la unión del receptor del factor 1 del crecimiento similar a la insulina y a través de vías de la señalización del fosfatidilinositol 3-quinasa (PI3K)³³.

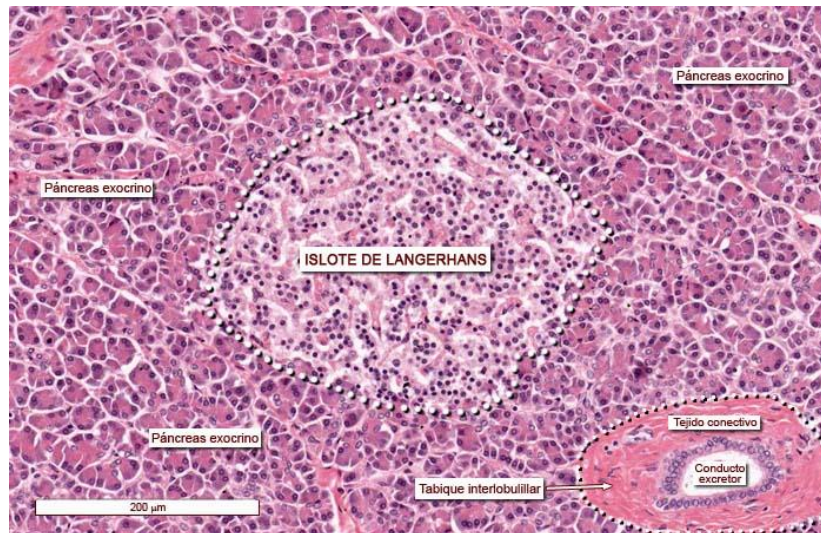


Figura 1. Histología del páncreas humano. Porción endocrina representada por el islote de langerhans, y la exocrina a su alrededor representada por las células acinares, tejido conectivo y conducto excretor ³⁴ [Atlas de Histología, Universidad de Zaragoza].

1.4.3 Resistencia a la Insulina

La resistencia a la insulina, se define como la incapacidad de las células en responder a la señalización de la insulina. Esto se produce por múltiples anomalías en respuesta a la señalización como: reducción del nivel de expresión de receptores de insulina, disfunción de las células β del páncreas causados por estados metabólicos como la glucotoxicidad y lipotoxicidad, entre otras³⁵.

Desafortunadamente, mucha de la información recopilada proviene de estudios en animales y no se ha confirmado en humanos. Algunos discuten si verdaderamente hay resistencia a la insulina a nivel cardíaco en los pacientes con diabetes^{36 37}. Es por ello la importancia de seguir realizando estudios que lleven a antecedentes más concretos de

lo que ocurre en el organismo para extrapolar dicha información al conocimiento humano.

1.4.4 Receptores de Insulina

Los receptores de insulina se encuentran principalmente en dos órganos, como son el tejido adiposo y muscular. Como describe Rincon et al³⁸ la acción de los receptores de insulina (Figura 2), se inicia mediante acoplamiento al receptor de insulina (InsR), proteína transmembrana heterotetramérica compuesta por 4 subunidades, 2 extracelular α , y 2 β transmembranales. Posteriormente ocurren fosforilaciones y desfosforilación de sustratos intracelulares de muchas acciones metabólicas.

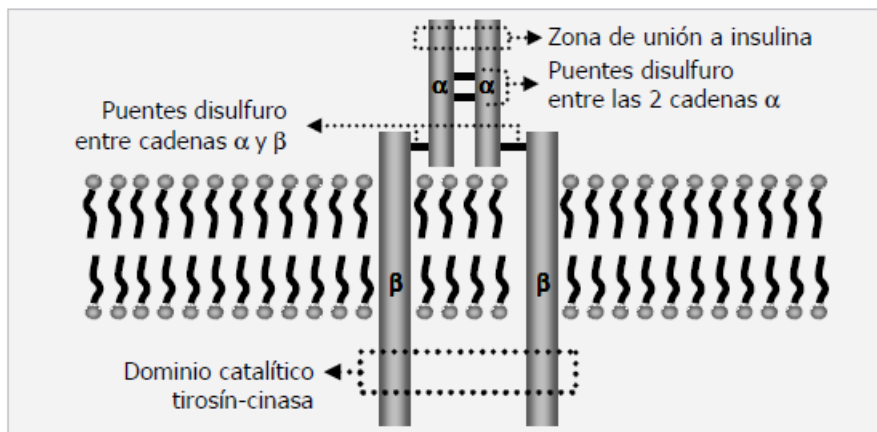


Figura 2. Receptor de insulina. Proteína tetramérica: 2 subunidades α y 2 subunidades β transmembrana que al activarse poseen actividad tirosin-cinasa³⁹ [Bases moleculares de la diabetes mellitus, capítulo 22, Biología molecular, Fundamentos y aplicaciones en ciencias de la salud].

Las subunidades β , son las subunidades catalíticas, y las α las regulatorias que las mantienen inhibidas. Cuando la insulina se une a la cadena α , la β inhibitoria se pierde ejerciendo su actividad catalítica tirosin cinasa^{40 41}. La subunidad β , también posee residuos de serina y treonina que se pueden fosforilar disminuyendo la actividad tirosin-cinasa, ejerciendo una acción regulatoria negativa sobre la respuesta a la insulina⁴². Como menciona Riehle et al⁴³, el receptor de insulina una vez activado interactúa con las proteínas IRS y otras proteínas de unión para activar señales intracelulares que

incluyen a PI3K/Akt y MAP quinasas como ERK^{44 45}. IRS1 e IRS2 son las 2 isoformas más abundantes en el tejido cardiaco y son necesarias para la activación de PI3K mediadas por la insulina. PI3K posee una subunidad catalítica, p110, y una subunidad reguladora, p85 que catalizaran a fosfatidilinositol-tri fosfato (PIP3). Esto da como resultado la activación de quinasa Akt. Akt 1 y Akt 2 son las isoformas más abundantes en el corazón. En el caso de Akt 2, es necesaria para la captación y metabolismo de glucosa independiente de Akt 1⁴⁶.

Tras la ingesta de alimentos, los valores de glicemia se mantienen en los límites normales por tres mecanismos que se realizan de forma coordinada: 1) el estímulo de la secreción de insulina, 2) la supresión de la producción hepática de glucosa por la insulina y 3) la estimulación de la captación de glucosa por los tejidos periféricos (fundamentalmente el muscular)⁴⁷. La hiperglicemia está producida tanto por una disminución de la captación muscular como por un aumento de la producción hepática de glucosa. Por lo tanto, los fármacos mejoraran la sensibilidad muscular a la insulina disminuyendo la hiperglicemia generada. Los tratamientos de primera línea ampliamente prescritos para las complicaciones diabéticas proporcionan sólo alivio paliativo, pero no cura definitiva. Por lo tanto, una estrategia eficaz para revertir las complicaciones a largo plazo en estos pacientes necesita una investigación urgente.

1.4.5 Tratamiento con Insulina

Si bien en etapas tempranas de hiperglicemia se tratan a los pacientes con fármacos, como la metformina, que actúa como sensibilizador a la insulina y reduce la hiperinsulinemia ofreciendo cierto grado de protección a la insuficiencia cardiaca⁴⁸; la gran mayoría de ellos terminan con inyecciones de insulina o una combinación de ambos. Los distintos tratamientos farmacológicos inciden más o menos específicamente en algunas de estas alteraciones. Aunque no son absolutamente independientes unas de otras, pueden ser causados por: 1. Resistencia a la insulina: defectos en la sensibilidad del tejido muscular y del hígado a la insulina; 2. Defectos de secreción de insulina: falta del pico de secreción temprana y déficit de secreción global de insulina.

2. DIABETES INDUCIDA EXPERIMENTALMENTE COMO MODELO DE ESTUDIO

Una alternativa al estudio de la diabetes para reproducir las manifestaciones clínicas de un modelo diabetogénico humano, es mediante el uso de modelos experimentales, provocando o generando una inducción artificial de la diabetes como lo son los cultivos⁴⁹ y el uso de animales^{50 51}. Para que un modelo animal tenga trascendencia en la investigación de la diabetes, debe reflejar la fisiopatología y un proceso natural de la diabetes o bien desarrollar complicaciones propias de la enfermedad con una etiología similar a la condición del humano. En este caso, la investigación con modelos animales desempeña un papel esencial en el estudio de la diabetes, no sólo porque aumenta nuestro conocimiento acerca de sus posibles causas, sino también porque proporciona una herramienta con la que se puedan identificar y evaluar diferentes estrategias terapéuticas.

Dependiendo del método utilizado para inducir la diabetes, estos se pueden clasificar en: 1) inducción química; 2) inducción espontánea o derivada genéticamente; e 3) inducción a través de la dieta⁵².

El uso de agentes químicos para generar un modelo de diabetes, permite realizar estudios detallados de los eventos bioquímicos y morfológicos, de lo que ocurre durante y después de la inducción de un estado diabético⁵³. El *primer grupo*, son sustancias citotóxicas específicas que destruyen las células β del páncreas causando un estado de deficiencia primaria de insulina; el *segundo grupo*, son agentes que actúan sobre las células β pero no las destruyen; el *tercero grupo*, incrementa los requerimientos endógenos de insulina, debilitando al páncreas y como consecuencia generan la diabetes, ejemplo de este grupo son; hormonas antagonistas de la insulina, anticuerpos anti-insulina y algunos agentes quelantes (como el zinc). Los agentes más utilizados son la aloxano y la estreptozotocina (STZ), agentes pertenecientes al primer grupo, los cuales actúan específicamente sobre las células β del páncreas^{54 55}. En estudios previos⁵⁶, se ha observado que la DM inducida por SZ causa un deterioro de la función cardíaca sin modificar la estructura del corazón, corroborando así que es un agente específico de las células β y no de otras células del organismo. La SZ es el agente preferido para la inducción de diabetes experimental ya que presenta ciertas ventajas

sobre el aloxano como, mayor vida media, hiperglicemia sostenida en el tiempo con menor incidencia de cetosis y mortalidad, manteniendo las complicaciones derivadas de la diabetes⁵⁷.

2.1 Estreptozotocina.

La Estreptozotocina (STZ), 2-deoxy-2-(3-(methyl-3-nitrosoureido)-D-glucoopyranoase), es un fármaco derivado de un hongo, *Streptomyces achromogenes*, que tiene un efecto citotóxico en los islotes pancreáticos⁵⁸. La SZ es un donante de óxido nítrico (ON) el cual no provoca la destrucción de los islotes pancreáticos, pero si al daño citotóxico del DNA⁵⁹. Las células β afectadas por la STZ, manifiestan una mayor actividad de la guanilil ciclasa y una mayor formación de cGMP⁶⁰. El ON se libera cuando la STZ es metabolizada dentro de las células a través de la oxido sintasa⁶¹. El ON, no es la única molécula involucrada en el efecto citotóxico, sino también otras especies reactivas de oxígeno (ROS) que también contribuyen a la fragmentación del DNA^{62 63} como aniones superóxido (O_2^-) y la actividad de la xantina oxidasa (XOD)⁶⁴. Se demostró que la STZ disminuye el consumo de oxígeno de las mitocondrias afectando la producción de ATP mitocondrial y la disminución de este nucleótido en las células β ⁶⁵. La desfosforilación aumentada de ATP aumenta el suministro de sustrato para XOD y aumenta la producción de ácido úrico, el producto final de la degradación de ATP⁶⁶. Como resultado de la generación de aniones superóxido formados por la catalización de XOD, se forma peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilos^{67 68} (Figura 3).

La STZ es absorbida por las células β a través del transportador de glucosa GLUT2⁶⁹. Wang y Gleichman⁷⁰, observaron que la STZ restringe la expresión del transportador GLUT2 *in vivo* e *in vitro* cuando se administran dosis múltiples de STZ⁷¹. La acción que genera la STZ sobre las células β del páncreas es cambios en su DNA para su posterior fragmentación^{72 73} debido a la alquilación del DNA^{74 75}. Su poder como agente alquilante interfiere en el transporte de glucosa, en la función de la glucocinasa y en la inducción de la actividad poli-ADP-ribosa, enzima que disminuye el contenido NAD en células β , disminuyendo la energía y, por consiguiente, provocando la muerte celular⁷⁶, ya que puede disminuir tanto su síntesis como incrementar su hidrólisis⁷⁷. Se ha visto, que su actividad alquilante genera diferentes purinas metiladas en tejidos animales⁷⁸. Un

estudio de West et al⁷⁹, sobre las células β de páncreas tras 24 horas post inyección de STZ, probaron que, la glucosa en sangre se encontraba aumentada, asociada con niveles bajos de insulina plasmática después de dos horas, seguida de hipoglicemia asociada con niveles altos de insulina plasmática después de seis horas; posteriormente, se desarrolló progresivamente hiperglicemia y esto se asoció con niveles decrecientes de insulina plasmática. Un sondeo adicional reveló que dos horas después de la inyección de STZ, las células β no podían responder a una carga de glucosa oral mientras que, seis horas después, hubo un aparente retorno de la respuesta de las células β , pero posteriormente la respuesta fue progresivamente perdida, confirmándose por el examen histológico un daño celular irreversible.

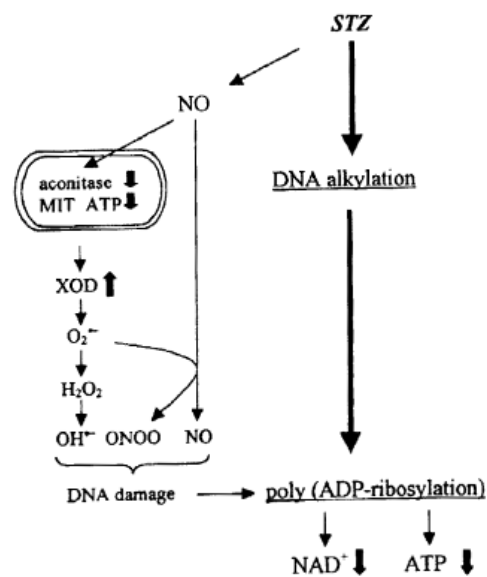


Figura 3. Mecanismo de la Estreptozotocina. Eventos citotóxicos en las células β del páncreas con la liberación del ON y fragmentación del DNA disminuyendo el ATP y NAD. MIT: mitocondria. XOD: xanthine oxidase [Mecanismo de acción del Alozano y Estreptozotocina en células beta del páncreas de ratas, Minireview, T.Szkudelski]⁸⁰.

El rango de la dosis utilizada de STZ para inducir la diabetes oscila entre 40 a 60 mg/KG⁸¹ ya sea vía intravenosa o intraperitoneal⁸². En la mayoría de modelos hay una diferencia significativa entre machos y hembras en relación a la incidencia, evolución y severidad del SD diabético⁸³. En las ratas macho se presenta en una proporción mayor que las hembras, debido a la resistencia de éstas, al parecer, con la presencia de hormonas

esteroidales como el estrógeno⁸⁴.

3. CORAZÓN

El corazón es una bomba muscular que mantiene el flujo unidireccional de la sangre. Anatómicamente está compuesto por 4 cavidades, 2 aurículas y 2 ventrículos separados por válvulas cardíacas⁸⁵.

3.1 Histología cardíaca

La pared del musculo está compuesta por músculo estriado cardíaco, y está compuesta por 3 capas: *epicardio*, formado por una capa de células mesoteliales y tejido conjuntivo subyacente; *miocardio*, músculo cardíaco de las 2 cavidades bombeadoras; y el *endocardio*, que consiste en una capa interna del endotelio con tejido conjuntivo subendotelial, una capa media de tejido conjuntivo más células musculares lisas, y una externa de tejido conjuntivo del miocardio⁸⁶ (Figura 4).

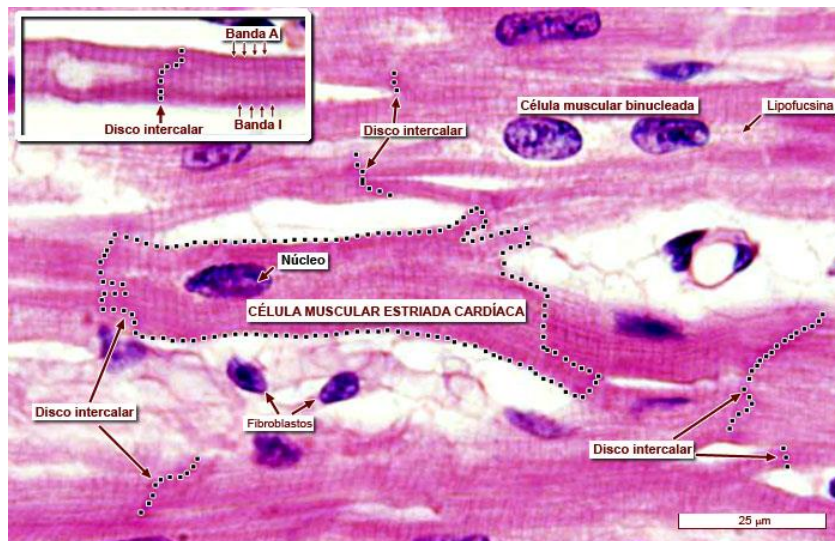


Figura 4. Histología cardíaca con tinción de rutina Hematoxilina-eosina. Flechas apuntan a los discos intercalares o estriaciones del músculo cardíaco; en el cuadro se puede observar las bandas A e I del citoplasma del miocito junto con un disco intercalar; y delimitado por puntos, miocito completo con su núcleo central [Atlas de Histología, Universidad de Zaragoza].

La hiperglicemia crónica genera dos principales consecuencias a nivel estructural en el corazón, la hipertrofia cardíaca y la fibrosis miocárdica, las cuales pueden terminar en una insuficiencia cardíaca.

3.2 Hipertrofia y Fibrosis

Se cree que la hiperglicemia y la resistencia a la insulina inducen a cambios en el miocardio⁸⁷. Uno de estos cambios es la hipertrofia, definida como el aumento de grosor de la pared y/o del septo interventricular⁸⁸. Morfológicamente, la célula presenta un aumento de tamaño, con un aumento de la síntesis proteínica y un cambio en la organización del sarcómero⁸⁹. La hipertrofia es causada por la disfunción diastólica, que es una manifestación previa a la MCD y está presente en un 40-75% de los pacientes con DM⁹⁰. Estudios imagenológicos demostraron que la hipertrofia del ventrículo derecho, es causada por la resistencia a la insulina y por la hiperinsulinemia, como una importante característica del corazón diabético⁹¹.

Un estatus metabólico alterado caracterizado, entonces, por hiperglicemia y aumento de los ácidos grasos libres podría generar un fenómeno de remodelación similar al que produce la activación neurohormonal, con alteraciones a nivel de las proteínas estructurales y enzimáticas, hipertrofia, reducción de la función contráctil, disminución del almacenamiento de energía y alteración en el transporte de los iones calcio⁹². En la génesis de la insuficiencia cardíaca en el paciente diabético también intervienen la disminución de la sensibilidad barorrefleja, lo cual se traduce en un incremento de la actividad simpática, la disfunción endotelial que genera hipertensión arterial, aterosclerosis y alteración de la microcirculación, y otras consecuencias ligadas a la resistencia a la insulina, como el incremento del colágeno y fibrosis, el aumento en el número de receptores AT1 con incremento de la actividad del sistema-renina-angiotensina y del factor de necrosis tumoral⁹³. La hiperglicemia produce productos finales de glicosilación avanzada que causan enlaces cruzados entre las moléculas de colágeno, aumentando la fibrosis y por ende una mayor rigidez miocárdica y relajación cardíaca alterada⁹⁴. La hiperglicemia contribuye a la activación del sistema renina-angiotensina-aldosterona (RAAS), lo que lleva a una sobreproducción de angiotensina II

y de aldosterona, induciendo así la hipertrofia cardiaca y fibrosis, exacerbando la disfunción diastólica⁹⁵.

En las primeras etapas, la *hipertrofia cardiaca* produce un engrosamiento en la pared del miocardio, manteniendo la contracción cardiaca y una reducción del estrés miocárdico; como mecanismo compensatorio. Sin embargo, en situaciones patológicas prolongadas, la hipertrofia cardiaca se acompaña de fibrosis intersticial, disfunción contráctil, expresión génica alterada, cambio en el metabolismo energético y propiedades electrofisiológicas anormales que eventualmente conducen a insuficiencia cardiaca excesiva⁹⁶. La hipertrofia generada en el ventrículo, es el resultado de la resistencia a la hiperinsulinemia por medio del factor 1 del crecimiento similar a la insulina a través de vías de señalización del PI3K⁹⁷. La hiperinsulinemia conduce a la activación del sustrato del receptor de insulina 1 (IRS1) y Akt 1 para promover la hipertrofia patológica, la disfunción mitocondrial y la disminución de la autofagia que contribuyen a la remodelación del ventrículo izquierdo.

Con respecto a la *fibrosis miocárdica*, el aumento del depósito de colágeno en el miocardio, es debido a la activación de AGEs (productos finales de la glicosilación avanzada) que resultan de la oxidación de proteínas y lípidos. Los AGEs se depositan en el miocardio, células endoteliales y las paredes arteriales ocasionando una remodelación, es decir, un engrosamiento de la membrana basal capilar y la formación de microaneurismas que conducen a un deterioro en la producción de óxido nítrico⁹⁸. También generan activación de la vía del factor de crecimiento transformante β 1, lo cual produce una alteración en la degradación de la matriz extracelular, con la subsecuente participación de citoquinas inflamatorias, factor de crecimiento del tejido conectivo, metaloproteinasas y galectina-3. La distribución de tejido fibroso en el miocardio es intersticial y perivascular, el colágeno tipo I y III predomina en las regiones epicárdica y peri vasculares, mientras que el tipo IV predomina en el endocardio⁹⁹. Todo esto tiene como consecuencia reducción en la contractibilidad cardiaca, generando una rigidez del miocardio y alteración en la relajación cardiaca produciendo disfunción diastólica¹⁰⁰, la cual genera un incremento en la rigidez de la pared ventricular o incremento del tiempo en la relajación diastólica¹⁰¹.

Las complicaciones multisistémicas, micro vasculares (retinopatía, nefropatía y neuropatía), y macrovasculares (infarto agudo al miocardio, enfermedad coronaria aterosclerótica, entre otras¹⁰²), que produce la diabetes, llevan a la existencia de lo que se conoce como Miocardiopatía diabética (MCD)¹⁰³. El aumento de la fibrosis perivascular e intermiofibrilar se ha observado tanto en humanos¹⁰⁴ como en modelos animales con DM inducida por SZ¹⁰⁵, lo que lleva a la activación de vías de inflamación conduciendo a un aumento de la fibrosis en los ratones con MCD.

4. MIOCARDIOPATÍA DIABÉTICA

Son cambios estructurales y funcionales en el miocardio que se asocian a diabetes en la ausencia de una enfermedad isquémica del corazón, hipertensión u otra patología cardíaca^{106 107}. Rubler y cols.¹⁰⁸, en 1972, hallaron una entidad diferenciada, capaz de producir disfunción ventricular izquierda, después de realizar un estudio postmortem en 4 pacientes con nefropatía diabética que presentaban insuficiencia cardíaca (IC) sin signos de una enfermedad aterosclerótica (EC) ni otras enfermedades capaces de provocar disfunción ventricular. La autopsia mostró *lesiones de Kimmelstein-Wilson* o glomerulosclerosis nodular renal, así como hipertrofia y fibrosis miocárdica. Ello indujo a pensar que la diabetes *per se* es capaz de afectar la función ventricular izquierda, introduciéndose en la literatura médica el término de MCD¹⁰⁹.

En la población general, el paciente diabético presenta un riesgo de 2 y 5 veces mayor de accidente vascular encefálico (AVE) y entre 2 a 3 veces mayor de infarto agudo al miocardio (IAM)¹¹⁰. La cardiomiopatía diabética genera insuficiencia cardíaca por lo cual es todo un reto establecer un diagnóstico adecuado, por lo cual existen métodos diagnósticos específicos, principalmente ecocardiográficos. En la fase temprana de la enfermedad, los cambios patológicos pueden ser reversibles con un control metabólico estricto, pero a mayor tiempo, los cambios en el miocardio se vuelven irreversibles y aumenta el riesgo de desarrollar falla cardíaca¹¹¹.

En Chile las enfermedades cardiovasculares (ECV) representan un tercio de la mortalidad total en la población adulta y son además una de las principales causas de morbilidad¹¹². Se estima que más de 50% de los problemas que originan las ECV podrían evitarse si se

logra reducir la incidencia a través de la prevención de sus factores de riesgo¹¹³. El estudio de Framingham ha contribuido a la identificación de los factores de riesgo de enfermedades isquémicas del corazón y otras ECV^{114 115}; tales como: diabetes, hipertensión arterial (HTA), dislipidemia, tabaquismo, el sexo masculino y edad^{116 117}. Como producto del análisis del estudio, se han publicado modelos que permiten, a los clínicos, la estimación de la probabilidad de que un individuo desarrolle un acontecimiento coronario.

Algunos estudios cardiológicos evidencian que la diabetes y las enfermedades coronarias están estrechamente relacionadas, y que solo el 40% de los que la padecen tienen un metabolismo de la glucosa completamente normal¹¹⁸. El gran riesgo de la enfermedad coronaria es que se presenta asintomática hasta que aparece su primera manifestación clínica, que incluso puede ser un infarto cardíaco¹¹⁹. Para que el corazón tenga un correcto funcionamiento, depende estrechamente de la energía oxidativa generada en las mitocondrias, principalmente a partir de la beta oxidación de los ácidos grasos, de la cadena respiratoria de electrones y de la fosforilación oxidativa¹²⁰.

Cuando la extensión del daño oxidativo sobrepasa la capacidad de la reparación de las células, altos niveles de peróxidos de lípidos inducen el daño en cardiomiocitos; el cuál se propone, favorecería el desarrollo de MCD¹²¹. Evidencias iniciales han sido obtenidas en animales y han sido confirmadas en humanos. Así lo indica *Sharma et al.*¹²² quienes realizaron estudios de la acumulación de lípidos intramiocárdica tanto en animales, un grupo control y otro diabético; como en humanos con insuficiencia cardíaca no isquémica. Concluyeron que el 30% de los corazones humanos tenían altos depósitos de lípidos intramiocardio y en el caso de ratas diabéticas, en comparación a las ratas control, tenían depósito de lípidos. En las ratas diabéticas, el depósito de lípidos contribuye a una acumulación de triglicéridos y a una disfunción contráctil.

La actividad del intercambio sodio/hidrogeno (NHE) cardíaco aumenta en modelos experimentales de insuficiencia cardíaca y aumenta la concentración de sodio en los cardiomiocitos, lo que daría como resultado un aumento del calcio intracelular y de la lesión cardiomiocítica y al desarrollo de la MCD¹²³.

5. DAÑO CELULAR EN MIOCARDIO ASOCIADO A DIABETES.

5.1 Estrés oxidativo

El estrés oxidativo se produce por un desbalance entre la producción de ERO y las defensas antioxidantes, a favor de la generación de especies oxidadas, conllevando a un daño potencial del tejido involucrado^{124 125}. Es por ello que la estrecha relación entre la hiperglicemia y el estrés oxidativo es demostrada por la determinación total de la captura de radicales en pacientes diabéticos con una disminución significativa de estos indicadores.

5.2 Glucotoxicidad

La llamada glucotoxicidad se produce por la disminución en la utilización y la oxidación de glucosa, junto a una disminución en la expresión de los receptores de los transportadores de glucosa (GLUT) principalmente los de tipo 1 (GLUT1) y 4 (GLUT4) a nivel miocárdico, lo cual genera un cambio en la producción de energía a partir de la beta oxidación de los ácidos grasos libres¹²⁶. Esta disminución en el consumo de glucosa, por parte de los cardiomiocitos, disminuye la síntesis de piruvato atenuando su oxidación por la inhibición de piruvato deshidrogenasa, glucoquinasa y la fosfofructosaquinasa-1 y por ende, genera una disminución de la glicolisis¹²⁷.

Debido a lo anterior, la actividad glucolítica se encuentra reducida en el corazón diabético y, por ende, conduce a la acumulación de intermediarios a partir del catabolismo de la glucosa, que pueden participar en varias vías que no conllevan a la producción de adenosina trifosfato (ATP)¹²⁸. La activación de vías alternativas en el metabolismo de la glucosa, como la 1) vía del poliol (surge de la oxidación de la glucosa 6 fosfato) la cual está asociada con las formación de especies reactivas de oxígeno (ERO); 2) vía de la hexosamina (surge de la oxidación de la fructosa 6 fosfato) asociada con la formación de O-GlcNAc el cual genera afectación miocárdica con alteraciones en el metabolismo del calcio lo cual produce deficiencia en la contractibilidad del ventrículo izquierdo; 3) vía del gliceraldehído 3 fosfato, el cual genera un aumento en la PKC (proteína kinasa C), en los niveles del metabolito metilgloxal y en los productos finales de la glicosilación

avanzada y del factor nuclear (NFkB)¹²⁹.

El aumento de ERO generará daño en el DNA celular lo cual activa la poli (ribosa ADP), polimerasa 1 (PARP-1) ya que actúa como una enzima reparativa e inhibe además a la enzima gliceraldehído fosfato deshidrogenasa (GADPH) desviando la glucosa del catabolismo y la induce a tomar otras vías como las bioquímicas, también el PARP, promoviendo el daño cardiaco por activación del NFkB que induce la sobreexpresión de vasoconstricción por endotelina-1 y sus receptores¹³⁰ (Figura 5).

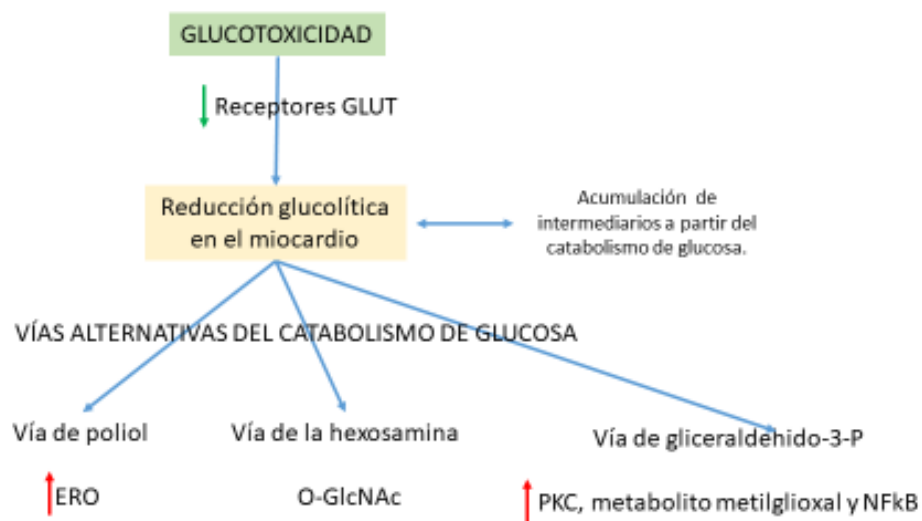


Figura 5. Elementos metabólicos y bioquímicos en la MCD de la glucotoxicidad a través de vías alterativas del catabolismo de la glucosa como 1) vía de poliol, 2) vía de la hexosamina, y 3) vía del gliceraldehído [Elaboración del Autor].

La mitocondria es la principal fuente en la generación de ERO en los cardiomiocitos, debido a la exposición de hiperglicemia crónica causando estrés oxidativo por diabetes mellitus¹³¹, lo cual afecta la función celular y endotelial, generando también daños en el ADN celular llevando al cardiomiocito a la apoptosis¹³². La hiperglicemia aumenta la acumulación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGE) aumentando la glicosilación no enzimática, la oxidación de lípidos y proteínas, la producción de colágeno

y fibronectina del miocardio, aumento del tejido conectivo y rigidez cardiaca produciendo alteraciones estructurales del miocardio y alteración en la función diastólica^{133 134}.

Los productos finales de la glicosilación pueden unirse a su receptor en la superficie celular para inducir una respuesta inflamatoria lo cual genera cambios adaptativos tanto estructurales como energéticos, también aumenta la producción de las proteínas de la matriz extracelular (MEC)^{135 136}. Esta producción de AGEs genera mayor producción de ERO y del factor de crecimiento transformante beta la cual es una vía alternativa de mayor producción de tejido conectivo y fibrosis miocárdica¹³⁷.

La disfunción endotelial, el incremento de la permeabilidad vascular, alteración en la angiogénesis y el incremento de la apoptosis también producen activación de la PKC¹³⁸, la cual es responsable de alteraciones que llevan al aumento en la permeabilidad celular, inflamación, angiogénesis, crecimiento celular, aumento de la matriz extracelular¹³⁹. La PKC también genera como consecuencia ERO afectando la biodisponibilidad del ON y también disminuyendo su actividad¹⁴⁰.

Un estudio¹⁴¹ sobre la apoptosis del cardiomiocito como un posible contribuyente del desarrollo de la cardiomiopatía y el uso de agonistas como PPAR-alfa y gama, concluyo que los corazones diabéticos desarrollan ácidos grasos en altos niveles como resultado de una acumulación de lípidos, lo que predispone a los miocitos a morir, así como disfunción contráctil por un efecto lipotóxico. Estos mecanismos, de la lesión miocárdica, incluyen un aumento del estrés oxidativo, lipotoxicidad, apoptosis y alteraciones en la señalización celular¹⁴².

5.3 Lipotoxicidad

La lipotoxicidad es generada por el aumento en la producción y disponibilidad de los AGEs por medio de la oxidación que realizan las células miocárdicas generando un desequilibrio por una mayor producción más que oxidación y como producto final intermediarios lipotóxicos¹⁴³. Entre estos intermediarios (figura 6) se encuentran ceramidas y el diacilglicerol, que generan ERO, que a su vez producen estrés oxidativo y finalmente la apoptosis de las células miocárdicas, en donde, por otra parte, también promueven el desacoplamiento mitocondrial de la cadena transportadores de protones¹⁴⁴

e incremento del oxígeno disminuyendo así la eficiencia miocárdica¹⁴⁵. El diacilglicerol afecta el metabolismo de glucosa a través de PKC, disminuyendo la señalización de insulina y la producción de ON. Por otra parte, las ceramidas activan a PKC e inhibe la señalización de Akt, la cual atenúa la translocación del receptor GLUT4 y el consumo de glucosa estimulada por la insulina¹⁴⁶. Las proteínas unidas a los ácidos grasos generan una serie de eventos que llevarán a la hipertrofia del ventrículo izquierdo, disfunción diastólica y aumento de la expresión de los péptidos natriuréticos tipo B¹⁴⁷. La mitocondria utiliza estos sustratos para generar ATP que pueden ser almacenados y estimular a los receptores de peroxisoma alfa (PPAR- α) el cual promueve la transcripción de genes que codifican proteínas para la utilización de ácidos grasos libres¹⁴⁸. Elevados niveles de PPAR-alfa son expresados por el corazón y pueden afectar directamente la oxidación de ácidos grasos libres a nivel de la mitocondria, llevando a una sobreexpresión en los cardiomiocitos y por ende una disminución en la captación de calcio llevando a los eventos mencionados anteriormente¹⁴⁹.

*Sharma et al.*¹⁵⁰ demostraron previamente que la reactivación de PPAR- α en la hipertrofia por hipertensión arterial da como resultado una disfunción contráctil¹⁵¹. Ratones modificados genéticamente que sobre expresan PPAR- α desarrollan una disfunción contráctil cuando se exponen a altos niveles de ácidos grasos en el suero¹⁵².

El factor de necrosis tumoral (TNF- α) puede causar disfunción contractil directamente en el corazón y se ha relacionado con la remodelación patológica llevando a una insuficiencia cardíaca¹⁵³. El exceso de lípidos acumulados dentro de los cardiomiocitos, puede producir intermediarios tóxicos e inducir la muerte^{154 155 156}. En resumen, la lipotoxicidad cardíaca, se refiere, a un metabolismo alterado de los ácidos grasos, sobrecarga de lípidos intramiocárdicos y disfunción en la contractibilidad¹⁵⁷.



Figura 6. Cadena de señalización de la Lipotoxicidad producto del aumento de AGEs e intermediarios involucrados como las ceramidas y el diacilglicerol [Elaboración del Autor].

5.4 Lipofuscina

La lipofuscina (LPF), es un agregado intracelular de proteínas, lípidos y metales altamente oxidados^{158 159}. Como describe Hohn et al¹⁶⁰ y Rattan et al¹⁶¹, la formación de lipofuscina tiene lugar en una variedad de respuestas fisiopatológicas como el estrés oxidativo y el envejecimiento, caracterizados por un desequilibrio progresivo entre el daño y eliminación de proteínas, con acumulación de agregados de proteínas oxidadas y posteriormente, de material reticulado como la lipofuscina y lipopigmentos que afectan la viabilidad celular. Los autores describen a la lipofuscina y a compuestos similares a la lipofuscina como agregados de materiales celulares no degradados como resultado de los procesos de fagocitosis y autofagia, acumulándose como gránulos endocitoplasmáticos en condiciones fisiológicas y patológicas¹⁶². Es autofluorescente y

se convierte en una fuente de producción de LFP en los lisosomas. La presencia de ésta se utiliza como indicador de daño oxidativo. Del Roso *et al.* observaron grandes cantidades de acumulo de LFP en el corazón de rata en periodos más antiguos del desarrollo postnatal¹⁶³.

Además de ser una poderosa fuente de oxidantes, también se ha demostrado que la LFP incorpora hierro de una manera redox activa e induce la apoptosis, que parece estar estrechamente relacionado con la concentración de hierro presente en la lipofuscina¹⁶⁴. La acumulación de LFP se incrementa en estados de estrés oxidativo^{165 166}, y las ERO producidas por un daño en la mitocondria también contribuyen a la formación de lipofuscina^{167, 168}. Es probable, que su acumulación también ocurra durante la MCD; aunque, aún no existen reportes previos evaluándolo.

Una de las técnicas histoquímicas que permite su identificación es la técnica de PAS¹⁶⁹, en donde la presencia de LFP se correlaciona con los niveles de insulina presentes en el plasma y con las concentraciones de lípidos, en donde además, estos 2 índices, la presencia de LFP y las concentraciones de lípidos pudiesen ser útiles a la hora de actuar como indicadores de estrés oxidativo en los cardiomiocitos¹⁷⁰. La producción de ROS influye en el estado redox celular, y es decisivo para la formación de LFP¹⁷¹. Marzadavi *et al*¹⁷², observaron 2 situaciones, una en donde una alta acumulación de LFP en corazones de rata durante periodos tardíos del desarrollo postnatal, y la otra en donde habían altos niveles de LFP en ratas recién destetadas comparadas con las de 19 meses (desarrollo postnatal). Basado en lo anterior, es posible proponer que la presencia y niveles de LFP son inconsistentes¹⁷³ en la etapa en donde se acumulan más.

Existe controversia en diferentes estudios en cuando se comienzan a visualizar morfológicamente los cambios producidos por la diabetes. Krog *et al*¹⁷⁴. realizaron un estudio en donde evaluaron las lesiones del miocardio en primates con diabetes espontánea. Concluyeron que la fibrosis, la infiltración de la grasa y la hipertrofia no fueron diferentes entre el grupo control y los diabéticos. Zhao *et al*¹⁷⁵, por otra parte, postularon a que la Trimetazidine (TMZ) reduce el estrés oxidativo para mejorar la hiperglicemia que induce la fibrosis cardiaca en ratas diabéticas inducidas por STZ. Concluyeron que luego de 16 semanas de hiperglicemia, se generaron cambios

significativos en la estructura cardiaca y en la capacidad de ejercicio, y subsecuentemente la TMZ mejora la fibrosis y función diastólica.

Dentro de hallazgos histológicos, Krog et al. demostraron que la granulación PAS positivo de los cardiomiocitos, vinculado al acúmulo de Lipofuscina, se correlacionó con las concentraciones plasmáticas de insulina y lípidos, lo que lleva que esté relacionada con el estrés oxidativo; por lo tanto, concentraciones altas de lípidos plasmáticos pueden ser indicadores de estrés metabólico.

Los estudios post mortem en humanos, a menudo son de pacientes con una diabetes prolongada en donde los estudios morfológicos a priori son casi inexistentes. Por ello la importancia de estudios, en modelos animales, que generan una expectativa de los que ocurre en humanos y la importancia de la temporalidad en que estos ocurre.

En estudios anteriores, como el de Zhao et al¹⁷⁶, demostraron que, a las 16 semanas de hiperglicemia, había cambios significativos en la estructura cardiaca, función cardiaca y capacidad aeróbica. Krog et al¹⁷⁷, realizaron un estudio en donde la fibrosis y la hipertrofia, entre otras características, no tuvieron diferencias en animales diabéticos versus no diabéticos en 1 año de estudio.

Basado en lo anterior y dada la amplia información sobre estudios diabetogénicos en animales inducidos por STZ, nos propusimos hacer un análisis detallado de los primeros cambios estructurales que pueden manifestarse a una etapa temprana de la enfermedad para evidenciar las consecuencias de estados hiperglicémicos controlados por insulina. La miocardiopatía diabética, se caracteriza por impactar la función del tejido cardiaco como también su estructura morfológica.

HIPÓTESIS

La **hipótesis** de éste proyecto es que la condición hiperglicémica **genera un daño morfológico en el tejido cardíaco, vinculado a estrés oxidativo, fibrosis e hipertrofia, previo a la miocardiopatía diabética.**

OBJETIVO GENERAL

Determinar la temporalidad y progresión de cambios histológicos cardíacos, hipertrofia y fibrosis, relacionados con la ocurrencia de un estado redox que han sido descritos en diabetes inducida por estreptozotocina en ratas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Determinar histológicamente la presencia de hipertrofia en miocardio de ratas, a las 2, 4, 8 y 12 semanas de inducción de diabetes con estreptozotocina.
- 2) Determinar histológicamente la presencia y distribución de fibrosis en miocardio de ratas, a las 2, 4, 8 y 12 semanas de inducción de diabetes con estreptozotocina.
- 3) Evaluar histológicamente la presencia de Lipofuscina en miocardio de ratas, a las 2, 4, 8 y 12 semanas de inducción de diabetes con estreptozotocina.

METODOLOGÍA

1. MODELO Y DISEÑO EXPERIMENTAL

El estudio experimental se llevó a cabo en el Centro de Investigaciones Biomédicas de la Universidad de Valparaíso con la aprobación del Comité institucional de Bioética para investigación de animales (ver anexo "Acta de evaluación bioética-BEA072-16"). Se utilizaron ratas adultas de sexo masculino, de 250 gramos aproximadamente, de la cepa Sprague Dowley. Un total de 40 ratas fueron adquiridas para el estudio subdivididas en 2 grupos: grupo control normal (N), conformadas por 20 ratas; y un grupo diabético (DBZ) inducido por estreptozotocina (STZ), conformado por 20 ratas, en 4 períodos de tiempo: 2, 4, 8 y 12 semanas de estudio post tratamiento (Tabla II).

Todos los procedimientos que se realizaron en esta investigación, toma de glicemia, medición de peso y cirugía post mortem, fueron a través de una inducción de sueño administrándose oxígeno con pureza de $99,5 \pm 0,5\%$ a 1L/min durante 30s, y luego fueron anestesiadas con isoflurano al 5% mediante un vaporizador en una cámara transparente de acrílico especialmente diseñada para la inducción anestésica (Imagen 1) durante 5 minutos aproximadamente.

Tiempo	RATAS DIABETICAS (n=5)	RATAS CONTROL (n=5)
2 semanas	GRUPO 1A	GRUPO 1B
4 semanas	GRUPO2A	GRUPO 2B
8 semanas	GRUPO 3A	GRUPO 3B
12 semanas	GRUPO 4A	GRUPO 4B
Cantidad ratas	20	20

Tabla II. Diseño experimental modelo estudio de 40 ratas subdivididas en 2 grupos: ratas diabéticas inducidas por estreptozotocina (STZ) y control normal (N) en 4 periodos

de tiempo. Cada periodo de tiempo estaba conformado por 5 ratas de cada grupo.

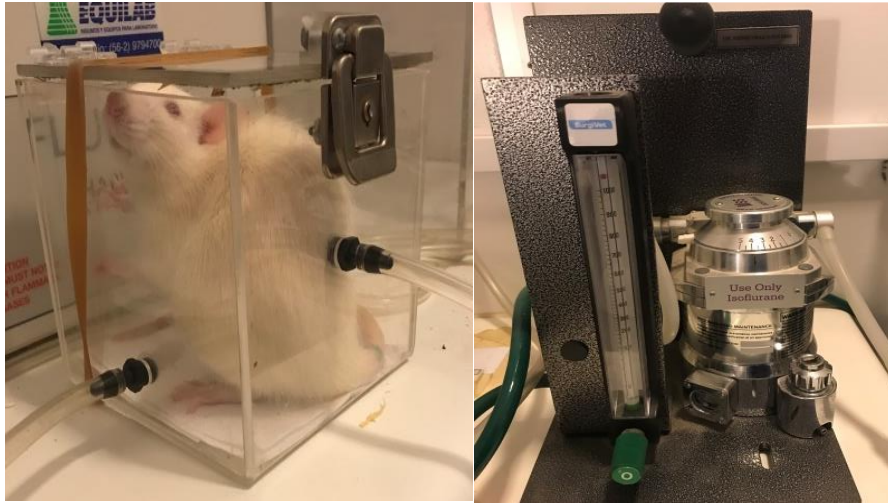


Imagen 1. Inducción de sueño. Cámara individual (*izquierda*) de inducción de sueño mediante isofluorano al 5% (*derecha*) para la toma de glicemia e inyección de insulina y también para la cirugía de corazón.

2. INDUCCIÓN DE DIABETES CON ESTREPTOZOTOCINA

Las ratas fueron sometidas a diabetes inducida químicamente con una sola inyección de STZ (65 mg/kg, ip) disuelta en buffer citrato 0.1M a pH 4.5. Por otra parte, las ratas control fueron inyectadas con buffer citrato a 0.1M a pH 4.5. Ambas inyecciones se realizaron vía intraperitoneal en el cuadrante inferior derecho del animal, lateral a la línea media, para evitar el compromiso de la vejiga urinaria; y caudal con respecto a la última costilla, para evitar inyectar en el hígado o en el estómago. La inyección se realizó con una jeringa estéril de 1ml [Terumo Needle 25G x 5/8" (16mm)].

3. MEDICIÓN DE GLICEMIA

Para saber la dosis de administración de insulina, se realizó un estudio piloto para establecer la dosis de insulina en relación a la glicemia obtenida. Se determinaron los índices de glicemia utilizando un glucómetro [Accu-Chek Active; Roche]. Las muestras de sangre fueron obtenidas de la vena de la cola de los animales diariamente para ambos grupos hasta el término del estudio con excepción de los fines de semana. Al tercer día

de aplicada la inyección de STZ, se confirma la hiperglicemia en las ratas inducidas con STZ. Se estableció una hiperglicemia en valores mayores a 200 mg/dL, estableciéndose una tabla (Ver tabla III) de administración de insulina [Insulatard-Hm 100UI, Novo Nordisk] de acuerdo a los niveles de glicemia obtenidos y así evitar la muerte del animal por un control inadecuado de su glicemia. Valores inferiores a 200 mg/dL no requieren administración de insulina.

Glicemia mg/dL	Insulina (unidades)
200-299	2U
300-399	3U
400-Hi	4U

Tabla III. Unidades de administración de insulina de acuerdo a los niveles de glicemia en base a estudio piloto.

4. MEDICIÓN DE PARAMETROS

De acuerdo a protocolos del laboratorio, se tomaron diariamente los pesos (grs) de las ratas de ambos grupos, grupo control y grupo inducido con STZ, en balanza digital como seguimiento de los posibles cambios (Imagen 2).



Imagen 2. Toma de Medida: peso (gr). Se midió el peso diariamente a todas las ratas en estudio, independiente si eran del grupo control normal o las inducidas por STZ como registro del crecimiento o ante un registro de alerta.

5. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO

Al término de cada uno de los periodos a analizar (2, 4, 8 y 12 semanas), los animales fueron depositados en una caja transparente de acrílico especialmente diseñada para la inducción anestésica de 29x44x20 cm [Harvard Apparatus, Estados Unidos], administrándose oxígeno con pureza de $99,5 \pm 0,5\%$ a 1L/min durante 30s, y luego fueron anestesiadas con isofluorano al 3-4 % mediante un vaporizador. Una vez comprobado que los animales estaban anestesiados, evaluando criterios de ausencia de movimientos voluntarios, relajación muscular y pérdida de respuesta a estímulos reflejos, fueron trasladados a una mesa operatoria térmica [Harvard Apparatus, Estados Unidos], que permite mantener la temperatura corporal a 37°C y la administración de la anestesia a través de una máscara facial con oxígeno e isofluorano al 2%. [Harvard Apparatus, Estados Unidos]. Para la cirugía, se realizó limpieza de la superficie cutánea y luego se abrió el tórax mediante una esternotomía para acceder al corazón de manera óptima. La aorta torácica ascendente fue clampeada y el corazón rápidamente extraído (Imagen 3). La eutanasia fue confirmada al extirparse el corazón.

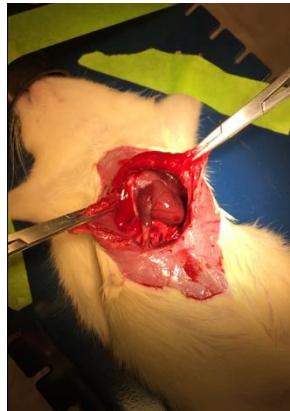


Imagen 3. Procedimiento quirúrgico mediante una esternotomía que expone la pared costal la cuál es cortada en sentido ascendente para exponer el corazón y extirparlo. Todo el procedimiento se realizó sobre mesa térmica bajo anestesia.

6. MANIPULACIÓN Y PROCESAMIENTO DE MUESTRAS

El corazón fue depositado sobre una base metálica (Imagen 4) para seccionarse en tres cortes transversales de 3 mm de grosor cada uno, aproximadamente, a lo largo del eje corto del ventrículo izquierdo desde el ápex a la base, identificando 3 zonas definidas como zona A, zona B y zona C (Imagen 5). Todas las muestras obtenidas fueron fijadas en formalina tamponada al 10% para sus posteriores análisis. Se realizó una post fijación por 3 días en formalina al 37% para luego ser procesadas de forma manual bajo un protocolo establecido del Laboratorio de Ciencias Morfológicas de la Universidad de Valparaíso, deshidratación en Alcoholes ascendentes (70%, 95% y 100%), 3 cambios de Xilol y 2 cambios de parafina, durante 45 minutos en cada solución.

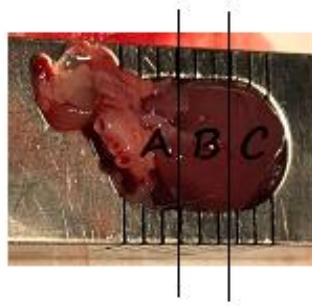


Imagen 4. Molde metálico para seccionamiento transversal de piezas pequeñas. Mediante el uso de 2 navajas se obtuvieron 3 zonas del corazón para su posterior análisis histopatológico.

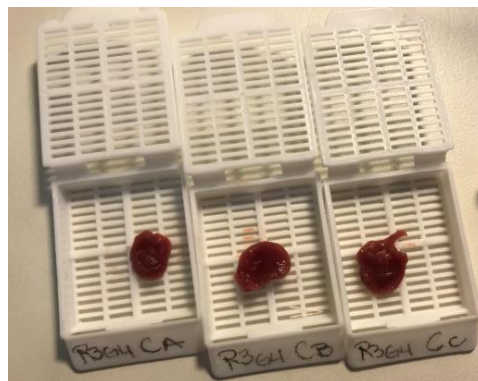


Imagen 5. Muestras cardíacas seccionadas para análisis morfológico denominadas: zona A, B y C (respectivamente).

7. ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO

Las muestras luego de ser procesadas, fueron cortadas a 5 micras de grosor en un micrótopo manual (marca ACCU-CUT, modelo SRM 200 CW) para cada uno de los bloques equivalentes a cada una de las zonas, A, B y C. Se realizaron 3 técnicas histológicas: 1) Tinción de rutina Hematoxilina y Eosina, para el estudio de la Hipertrofia; 2) Tricrómico de Masson, para la detección del aumento de las fibras de colágeno, Fibrosis; y 3) PAS-Ziehl Neelsen, para la identificación de depósitos intranucleares de Lipofuscina (LPF).

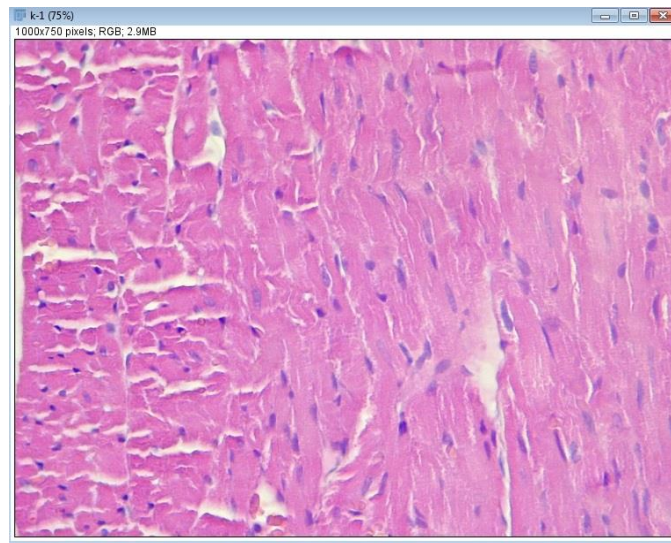
Para el procesamiento de imágenes, se utilizó el programa *ImageJ* que permite un escaneo automático de análisis de imágenes de área definidas por cada uno de los 3 análisis de este estudio a través de multiproceso gracias al hardware multi-CPU. Las imágenes fueron procesadas en 8 bits, 256 colores, en formato.tiff

7.1 Cuantificación nuclear para el estudio de Hipertrofia.

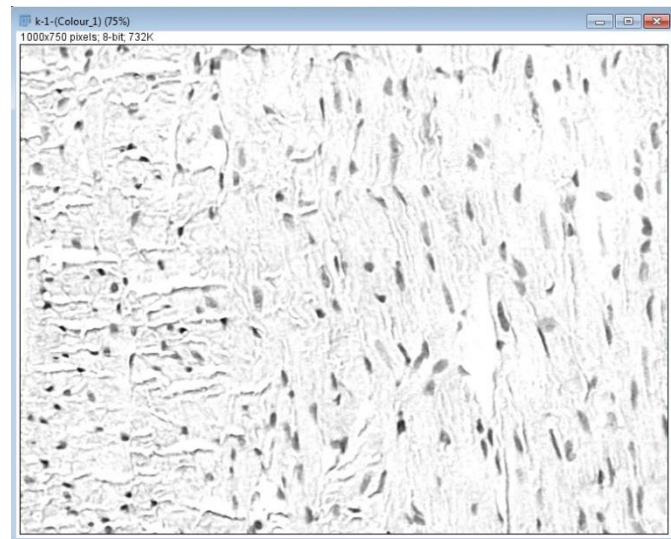
La hipertrofia se observa cuando el citoplasma y el núcleo presentan un mayor tamaño de su proporción normal. El fundamento de la reacción se basa en la unión de un colorante ácido, eosina, a fin por estructuras básicas del citoplasma; y de un colorante básicos, hematoxilina, a fin a estructuras ácidas, que son los grupos fosfato de los ácidos nucleicos (DNA/RNA), grupos sulfato de los glucosaminoglucanos y grupos carboxilos de las proteínas. Las láminas fueron teñidas con los colorantes de rutina, hematoxilina-eosina (ver anexo: análisis histopatológico) diferenciando los núcleos de color morado y los citoplasmas de color rosado.

Se fotografiaron 10 campos al azar de las 3 zonas del corazón por cada rata, a una magnificación de 100x. Las imágenes fueron exportadas en formato.tiff a una resolución de 1000x750 pixeles en el programa ImageJ. Desde la imagen inicial, se realizó una imagen duplicada (k-1) con el fin de no realizar cambios a la imagen original (Imagen 6a). Luego se realiza una manipulación de la imagen denominada "deconvolución", que permite separar los colores de las imágenes, en 3 colores denominados "color 1", "color 2" y "color 3". Se usó el color 2, que equivale al colorante nuclear, hematoxilina, para

obtener una imagen pseudo-binaria. Para realizar el conteo semiautomático del área visualizada (Imagen 6b), se ajustan ciertos "parámetros" según lo que se quiere medir: núcleos mal definidos, tamaño nuclear, eliminación de núcleos que se encuentren al borde de la imagen, entre otros, obteniéndose como resultado un "análisis de partículas" del resumen del conteo final, del área calculada, promedio del tamaño y porcentaje del área a la cual corresponde (Imagen 6c).



(a)



(b)

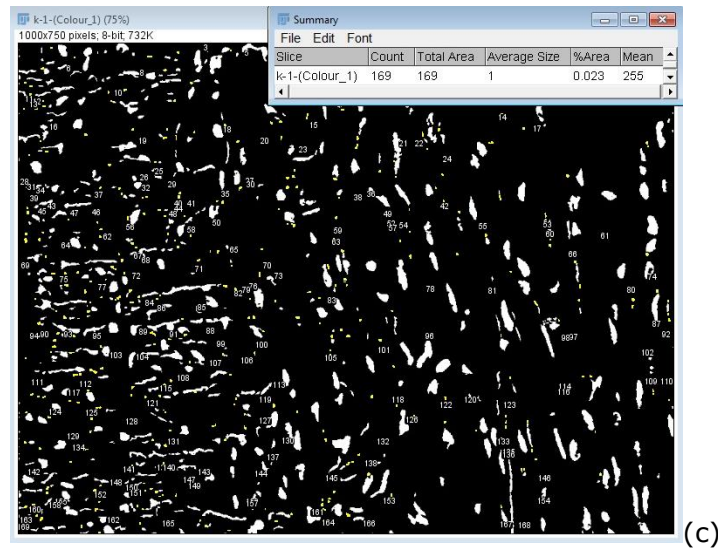


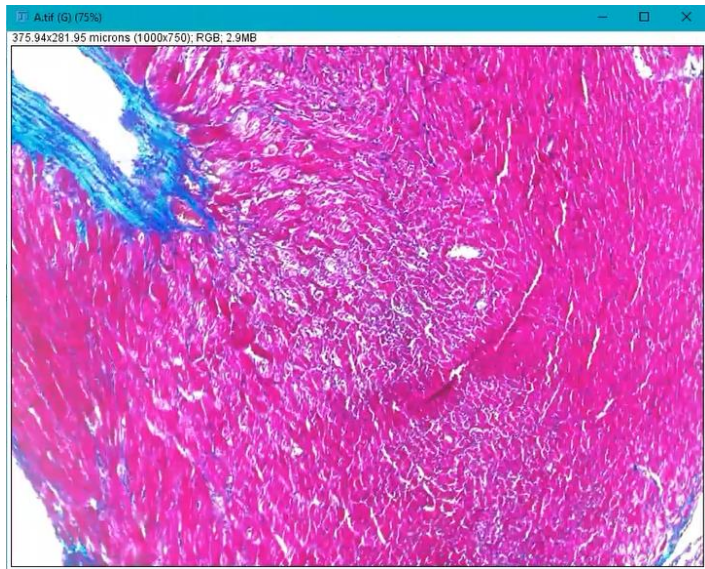
Imagen 6. Cuantificación nuclear para estudio de Hipertrofia. (a) miocardio con tinción de rutina Hematoxilina-eosina. (b) Deconvolución nuclear. (c) Resumen del conteo nuclear por área fotografiada.

7.2 Cuantificación de colágeno para el estudio de Fibrosis.

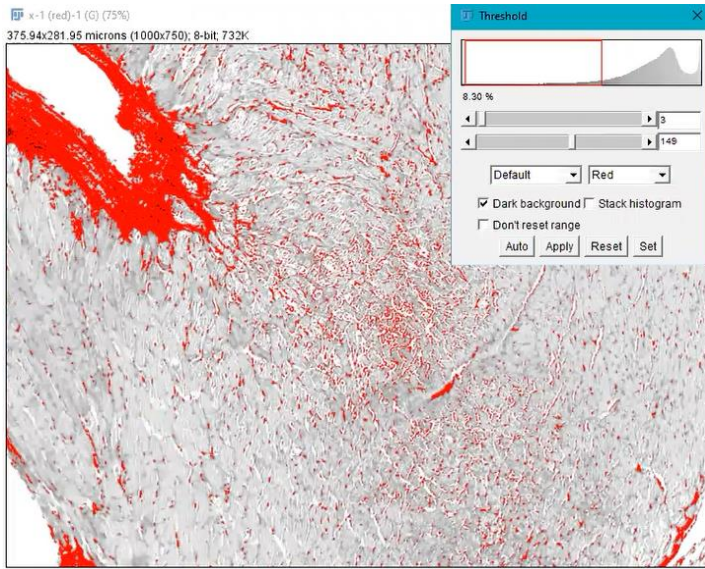
Las láminas fueron teñidas con un método histoquímico tricromico de Masson (ver anexo: Análisis histopatológico). Esta tinción permite observar las fibras colágenas de color azul en contraste con citoplasmas rosados y núcleos color negro. Esta coloración especial permite distinguir el colágeno del músculo y otros elementos histológicos. El fundamento de la técnica se basa en que las estructuras se tiñan por métodos tricrómicos o por la combinación de una tinción de ácido-base. El biebriich scarlet (BS), colorante ácido, se une a todos los elementos acidófilos del citoplasma, músculo y colágeno. Por otra parte, el ácido fosfomolibdico o fosfotúngstico, causan que el BS difunda por el colágeno, pero no por el citoplasma mediante una tinción selectiva por fibras del tejido conectivo por la formación de enlaces salinos con sus grupos básicos del ácido. Finalmente, la tinción nuclear básica por la hematoxilina férrica de Weigert se unirá a estructuras ácidas como las del núcleo.

Se fotografiaron 10 campos al azar de las 3 zonas del corazón por cada rata, a una magnificación de 40x. Las imágenes fueron exportadas en formato .jpg en el programa ImageJ. Desde la imagen inicial (Imagen 7a), se realizó, a través de la herramienta "Macros", el programa automático "*tric.Masson 2.txt*" que me permite hacer todos los

ajustes de tamaño y duplicación de imagen en un solo paso. Con la herramienta "Threshold", en la primera imagen se marca lo que corresponde a fibrosis, en coloración azul (Imagen 7b), se ajusta visualmente los márgenes y se obtiene un porcentaje de área, y en la segunda imagen se marca el área total del tejido que corresponde a todo lo que no tenga coloración azul (Imagen 7c). Como resultado se obtienen ambos porcentajes y en un cuadro Excel y se obtiene la razón del área de fibrosis (área de fibrosis/área total de la imagen).



(a)



(b)

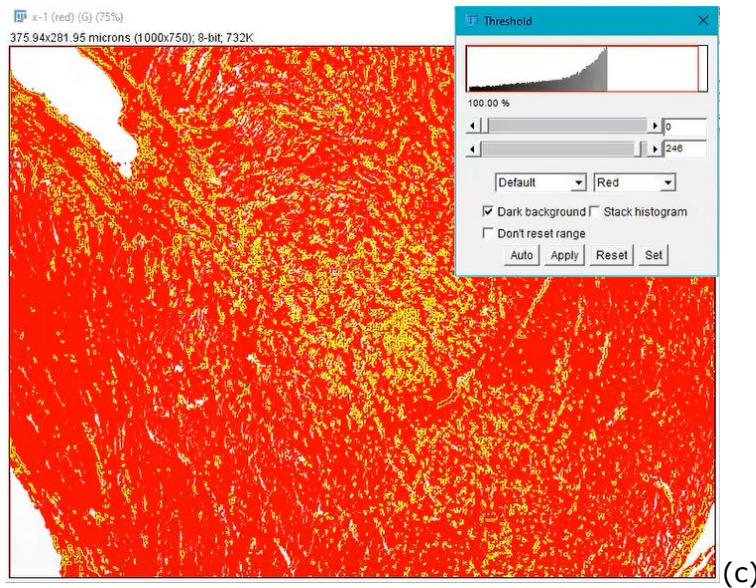


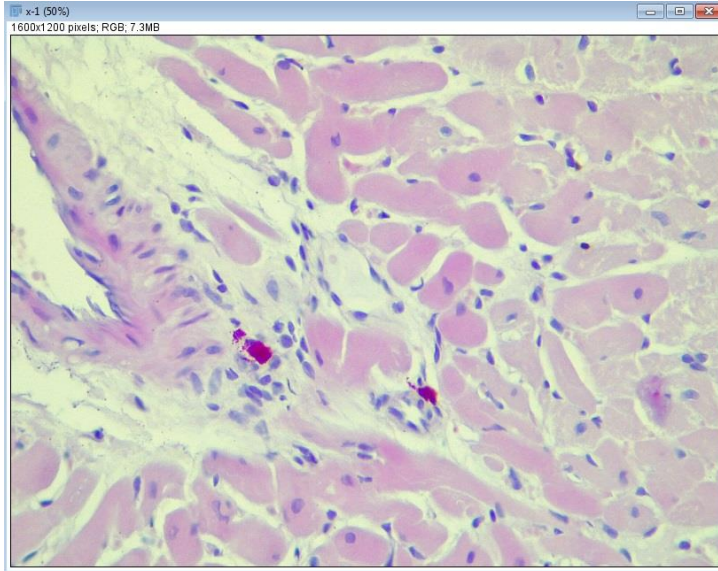
Imagen 7. Cuantificación depósito de colágeno para estudio de fibrosis. Tejido cardiaco teñido con Tricrómico Masson. (a) Fibras colágenas de color azul en contraste con el citoplasma de color rosado y núcleos morados. (b) área de fibrosis. (c) área total de la imagen.

7.3 Cuantificación de depósito de Lipofuscina.

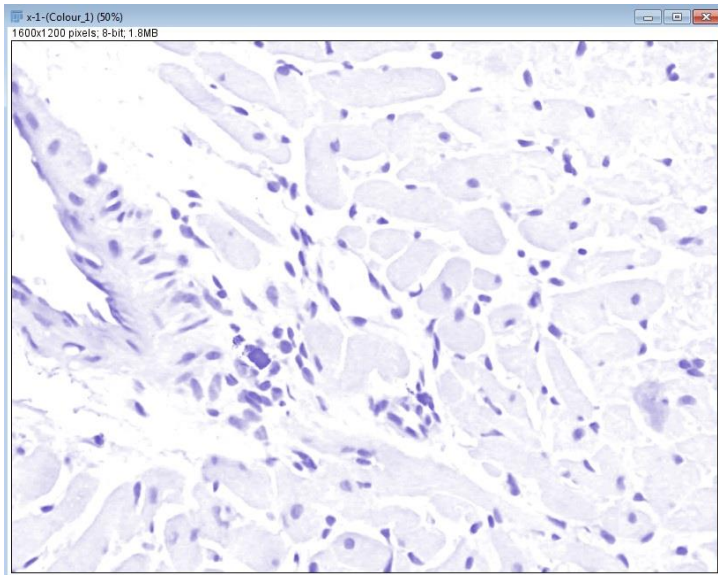
Las láminas fueron teñidas con método histoquímico PAS-Ziehl Neelsen (ver anexo: análisis histopatológico) diferenciando los núcleos de color negro y los citoplasmas de color rosado. Esta tinción permite observar los característicos depósitos perinucleares de color magenta de proteínas oxidadas, en el citoplasma de los cardiomiocitos.

Se fotografiaron 10 campos al azar de las 3 zonas del corazón por cada rata, a una magnificación de 100x. Las imágenes fueron exportadas en formato .jpg en el programa ImageJ. Desde la imagen inicial, se realizó una imagen duplicada (k-1) con el fin de no realizar cambios a la imagen original (Imagen 8a). Se realizó, a través de la herramienta "Macros", el programa automático "*lipo-nucl count.ijm.ijm.ijm*" que me permite hacer todos los ajustes de tamaño y duplicación de imagen en un solo paso (Imagen 8b). Con la herramienta "Threshold", en la primera imagen se marca lo que corresponde al depósito de lipofuscina (Imagen 8c), que corresponde en versión original a la coloración magenta. Se ajusta visualmente la marcación en rojo y se obtiene el conteo de depósitos

que equivalen a célula marcada (1 depósito:1 núcleo). En la segunda imagen, se marcan todos los núcleos del área total de la imagen (Imagen 8d). Como resultado se obtienen ambos conteos y en un cuadro Excel, se obtiene células con depósito/células totales del área de la imagen.



(a)



(b)

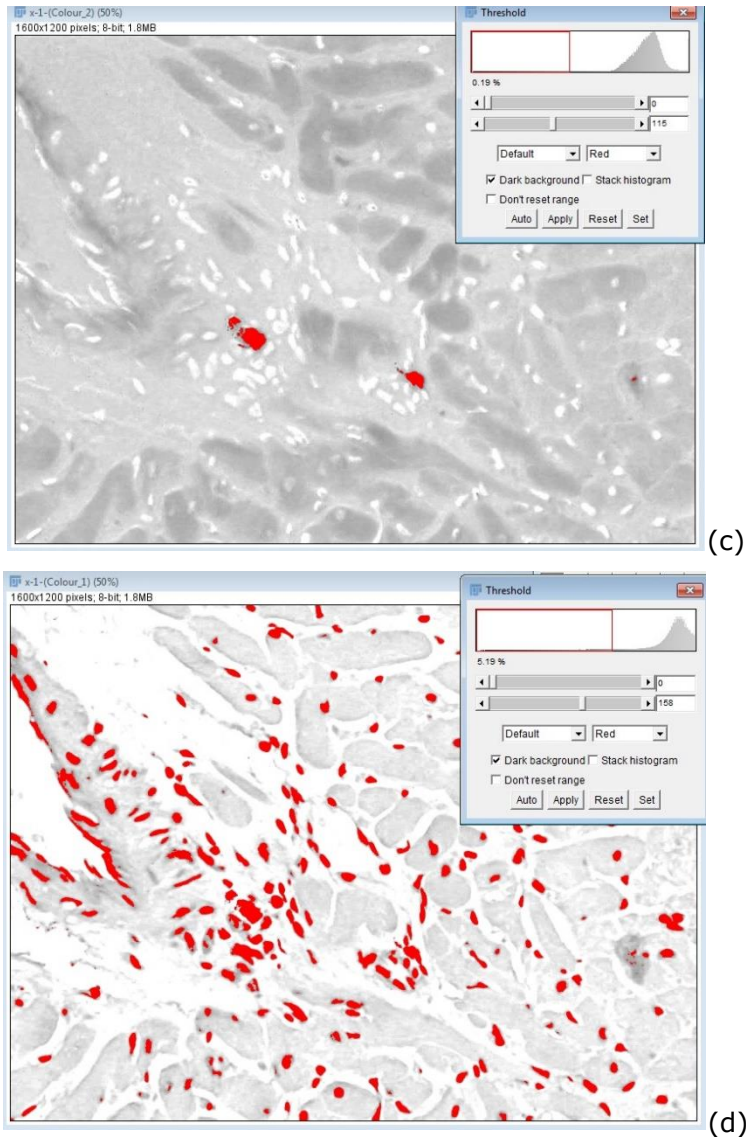


Imagen 8. Cuantificación depósitos de Lipofuscina (LPF). (a) imagen teñida con método histoquímico PAS-Ziehl Neelsen y sus depósitos de Lipofuscina en color magenta. (b) Imagen duplicada. (c) Depósitos de Lipofuscina. (d) Conteo nuclear.

8. PROCESAMIENTO DE DATOS: Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a estadística descriptiva, especificando la media y su desviación estándar. El número de 10 animales por cada grupo del diseño experimental, 5 patológicos y 5 control, se ha reducido al mínimo posible para demostrar un aumento del 50% de las variables biológicas a analizar en el modelo experimental,

considerando una potencia estadística del 80% con niveles de significancia estándar (5%). Además, considera una posibilidad de pérdida del 40% de pérdida de seguimiento y/o datos perdidos.

Se realizó una prueba de distribución para analizar si era normal o no normal con el test de Shapiro-Wilk, resultando en esta última. También se evaluó la homocedasticidad de la varianza con el test de Levene y la independencia con el test de Kendall, los que mostraron que no había homocedasticidad ni independencia. Por lo anterior, se utilizó para comparar los resultados entre los grupos el test estadístico inferencial de Kruskal-Wallis y el post test de Bonferroni. Todos los análisis estadísticos ($p \leq 0,05$) fueron realizados en el software Graphpad Prism v8 (2018).

RESULTADOS

1. DESCRIPCIÓN MACROSCÓPICA

1.1 Peso

Durante todos los periodos de estudio, el peso de las ratas fue registrado diariamente en un Formulario de registro, tanto para ratas control como para ratas diabéticas.

A la observación macroscópica, podía diferenciarse en un mismo grupo, la contextura de cada rata discriminando basado en la observación cuál era diabética y cuál no, concordando luego, con los resultados obtenidos (Figura 7). Las ratas control pesaron en promedio 446.4 gramos a diferencia de 369.5 gramos de las ratas inducidas con STZ. Estadísticamente, se observa una tendencia de ambos grupos al alza de peso lo que concuerda con el tamaño y crecimiento natural de éstas, sin embargo, el grupo diabético demostró obtener una ganancia de peso en el tiempo menor que el grupo control. Cabe notar, que, a las 8 semanas, la diferencia de peso es mínima en ambos grupos, pero si la hay entre ambos grupos entre las semanas 4 y 12.

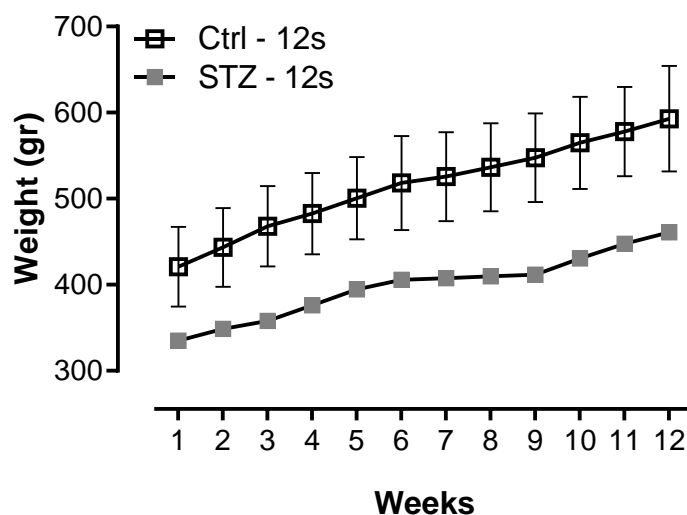


Figura 7. Grafico peso promedio de ratas en estudio: grupo control (CTRL) y del grupo diabético inducido con estreptozotocina (STZ) a lo largo de los 4 periodos en estudio (2, 4, 8 y 12 semanas).

1.2 Glicemias

Las glicemias, fueron registrada diariamente en el mismo formulario de registro de peso durante todos los periodos de estudio. Los niveles de glicemia fueron significativamente mayores en el grupo diabético respecto al grupo control (Figura 8). Las glicemias del grupo control se mantuvieron siempre por debajo de los 160mg/dL; en cambio, el grupo diabético presentaron valores por sobre los 200mg/dL.

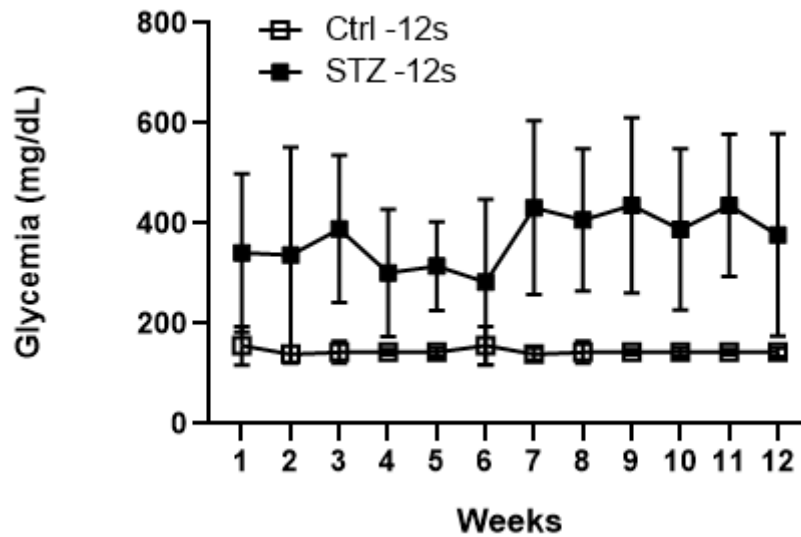


Figura 8. Grafico promedio glicemias de ratas en estudio: grupo control (CTRL) y del grupo diabético inducido con estreptozotocina (STZ) a lo largo de los 4 periodos en estudio (2, 4, 8 y 12 semanas).

1.3 Otros parámetros.

Durante la investigación, 3 ratas murieron por causa desconocida, y 2 fueron reemplazadas para no alterar el n muestral del grupo a investigar. Al incorporarse, estas mantuvieron los mismos tiempos de estudio y fueron seleccionadas bajo las mismas condiciones: sexo masculino, adultas, con un peso mayor a los 250grs.

No se presentaron características que llamaran la atención como: alopecia, cambios en el comportamiento, retraso motor, u otro parámetro distinguible por el observador. Durante la cirugía, tampoco se observaron diferencias anatómicas entre las ratas CTRL

o STZ, ni de sus órganos, a excepción de la contextura que fue mencionada en el ítem peso.

2. EVALUACIÓN HISTOLÓGICA

Durante la examinación microscópica, se presentaron hallazgos que llamaron la atención y que se describirán a continuación. Uno de ellos fue la intensidad de coloración con Hematoxilina y eosina de los cortes histológicos de tejido cardíaco obtenidos en las semanas de estudio (Imagen 9). Otro hallazgo, fueron cambios en el tamaño nuclear en ratas diabéticas solo en el grupo de 12 semanas comparados a núcleos del grupo control de la misma semana (Imagen 10). En el grupo de 8 semanas, se presentaron cambios de coloración citoplasmática asociado a degeneración vacuolar (Imagen 11).

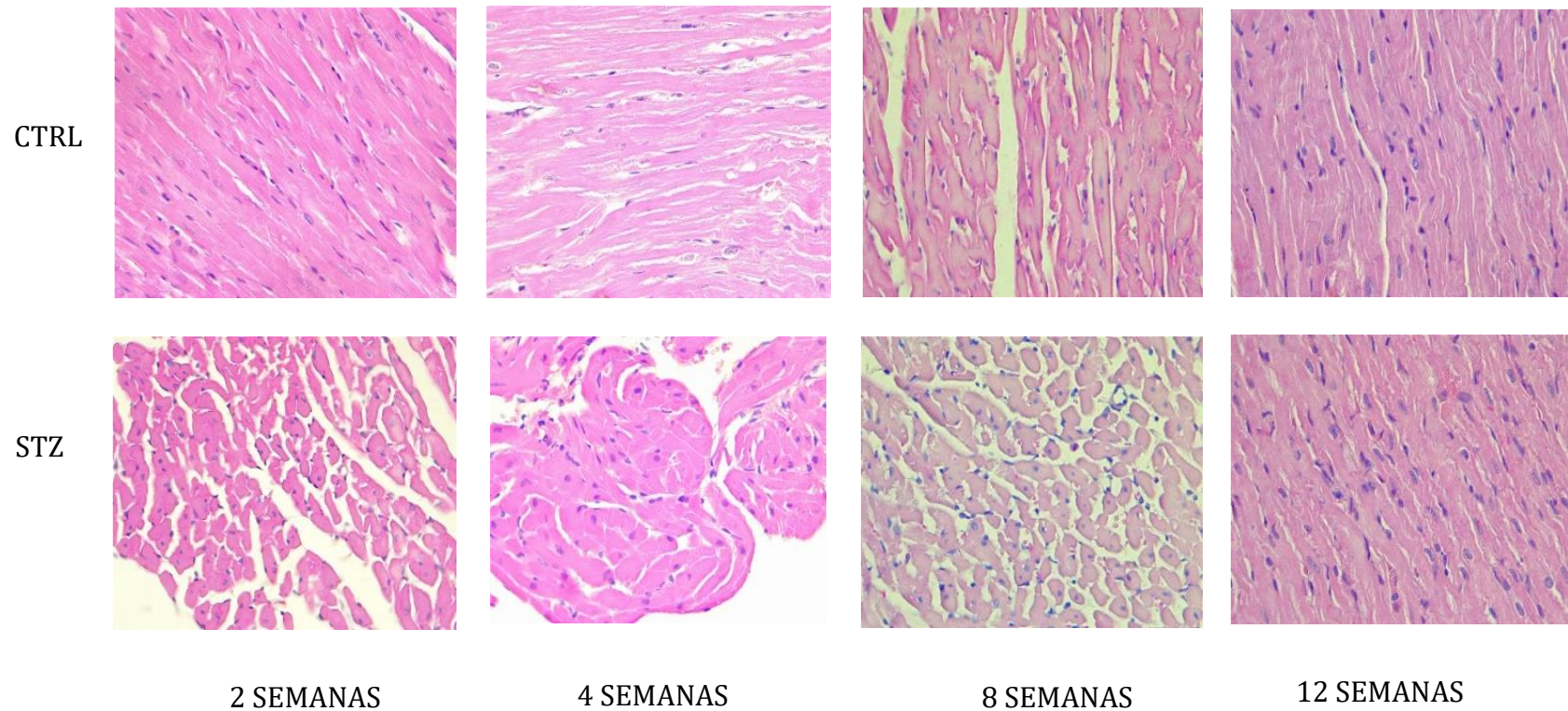


Imagen 9. Análisis microscópico teñidos con Hematoxilina y eosina (40x): **Hallazgos microscópicos**. Tejido cardiaco comparativo de ratas en estudio tanto del grupo control (CTRL) como del grupo diabético inducido por estreptozotocina (STZ) a las 2, 4, 8 y 12 semanas. Se pueden apreciar cambios de coloración en la intensidad de tinción en los 4 periodos de estudio tanto para el grupo CTRL como para el STZ debido a factores externos que se producen al momento de estandarizar la técnica al momento de realizar la técnica. Se prevaleció la intensidad de coloración nuclear por sobre la citoplasmática siempre manteniendo el contraste entre ambas estructuras.

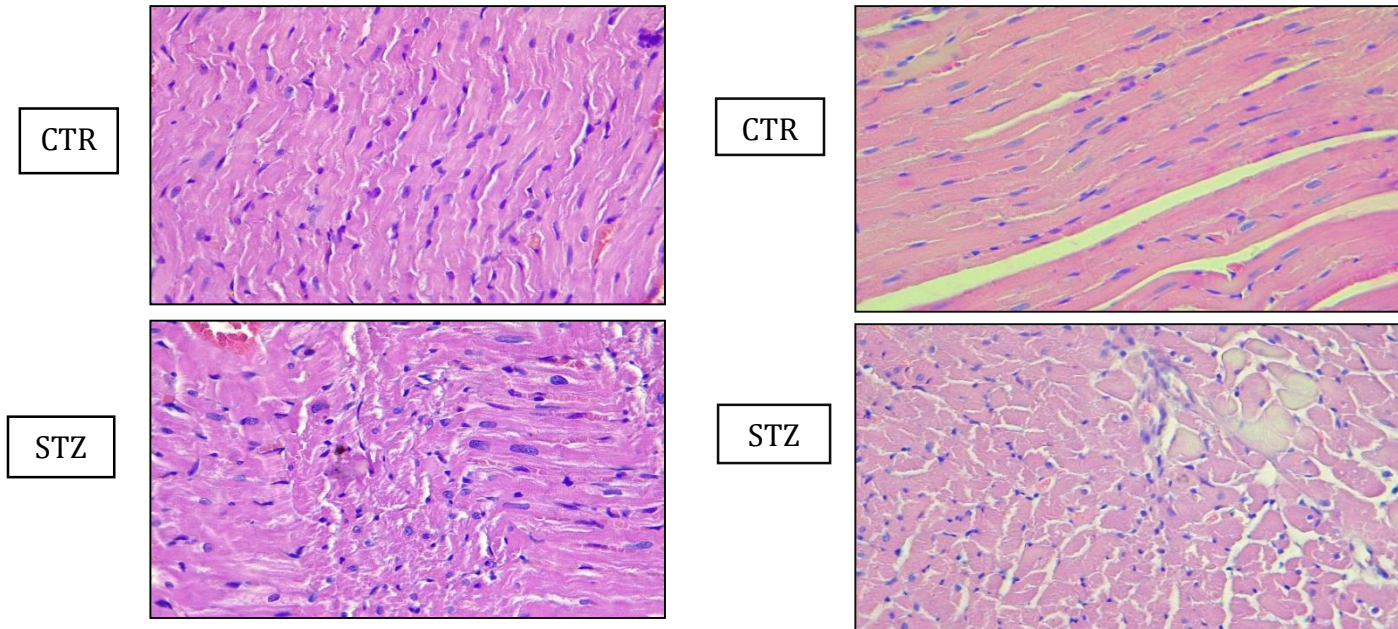


Imagen 10-11. Análisis microscópico teñidos con Hematoxilina y eosina (40x): Hallazgos microscópicos. Izquierda: La imagen muestra macro núcleos y un desorden celular correspondientes a una rata diabética (STZ) asignada por el N°1, frente a rata control (CTRL) asignada por el N°2 del grupo de estudio de 12 semanas. Derecha: Citoplasmas con degeneración vacuolar intracitoplasmático correspondientes a una rata diabética (STZ) asignada por el N°3 frente a rata control (CTRL) asignada por el N° 4 del grupo de estudio de 8 semanas..

2.1 Hipertrofia

Microscópicamente, no hubo diferencias entre el grupo control ni diabético en cuanto al tamaño del cardiomiocito, tanto del tamaño nuclear como del citoplasmático, pero si hubo un leve aumento de conteo celular en ambos grupos de estudio en las semanas 8 y 12 (Imagen 12).

Estadísticamente, las 3 zonas estudiadas no muestran una predisposición al aumento o a la disminución del tamaño de los cardiomiocitos y cada una de ellas se comporta independientemente de la otra, sin importar el grupo al cual pertenezca. Se puede apreciar que la zona B y la zona C, de las semanas 2 y 4 de las ratas diabéticas (STZ), sus datos se tendencia de manera muy semejante a excepción de su media, en donde en la zona B su media es mayor, y en la zona C, de las mismas ratas diabéticas, ambas semanas son iguales. La zona C en el grupo diabético, tiende a mostrar un alza en la hipertrofia a lo largo que aumentan las semanas. No hubo diferencias estadísticamente significativas a través del análisis de ANOVA de 2 vías, entre ambos grupos experimentales en ninguno de los 4 periodos de estudio (Figura 9).

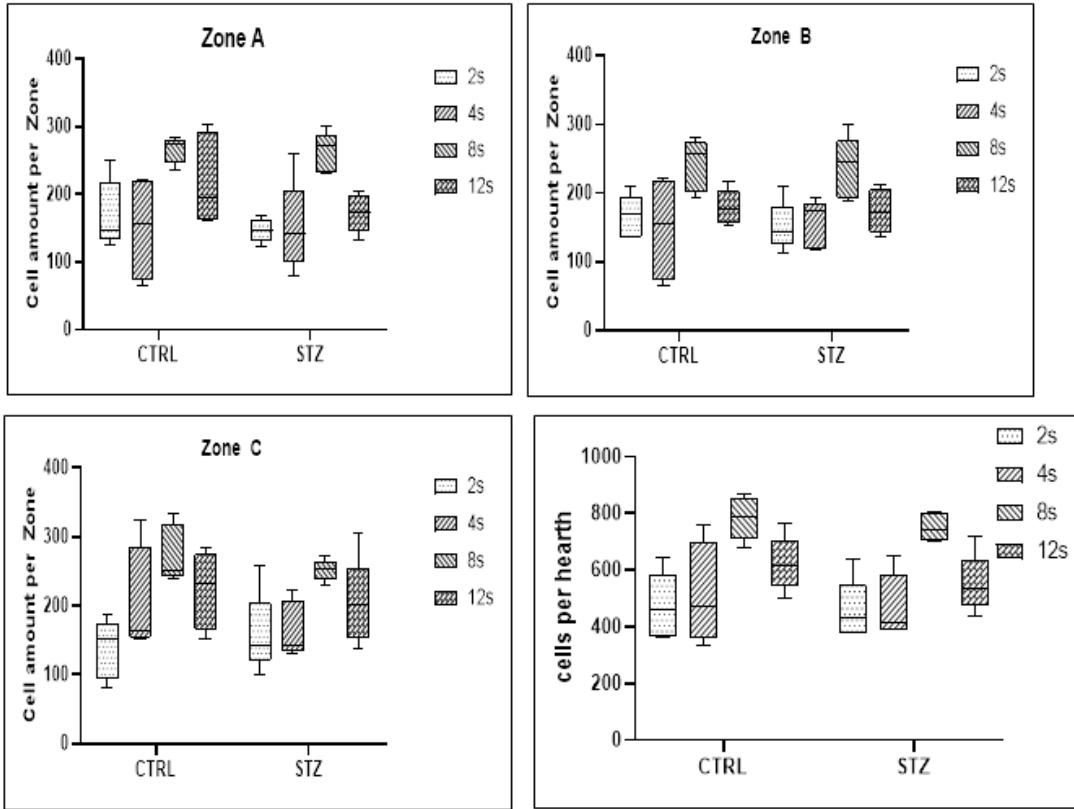


Figura 9. Análisis cuantitativo de cardiomiocito por zona de estudio (A, B y C) de ambos grupos, control y diabético. No se observan diferencias estadísticamente significativas ni entre las zonas estudiadas ni entre los 2 grupos.

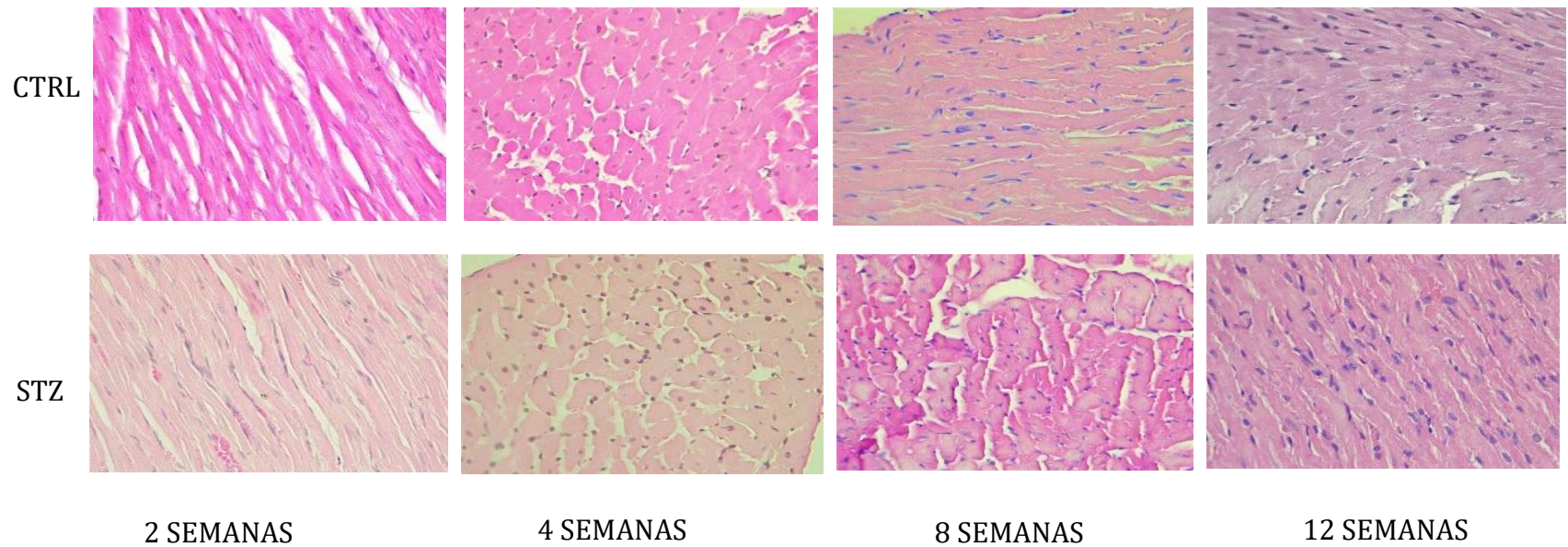


Imagen 12. Corte histológico representativos del estudio de Hipertrofia del tejido cardiaco de ratas del estudio, teñidos con Hematoxilina y eosina de los 2 grupos en estudio a las 2, 4, 8 y 12 semanas (40x). Se puede observar un leve aumento de cardiomiocitos por campo fotografiado en las semanas 8 y 12 tanto para el grupo control (CTRL) como para el grupo diabético (STZ) en comparación con la semana 2 y semana 4.

2.2 Fibrosis

Microscópicamente, se observaron zonas multifocales de fibrosis con un aumento de las fibras colágenas sobre todo en zonas cercanas a los vasos sanguíneos (Imagen 13). Existe un aumento de fibrosis en ambos grupos, control y diabéticos, en las 3 zonas de estudio.

La zona A, del grupo STZ, presenta una tendencia al aumento de fibrosis desde la semana 4 hasta la semana 12. A su vez, la semana 2 de ambos grupos, control y diabéticos, de las 3 zonas, tiende a tener una mayor cantidad de datos que las otras semanas. Los datos demuestran una disminución drástica de fibrosis desde la semana 2 hacia la semana 4 tanto del grupo control como diabético en las 3 zonas, pero, desde la semana 4 a la semana 12, hay un aumento progresivo de colágeno en las 3 zonas, destacándose la zona A y C del grupo diabético. Los valores de fibrosis (figura 9) fueron analizados por un test de ANOVA de 2 vías sin mostrar diferencias estadísticas significativas por la cuantificación del colágeno, ni entre las zonas de estudio ni entre el grupo control ni diabético.

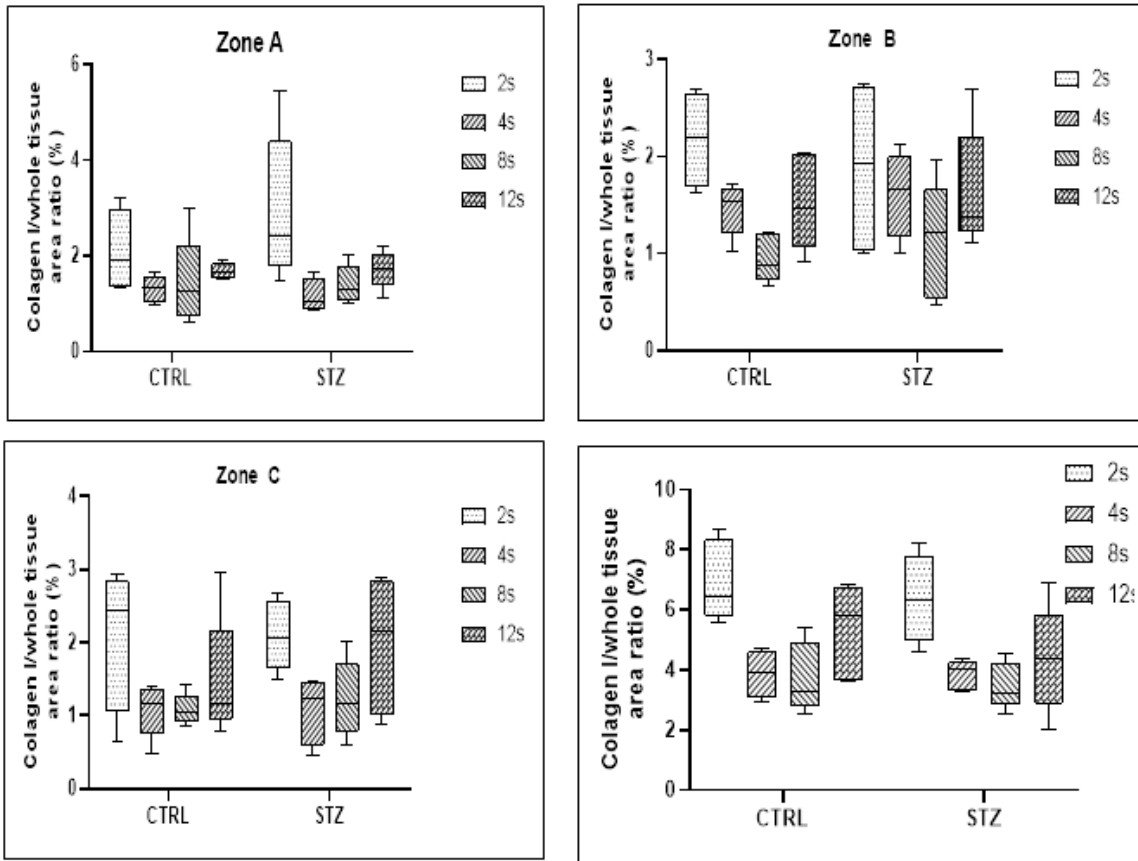


Figura 9. Depósito de colágeno por área estudiada en las 3 zonas de estudio de ambos grupos, control y diabético. Se observa que, al inicio del estudio, existe un mayor depósito de colágeno que en las semanas posteriores de estudio. No se observan diferencias significativas.

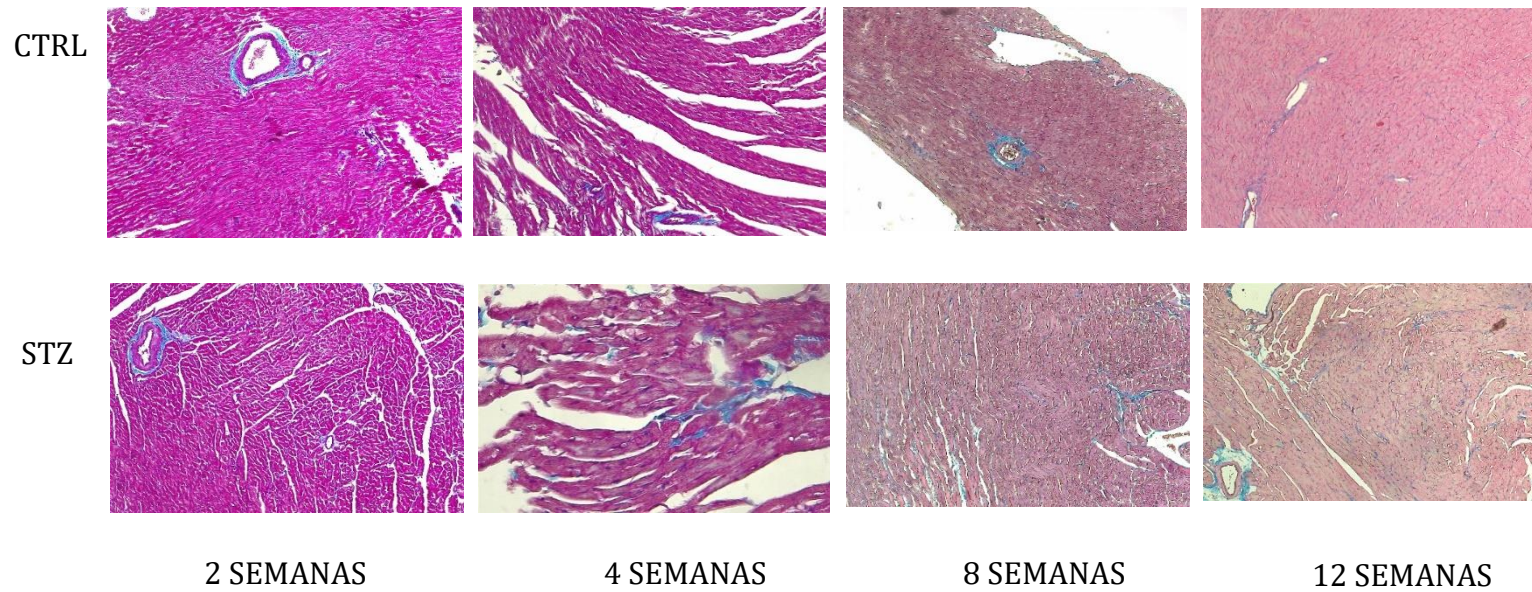


Imagen 13. Corte histológico representativos del estudio de Fibrosis del tejido cardiaco de ratas en estudio, teñidos con la técnica Tricrómico de Masson de los 2 grupos en estudio a las 2, 4, 8 y 12 semanas (40x). Se observa un leve infiltrado de depósito de colágeno (color azul) entre los cardiomiocitos, sobretodo alrededor de un vaso sanguíneo. Los citoplasmas se observan de un color rosa, y núcleos de color negro.

2.3 Lipofuscina

La examinación microscópica reveló una pigmentación citoplasmática de color magenta perinuclear y en el citosol como pequeños gránulos, correspondientes a depósitos de LPF (Imagen 14). En la zona A y B, el grupo diabético tuvo un comportamiento más homogéneo con respecto al grupo control en cuanto al depósito de LPF, a diferencia de la zona C, en donde ambos grupos arrojan resultados muy similares a lo largo de las semanas en estudio disminuyendo incluso la cantidad de depósitos de LPF. El patrón de depósito no cambia por ser de un grupo u otro. La zona B, es quien representa la menor variación de datos. Las 3 zonas no presentaron diferencias significativas en cuanto a la cantidad de depósito de LPF por un test de ANOVA de 2 vías (Figura 10).

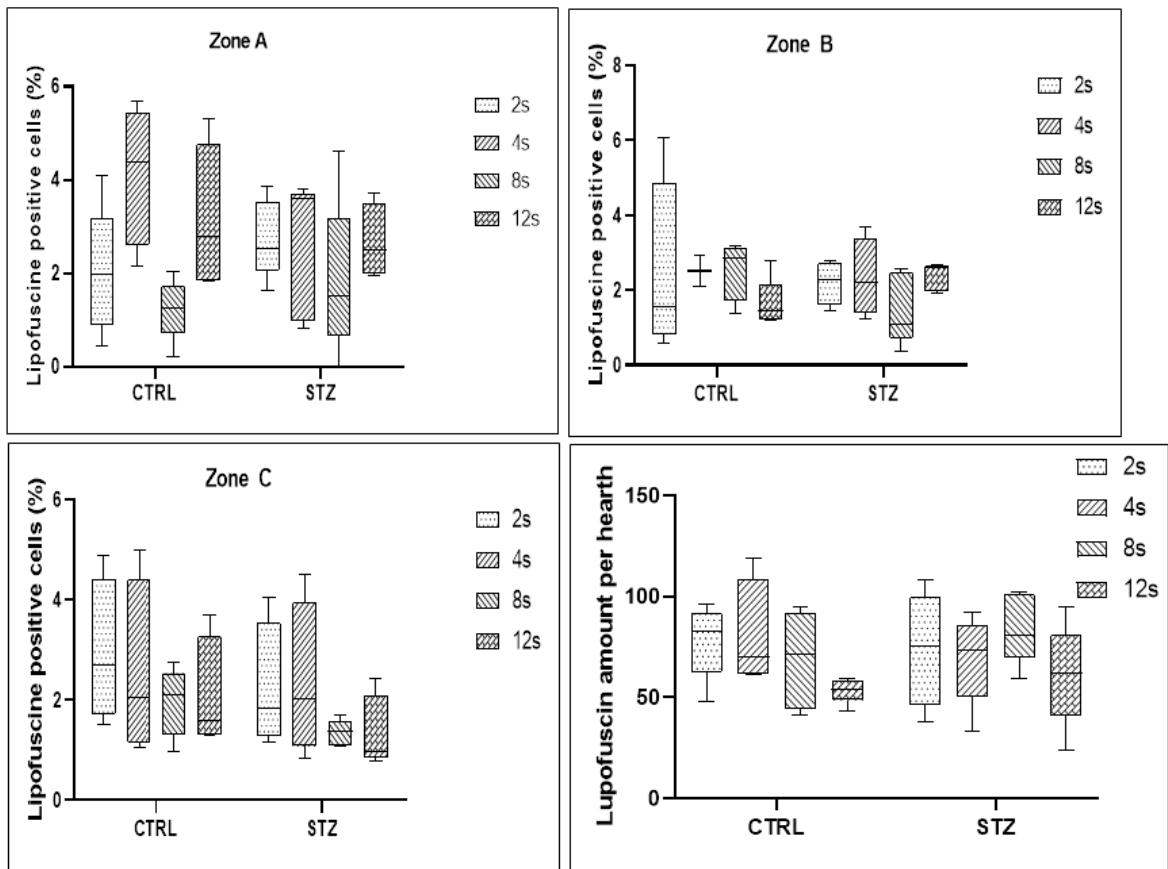


Figura 10. Análisis de los depósitos de LPF por área estudiada de ambos grupos, control y diabético. No se observan diferencias estadísticamente significativas.

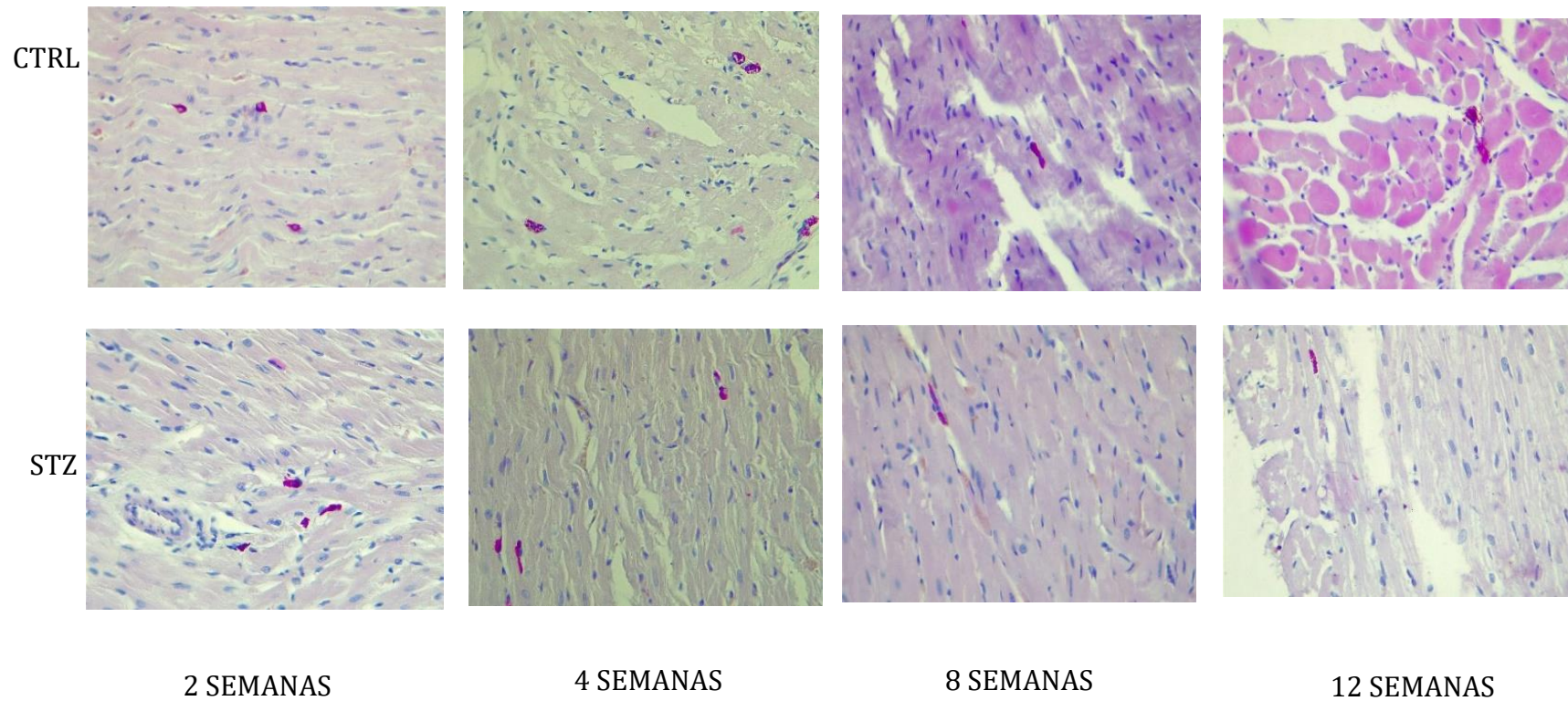


Imagen 14. Corte histológico representativos del estudio de Lipofuscina (LPF) del tejido cardiaco de ratas en estudio, tenidos con la técnica PAS-Ziehl Neelsen de los 2 grupos en estudio a las 2, 4, 8 y 12 semanas (10x). Ningún grupo ni semana presenta diferencias del depósito de LPF. Los núcleos se observan de color morado, los citoplasmas de color rosa pálido y los depósitos de LPF de color magenta.

DISCUSIÓN.

En nuestra investigación, no hubo resultados estadísticamente significativos para los objetivos planteados en cuanto al aumento de Hipertrofia, Fibrosis y depósitos de Lipofuscina, a medida que aumentaban los tiempos de estudio, pero sí hallazgos microscópicos de indicios de cambios de la población diabética por sobre el grupo control. La DM2 es una enfermedad evolutiva, de forma que esta variará desde diferentes grados de resistencia insulínica al déficit absoluto de esta hormona. Aún existen muchas incógnitas sobre los elementos que dan lugar a una disfunción de las células pancreáticas tanto a nivel fisiológico como a nivel molecular¹⁷⁸, y con ello, la importancia de comprender estos mecanismos para una correcta prevención y tratamiento de esta enfermedad, que ya ha afectado cerca de 150 millones de personas en todo el mundo. Este estudio, fue desarrollado a continuación de un estudio anterior, con la finalidad de observar los cambios provocados en la morfología cardíaca en 4 períodos de tiempo, 2, 4, 8 y 12 semanas, en ratas diabéticas inducidas artificialmente con estreptozotocina y con dosis periódicas de insulina.

Debido a la importancia de recrear un modelo de estudio que reproduzca la historia natural de la enfermedad, el modelo animal es una excelente alternativa. Dentro de los modelos animales, las ratas, son el modelo^{179 180 181} más utilizado en estudios de diabetes por su tamaño y semejanzas histológicas del tejido cardíaco con el del humano, además, por su fácil manipulación, bajo costo de mantención, entre otros beneficios. El uso de los análogos citotóxicos de la glucosa, permiten escoger a la STZ como el agente de preferencia por sobre el aloxano debido a sus propiedades químicas de mayor estabilidad¹⁸².

En cuanto al **peso** de un paciente diabético, la literatura señala que los pacientes, previo al desarrollo de la DM tipo 2, cursan con un síndrome metabólico de sobrepeso, pero que ya establecida la enfermedad, presentan una pérdida progresiva del peso corporal¹⁸³. Por otra parte, Krog et al¹⁸⁴, indica que la baja de peso es un parámetro de

progreso en donde la diabetes se ha iniciado. En el presente estudio se puede observar que el efecto de la diabetes sobre esta variable (pobre ganancia de peso), concuerda con los datos reportados de Krog et al. La baja de peso, se pudo observar en el grupo de las ratas inducidas por STZ con una gran diferencia del grupo control que fueron ganando peso en forma progresiva en el tiempo. Esto se debe a que la glucosa al no ser captada por las células del organismo producto de un déficit de los receptores de insulina o a la falta de la hormona misma. Al no poder utilizar los carbohidratos, obtiene la energía de la grasa en forma de proteína fomentando la baja de peso¹⁸⁵.

Sobre la **hiperglicemia**, es ampliamente conocido, que puede aumentar el riesgo de las enfermedades cardiovasculares dando origen a la Miocardiopatía diabética o llevar al paciente a la muerte de no cambiar sus hábitos a una vida más saludable. Índices de glicemia por sobre los 200mg/dL catalogan a un paciente como diabético¹⁸⁶. Los tratamientos en un inicio pueden ser farmacológicos, o en etapas más tardías con la administración de insulina¹⁸⁷. En el caso de las ratas en estudio, demostraron índices de glicemia por sobre los parámetros normales aun con una administración de insulina diaria durante todo el periodo de estudio, confirmando la diabetes en los 4 grupos. Ello, concuerda con los datos reportados en la literatura. Yu et al¹⁸⁸, realizó un estudio sobre el uso de células madres como tratamiento en ratas diabéticas inducidas por STZ para efectos antidiabéticos a largo plazo a la semana 1, 12 y 24 post inyección con STZ. Sus resultados concuerdan con los nuestros, de que a las 2 semanas ya existe una hiperglicemia notable post inyección. Dicho estudio, clasificó como rata diabética a aquellas que, tras 3 mediciones aleatorias de glicemia, obtenían un valor $\geq 16,7$ mmol/l. Otro estudio, de Manjarrez et al¹⁸⁹, sobre hallazgos anatomopatológicos en la miocardiopatía de ratas fue a los 14, 21 y 30 días después de la administración de estreptozotocina, confirmaron que posterior a los 14 días los resultados de hiperglicemia se elevaron significativamente.

Cabe destacar, que los índices de glicemia del grupo control siempre se mantuvieron en sus parámetros normales discriminado adecuadamente ambos grupos de estudio. No existen muchos estudios que se refieran a la sensibilidad del tratamiento con el uso de la insulina. Sin embargo, existe un estudio del grupo de Schulze¹⁹⁰ que pacientes con

insuficiencia cardíaca avanzada, la descarga mecánica resultó en una reducción significativa en los índices de resistencia a la insulina sistémica con la mejora de índices hemodinámicos del corazón. El estudio no abordó si la mejora en la sensibilidad a la insulina contribuyó directamente a la función cardíaca, pero que si se correlacionó con ciertas anomalías y señalizaciones en el corazón. Esto puede llevar a pensar que el tratamiento controlado de la insulina en las ratas estudio pudo haber generado una estabilidad o una prevención del tejido miocárdico hasta las 12 semanas que se realizó el estudio manteniendo sus índices hiperglicémicos.

En cuanto a los **tiempos planteados** de estudio, Zhao et al¹⁹¹, menciona que en su estudio de 16 semanas, obtuvieron cambios significativos en la estructura cardíaca, función cardíaca y capacidad excitatoria de ratas con hiperglicemia inducidas por STZ. Yu et al, describe que desde la primera semanas post inyección con STZ tuvo diferencias como, aumento de peso, hiperglicemia con disminución de FBI y péptido C, destrucción de islotes pancreáticos; y que a las 8 semanas aumento de peso; a las 24 semanas, esclerosis glomerular demostrando así un modelo con complicaciones a largo plazo. Sin embargo, en los 4 periodos de tiempo planteados en nuestro estudio, no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ni en fibrosis ni en hipertrofia cardíaca.

En el análisis histológico de la **hipertrofia** cardíaca, el cual es un fenómeno biológico de alta complejidad en el que intervienen distintos tipos celulares¹⁹², Ferrara et al¹⁹³, menciona que la hipertrofia es generada como mecanismo de remodelación producto de un estatus metabólico alterado consecuente de una hiperglicemia prolongado junto al aumento de ácidos grasos libres. Entre un 40 a un 75% de los pacientes con DM¹⁹⁴ puede demostrar hipertrofia cardíaca. Zhao et al, realizó un estudio de contractibilidad cardíaca en donde menciona que posterior a los 4 meses de estudio, las ratas inducidas por STZ demuestran una reducción de la contractibilidad cardíaca en comparación con el grupo control. Otro estudio de Yu et al, en un estudio de ratas diabéticas inducidas por STZ a largo plazo, confirma que a las 24 semanas el diámetro de los cardiomiocitos fue significativamente mayor que en el grupo control. El que exista un leve aumento del tamaño celular en la zona C de nuestras ratas en estudio, concuerda con la literatura sobre la hipertrofia del ventrículo izquierdo que es en donde el corazón ejerce

mayoritariamente su contracción debido a su mayor tamaño por sobre el ventrículo derecho y por sobre las aurículas.

Estos datos, posteriores a las 12 semanas demuestran que, en el caso del presente estudio, nuestro último tiempo de estudio no fue suficiente para la generación de cambios histológicos estadísticamente significativos, pero que si arrojaron ciertos hallazgos microscópicos como el aumento en el número de núcleos y de citoplasmas.

El aumento de ROS inducidos por la hiperglicemia y la oxidación de ácidos grasos libres llevan a una apoptosis y fibrosis miocárdica¹⁹⁵. El estudio de Manjarrez et al demostró que a los 14 días post inyección con STZ, existió un mínimo y depósito focal de colágeno, que, a los 21 días, mínimos cambios histológicos con una hiperplasia focal; y a los 30, un incremento difuso de fibras colágenas en el intersticio del miocardio. Zhao et al, observaron en su estudio, que a las 16 semanas de hiperglicemia se generaron cambios significativos en la estructura cardiaca, función y capacidad de contractibilidad a cambio de la trimetazidina que atenúa la fibrosis generada en un 23% en comparación con el corazón de ratas diabéticas inducidas por STZ. Otro estudio, de Krog et al¹⁹⁶. evaluaron las lesiones del miocardio en primates con diabetes espontánea, concluyendo que la fibrosis y la hipertrofia no fueron diferentes entre el grupo control y los diabéticos posteriores a 1 año de estudio, pero con un bajo número de animales. Por otra parte, Yu et al. describieron que a las 24 semanas post inducida la diabetes, observaron una fibrosis evidente, así como también una estructura de red de colágeno destruida y desorganizada.

Estos datos, generan cierta controversia, pero al igual que los generados en la hipertrofia, demuestran que hasta las 12 semanas no existen cambios evidentes que manifiesten un cambio de morfología cardiaca y que si deberían ser por sobre las semanas del estudio aquí presentado.

En el estudio de Krog et al, demostraron que la tinción de PAS de los depósitos de LPF se correlacionaban positivamente con la insulina en plasma y las concentraciones de lípido. Terman et al¹⁹⁷, demostraron que los cultivos de cardiomiocitos gradualmente acumulan pigmentos de lipofuscina junto con progresivos cambios mitocondriales como

disminución del potencial de membrana y alteración estructural. Como menciona Rattan et al¹⁹⁸, la formación de lipofuscina tiene lugar en una variedad de respuestas fisiopatológicas como el estrés oxidativo y el envejecimiento, con acumulación de agregados de proteínas oxidadas y posteriormente, de material reticulado como la lipofuscina. Los depósitos de **LPF** no son visibles en otro tipo celular del tejido cardiaco, discriminándolas por su forma de depositarse en el citoplasma de los cardiomiocitos. Este depósito granulocitario fue posible de apreciar en ambos grupos de estudio en todas las semanas propuestas. Llama la atención en que no exista una tendencia clara al aumento o a la disminución al mayor tiempo de estudio en ninguno de los 2 grupos. Otro estudio, de Roso et al. observaron grandes cantidades de acumulo de LPF en el corazón de rata en periodos más avanzados del desarrollo postnatal¹⁹⁹, concordando con los hallazgos encontrados en nuestro estudio.

Hallazgos macro y microscópicos fueron encontrados y expuestos en el presente estudio sin ser causal de una condición u otra, sino como fenómenos aislados. En contraste con nuestra hipótesis, no hubo diferencias significativas entre ninguno de los 3 parámetros a estudiar, en donde se planteó que existiría un aumento en la hipertrofia, fibrosis y lipofuscina, en el grupo inducido artificialmente con STZ, a mayor tiempo de inducida la diabetes por sobre el grupo control. Esto, puede deberse a que, en tiempos menores a las 12 semanas de estudio, existen mecanismos de readaptación metabólica en los individuo involucrados y los sistemas de contra regulación hormonal de glucosa²⁰⁰. Krog et al, tampoco obtuvieron diferencias significativas para la hipertrofia ni la fibrosis luego de 1 año de diagnosticada la diabetes. En cambio, Yu et al, obtuvieron cambios tanto de fibrosis como de la hipertrofia tras solo 24 semanas. Si bien, los índices de glucosa obtenido en las ratas inducidas demostraban tener valores de hiperglicemia²⁰¹ y con ello la necesidad de la administración de insulina, no fue suficiente para generar los cambios morfológicos esperados.

Estudios no invasivos como Inmunohistoquímica o western blot que permitan el análisis de los receptores de insulina o de GLUT 4 podrían explicar la disminución de la captación de glucosa en conjunto con el estado de los islotes pancreáticos tras una inducción de diabetes con estreptozotocina.

Una limitación en nuestro estudio fue no haber obtenido tejido pancreático desde el grupo 1 para ver el estado de daño generado por la diabetes a partir desde la primera semana y no desde las ultimas para tener un abanico de posibilidades y respuestas. Existen mecanismos adaptativos y naturales en el organismo que pudiesen compensar los cambios morfológicos como por ejemplo, la acción de la adiponectina planteada por Olimpo et al²⁰². Esta es una hormona producida específicamente por el tejido adiposo la cual aumenta cuando la sensibilidad de la insulina. Se caracteriza por poseer efectos protectores o antiaterogénicos como incrementar la fosforilación de receptores de insulina y, por ende, fomentar los efectos insulínicos. Así como en Yu et al, el tratamiento de células madres (MSC) alivio la hipertrofia del corazón diabético, creemos que la insulina hasta las semanas 12 apaciguo los posibles efectos que podrían haberse ocasionado en una rata diabética sin el tratamiento adecuado.

CONCLUSIONES

Como se ha mencionado a lo largo de esta tesis, sabemos que la diabetes y las enfermedades cardiacas están ampliamente estudiadas y relacionadas entre sí producto de los múltiples mecanismos que interaccionan entre ellos. Es un conjunto de mecanismos, receptores de membrana, diferentes tipos celulares que participan en los mecanismos de adaptación que generan un cambio en la morfología cardiaca, por ende, en el funcionamiento a largo plazo del corazón.

La aproximación que se llevó a cabo de los diferentes tiempos de tratamiento, sin hallazgos estadísticamente significativos, sirven como una aproximación a estudios futuros con mayor tiempo o prolongación para encontrar cambios morfológicos visibles y significativos. La inmunodetección y biología molecular permitirán profundizar mayormente en los agentes involucrados. Al igual que estudios de radicales libres y estados redox para ampliar el campo de los fenómenos involucrados en tan importante enfermedad metabólica como lo es la diabetes.

Se obtuvo un indicio de los cambios morfológicos que ocurren hasta la semana 12 en ratas diabéticas inducidas artificialmente por STZ. Si bien, los cambios no fueron representativos, queda nula nuestra hipótesis de estudio.

Se determinó la presencia de hipertrofia en todos los grupos en estudio acorde a su periodo, no discriminándola por tiempo. Se sugiere tiempos más prolongados de estudio por sobre las 12 semanas.

Se determinó la presencia de fibrosis en todos los grupos en estudio acorde a su periodo en estudio no discriminándola por tiempo. Se sugiere, al igual que en la hipertrofia, periodos de estudio por sobre las 12 semanas.

Se observó depósitos de LPF sin cambios entre grupos de estudio ni tiempos. Se sugiere buscar mecanismos directos de oxidación como otro parámetro a estudio.

ANEXOS

1. ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA-BEA072-16



CIBICA
Comité Institucional de Bioética para
la Investigación con Animales

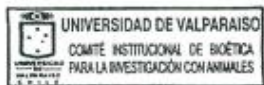
ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA BEA072-16

I. El Comité Institucional de Bioética para la investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso, en su sesión del 05 de enero de 2018, declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto BEA072-16 titulado "MUERTE CELULAR Y FIBROSIS EN MIOCARDIO DE RATAS CON DIABETES MELLITUS EXPERIMENTALMENTE INDUCIDA POR ESTREPTOZOTOCINA", del investigador responsable Dr. Rienzi Díaz, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Valparaíso.

II. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los antecedentes presentados en el formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN".

III. En la valoración bioética del proyecto, el Comité consideró adecuado los aspectos bioéticos indicados en el segundo punto Valoración de Aspectos Éticos del formulario "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACIÓN" y que se señalan en las páginas anexas a esta acta.

IV. Por lo anterior, el Comité Institucional de Bioética aprueba el protocolo experimental.



Edda Meléndez Pinto
Vicepresidenta

Comité Institucional de Bioética para Investigación la Investigación con Animales de
Experimentación (CIBICA)

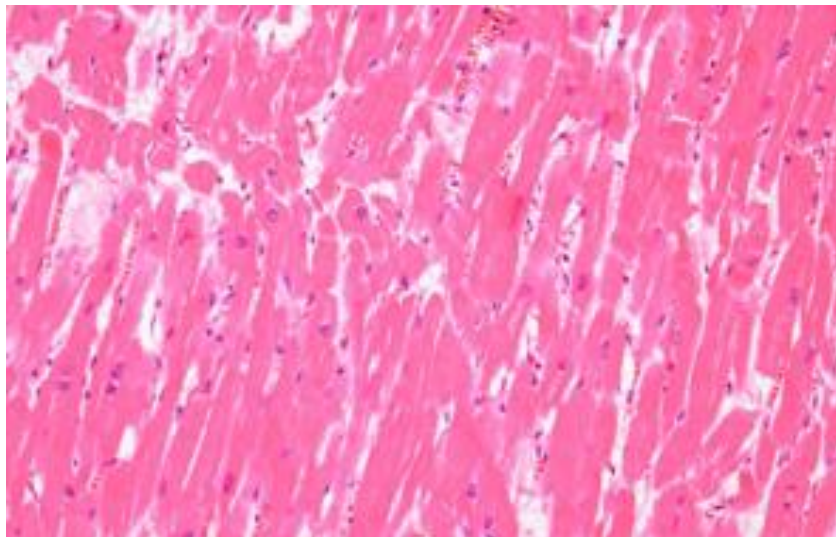
Valparaíso 05 de enero de 2018

2. PROTOCOLO DE TINCIÓN HISTOPATOLÓGICO

A. Tinción de rutina: Hematoxilina-eosina para estudio de hipertrofia.

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar en alcoholes descendentes
2. Tinción nuclear con Hematoxilina de harris por 30 segundos
3. Lavado en H2O corriente
4. Viraje
5. Tinción citoplasmática con eosina alcohólica (dipping)
6. Deshidratar en alcoholes ascendentes
7. Aclarar en xilol y montar



Muestra: control (+) de tejido cardiaco de muestra de corazón humano de paciente post mortem.

Resultados:

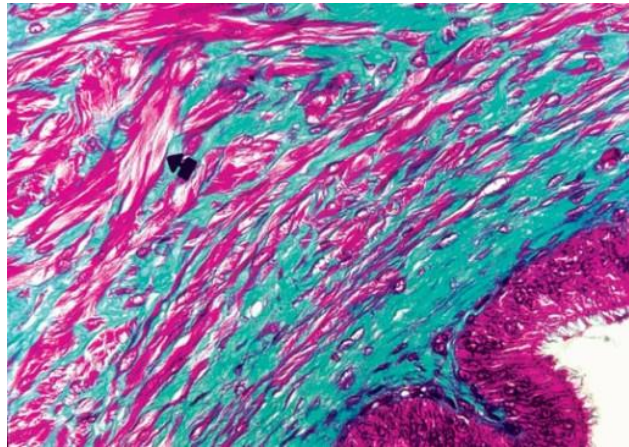
Núcleos: morado.

Citoplasmas: rosados

B. Tinción Tricrómico Masson para estudio de fibrosis

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar en alcoholes descendentes
2. Lavados en solución BOUIN en estufa por 1 hora.
3. Lavado en H₂O corriente
4. Tinción nuclear en hematoxilina de Weigert por 4 minutos
5. Viraje en H₂O corriente
6. Lavado en H₂O destilada
7. Tinción con briebrich scarlet por 3 minutos controlando al microscopio
8. Lavado en H₂O destilada
9. Tinción en ácido fosfotúngstico por 15 minutos.
10. Tinción con azul de anilina por 3 minutos.
11. Lavado en H₂O destilada
12. Deshidratar en alcoholes ascendentes
13. Aclarar en xilol y montar



Muestra: Control (+) del segmento epididimario del conducto deferente de un tumor de origen muscular. Flecha: estrato medio del conducto.

Resultados:

Núcleos: negro

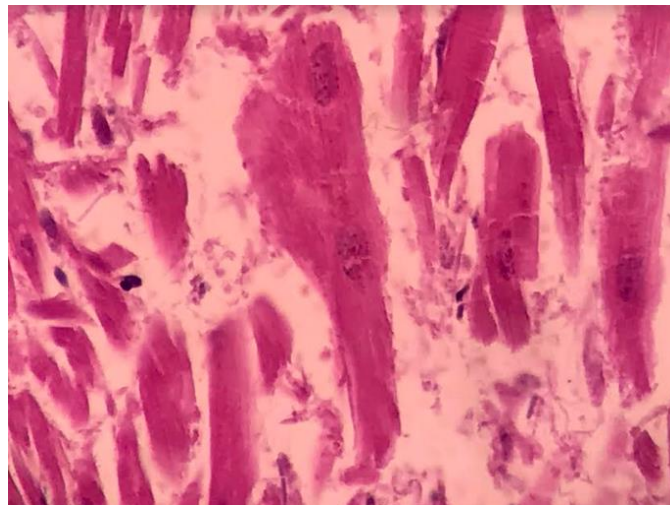
Citoplasmas: rosados

Fibras: azul

C. Tinción Lipofuscina PAS-Ziehl neelsen para estudio de lipofuscina

Protocolo:

1. Desparafinar e hidratar
2. Tinción con carbol fucsina 1 hora
3. 2 lavados con H2O destilada
4. Solución OH ácido al 0,5% 1 dipping
5. Lavado en H2O corriente por 5 minutos
6. Lavado en H2O destilada
7. Tinción nuclear con hematoxilina de harris por 30 segundos
8. Lavado en H2O corriente
9. Deshidratar en alcoholes descendentes
10. Aclarar en xilol y montar



Muestras: control (+) de depósito de Lipofuscina en tejido cardiaco humano de una muestra post mortem.

Resultados:

Lipofuscina: depósitos citoplasmáticos ovalados color fucsia

Núcleos: morado.

Citoplasmas: rosados

BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Dajani R, Khader YS, Fatahallah R, El-Khateeb M, Shiyab AH, Hakooz N. Diabetes mellitus in genetically isolated populations in Jordan: prevalence, awareness, glycemic control, and associated factors. *Journal of Diabetes and its Complications*; 2012;26(3):175–80. pmid:22502937
- ² Lin X, Xu Y, Pan X. et al. Global, regional, and national burden and trend of diabetes in 195 countries and territories: an analysis from 1990 to 2025. *Sci Rep* 2020;10, 14790).
- ³ Shaw JE, Sicree RA, Zimmet PZ. Global estimates of the prevalence of diabetes for 2010 and 2030. *Diabetes research and clinical practice*; 2010;87(1):4–14. pmid:19896746
- ⁴ National Kidney foundation. [Internet]. Diabetes: Los ojos, el corazón, los nervios, los pies y los riñones. [citado 25 de julio del 2020]. Disponible en: <https://www.kidney.org/node/26901>
- ⁵ American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes 2014. *Diabetes Care* 2014; 37(Suppl 1): S1480
- ⁶ Instituto nacional del cáncer. [Internet]. [citado 24 de abril del 2019]. Disponible en: <https://www.cancer.gov/espanol/publicaciones/diccionario/def/insulina>.
- ⁷ Al-Dallen S, Chavez T, Martínez G, Ferreira E, León O. El equilibrio redox en la Diabetes y sus complicaciones. *Acta Farm Bonaerense* 2014;23 (2): 231-42.
- ⁸ American Diabetes Association (ADA). Standards of medical care in diabetes 2014. *Diabetes Care* 2014; 37 (Suppl 1): S1480.
- ⁹ Informe mundial sobre la diabetes. [Internet]. Organización mundial de la salud. [citado 12 de abril del 2020]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=08770CE551BF0AEB8839E9D116A3750B?sequence=1>.
- ¹⁰ Salpeter SR, Greyber E, Pasternak GA, Salpeter EE. Risk of fatal and nonfatal lactic acidosis with metformin use in type 2 diabetes mellitus: systematic review and meta-analysis. *Archives of internal medicine*; 2003;163(21):2594–602. pmid:14638559
- ¹¹ Nathan DM, Buse JB, Davidson MB, Ferrannini E, Holman RR, Sherwin R, et al. Medical management of hyperglycemia in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the

initiation and adjustment of therapy: a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes. *Diabetes care*; 2009;32(1):193–203. pmid:18945920

¹² Shrivastava SR, Shrivastava PS, Ramasamy J. Role of self-care in management of diabetes mellitus. *Journal of Diabetes & Metabolic Disorders*; 2013;12(1):14.

¹³ Goday A, Franch J, Goday M, Mata F, Álvarez J, Díez I, Fernández D, Tórtola D, et al. La terapia combinada en la diabetes mellitus tipo 2. Criterios y pautas. Documento de consenso del proyecto COMBO. 2001;Vol. 27. Núm. 3. 28 de febrero.

¹⁴ NIH: Instituto Nacional de la Diabetes y Enfermedades Digestivas y Renales. [internet]. Medline Plus. [citado 21 de noviembre del 2020]. Disponible en: <https://medlineplus.gov/spanish/a1c.html>

¹⁵ A. Barquilla García , J.J. Mediavilla Bravo, J.M. Comas Samper, M. Seguí Díaz, F. Carramiñana Barrera, F.J. Zaballos Sánchez. Recommendations of the American Diabetes Association for the management of diabetes mellitus. 2010; Vol. 36. Núm. 7. páginas 386-391

¹⁶ Informe mundial sobre la diabetes. [Internet]. Organización mundial de la salud. [citado 12 de abril del 2020]. Disponible en: <https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/254649/9789243565255-spa.pdf;jsessionid=08770CE551BF0AEB8839E9D116A3750B?sequence=1>

¹⁷ Ferraro M, Ramos O, Strasnoy I. Diabetes - Diabetes mellitus tipo 1. Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Criterios de diagnóstico y tratamiento en Pediatría. Buenos Aires: Ediciones Journal, 2012; Vol. 4 (1): 1- 60

¹⁸ Ferraro M, Ramos O, Strasnoy I. (2013). Diabetes - Diabetes mellitus tipo 1. Hospital General de Niños Pedro de Elizalde. Criterios de diagnóstico y tratamiento en Pediatría. Buenos Aires: Ediciones Journal, 2012; Vol. 4 (1): 1- 60

¹⁹ Diabetes tipo 2. [Internet]. American Diabetes Association. [citado 25 de julio del 2020]. Disponible en: https://professional.diabetes.org/sites/professional.diabetes.org/files/media/Type_2_Spanish.pdf.

²⁰ Diabetes mellitus tipo 2. [Internet]. [citado 25 de julio del 2020]. Disponible en: <https://www.coflugo.org/docs/2019-infografia-diabetes-abordaje-multidisciplinar.pdf>.

-
- ^{21 21} Reyes F, Pérez M, Figueredo E, Ramírez M, Estupiñan, Jiménez Y. Tratamiento actual de la diabetes mellitus tipo 2. Scielo. Correo Científico Médico. *versión On-line* ISSN 1560-4381. 2020 ccm vol.20 no.1 Holguín ene.-mar.
- ²² Guerin A, Nisenbaum R, Ray JG Use of maternal GHb concentration to estimate the risk of congenital anomalies in the offspring of women with prepregnancy diabetes. *Diabetes Care*; 2007;30(7):1920-5.
- ²³ Guía de diabetes y embarazo, MINSAL. Modificado de: Guidelines for management of Neonatal Hypoglycemia, 2013 Update. Care Process Model.
- ²⁴ Damasceno D, Netto A, Lessi I, Gallego, Corvino A, Dallaqua B, Sinzato Y, Bueno A, Calderon I, Rudge M. Streptozotocin-Induced Diabetes Models: Pathophysiological Mechanisms and Fetal Outcomes. Hindawi Publishing Corporation. *BioMed Research International*. Article ID 819065, 2014;11 pages.
- ²⁵ Rose, Kaye, Pawlina. *Histología, Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. 2005;Capítulo 17: pags 553-556.
- ²⁶ Slack J. Developmental biology of the pancreas. *Development*, 1995;vol. 121, no. 6, pp. 1569–1580.
- ²⁷ Barret K. Barman S. Boitano S. Brooks H. Ganong Fisiología Médica. McGrawHill. México: 2010.
- ²⁸ Wieczorek G, Pospischil A, Perentes E. A comparative immunohistochemical study of pancreatic islets in laboratory animals (rats, dogs, minipigs, nonhuman primates),” *Experimental and Toxicologic Pathology*, 1998;vol. 50, no. 3, pp. 151–172.
- ²⁹ Yukawa M, Takeuchi T, Watanabe T, Kitamura S. Proportions of various endocrine cells in the pancreatic islets of wood mice (*Apodemus speciosus*), *Anatomia, Histologia, Embryologia*, 1999;vol. 28, no. 1, pp. 13–16.
- ³⁰ Rincón A, Islas, M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.
- ³¹ Rincón A, Islas, M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.
- ³² Rincón A, Islas, M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.
- ³³ Wang C, Hess C, Hiatt W, Goldfine A. Clinical Update: Cardiovascular Disease in

Diabetes Mellitus Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2 Diabetes Mellitus – Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation* 2016;133:2459–2502.

³⁴ Histología del páncreas. [internet] [citado 2 de agosto del 2020]. Disponible en: http://wzar.unizar.es/acad/histologia/paginas_hg/03_GIEndo/GIEIslote_40.htm.

³⁵ Rincón A, Islas M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.

³⁶ Bartnik M, Malmberg K, Ryden L. Managing heart disease. Diabetes and the heart: compromised myocardial function– a common challenge. *Eur Heart J Supplements* 2003; 5: B33-B41.

³⁷ Solang L, Malmberg K, Ryden L. Diabetes mellitus and congestive heart failure. Further knowledge needed. *Eur Heart J*; 1999;20: 789-95.

³⁸ Rincón A, Islas, M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.

³⁹ Rincón A, Islas, M. Capítulo 22: Bases moleculares de la diabetes mellitus. *Biología Molecular*. Mc Graw Hill. Pags 207-211.

⁴⁰ Ullrich A, Bell JR, Chen EY. Human insulin receptor and its relationship to the tyrosine kinase family of oncogenes. *Nature*; 1985;313:756-61.

⁴¹ Shoelson SE, White MF, Kahn CR. Tryptic activation of the insulin receptor. Proteolytic truncation of the alfa-subunit releases the beta-subunit from inhibitory control. *J Biol Chem*; 1998;263:4852-60.

⁴² Pirola L, Johnston AM, Van Obberghen E. Modulation of insulin action. *Diabetologia*; 2004;47:170-84

⁴³ Riehle, C., & Abel, E. D. Insulin Signaling and Heart Failure. *Circulation research*, 2016;118(7), 1151–1169.

⁴⁴ Kadowaki T, Kubota N, Ueki K, Yamauchi T. Snapshot: Physiology of insulin signaling. *Cell*; 2012;148:834–834. e831.

⁴⁵ Kadowaki T, Ueki K, Yamauchi T, Kubota N. Snapshot: Insulin signaling pathways. *Cell*; 2012;148:624. 624 e621.

⁴⁶ DeBosch B, Sambandam N, Weinheimer C, Courtois M, Muslin AJ. Akt2 regulates cardiac metabolism and cardiomyocyte survival. *The Journal of biological chemistry*; 2006;281:32841–32851.

-
- ⁴⁷ Goday A, Matas M. La terapia combinada en la diabetes mellitus tipo 2. Criterios y pautas. *Medicina Integral*, 2001;Vol. 38, Núm. 6.
- ⁴⁸ Eurich DT, Weir DL, Majumdar SR, Tsuyuki RT, Johnson JA, Tjosvold L, Vanderloo SE, McAlister FA. Comparative safety effectiveness of metformin in patients with diabetes mellitus and heart failure: Systematic review of observational studies involving 34,000 patients. *Circulation. Heart failure*; 2013;6:395-402
- ⁴⁹ Masouminia M, Gelfand R, Kovanecz I, Vernet D, Tsao J, Salas R, et al. Dyslipidemia is a major factor in Stem cell damage induced by uncontrolled long-term type 2 diabetes and obesity in the rat, as suggested by the effects on Stem cell culture. *J Sex Med*. December; 2018;15(12): 1678-1697.
- ⁵⁰ Houssay B, Penhos J. Pancreatic diabetes and hypophysectomy in the snake *Xenodon merremii*. *Acta Endocrinol*, 1960;35:313-323
- ⁵¹ Casado M. Modelos animales en el estudio de la diabetes. *Av Diabetol*; 2007;23:432-8.
- ⁵² Carrasco I, Moller, Giachinic V, Toledo F, Stojanovae J, Sobreviaf L, San Martin S Placental structure in gestational diabetes mellitus. Elsevier 2019.
- ⁵³ Reruo C. Drugs producing diabetes through damage of the insuline secreting cells. *Pharmacol. Rev.*, 1970;22(4):485-518.
- ⁵⁴ Goldner M, Gomori G. Alloxan diabetes. *Proc Am. Diabetes Association*. 1968;4:87-110, 1944.
- ⁵⁵ Brosky, G, Logothetopoulos J. Streptozotocin induced diabetes in the mouse and guinea pig. *Fed. Proc.*, 27:547.
- ⁵⁶ Yong QC, Thomas CM, Seqqat R, Chandel N, Baker KM, Kumar R. Angiotensin type 1 a receptor-deficient mice develop diabetes-induced cardiac dysfunction, which is prevented by renin-angiotensin system inhibitors. *Cardiovasc Diabetol*; 2013;12:169.
- ⁵⁷ Casado M. Modelos animales en el estudio de la diabetes. *Av Diabetol*; 2007;23:432-8.
- ⁵⁸ William P. Feeney. [citado 9 abril del 2019]. The Chinese or Striped-Back Hamster Disponible en: <https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/streptomyces-achromogenes>
- ⁵⁹ Skudelski, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Minirevoew. Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546

-
- ⁶⁰ Turk J, Corbett JA, Ramanadhams S, Bohrer A, McDaniel ML. Biochemical evidence for nitric oxide formation from streptozotocin in isolated pancreatic islets. *Biochem Biophys Res Commun* 1993;197: 1458-1464.
- ⁶¹ Kroncke KD, Fehsek K, Sommer A, Rodriguez ML, Kolb-Bachofen V. Nitric oxide generation during cellular metabolism of the diabetogenic N-methyl-N-nitroso-urea streptozotocin contributes to islet cell DNA damage. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995;376: 179-185.
- ⁶² Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 1991;40: 1141-1145.
- ⁶³ Bedoya F, Solano F, Lucas M. N-monomethyl-arginine and nicotinamide prevent streptozotocin-induced double strand DNA break formation in pancreatic rat islets. *Experientia* 1996;52: 344-347
- ⁶⁴ Skudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Minireview. Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546
- ⁶⁵ Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Importance of the concentration of ATP in rat pancreatic beta cells in the mechanism of streptozotocin-induced cytotoxicity. *J Endocrinol* 1990;127: 161-165.
- ⁶⁶ Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn* 1990;13: 259-262.
- ⁶⁷ Nukatsuka M, Yoshimura Y, Nishida M, Kawada J. Allopurinol protects pancreatic beta cells from the cytotoxic effect of streptozotocin: in vitro study. *J Pharmacobiodyn* 1990;13: 259-262.
- ⁶⁸ Takasu N, Komiya I, Asawa T, Nagasawa Y, Yamada T. Streptozotocin- and alloxan-induced H₂O₂ generation and DNA fragmentation in pancreatic islets. H₂O₂ as mediator for DNA fragmentation. *Diabetes* 1991;40: 1141-1145.
- ⁶⁹ Schnedl WJ, Ferber S, Johnson J, Newgard C. STZ transport and cytotoxicity. Specific enhancement in GLUT2-expressing cells. *Diabetes* 1994;43: 1326-1333.
- ⁷⁰ Wang Z, Gleichmann H. GLUT2 in pancreatic islets: crucial target molecule in diabetes induced with multiple low doses of streptozotocin in mice. *Diabetes* 1998;47: 50-56.
- ⁷¹ Yakamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand

breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981;294: 284-286.

⁷² Yakamoto H, Uchigata Y, Okamoto H. Streptozotocin and alloxan induce DNA strand breaks and poly(ADP-ribose) synthetase in pancreatic islets. *Nature* 1981;294: 284-286.

⁷³ Morgan N, Cable H, Newcombe N, Williams G. Treatment of cultured pancreatic B-cells with streptozotocin induces cell death by apoptosis. *Biosci Rep* 1994;14: 243-250.

⁷⁴ Delaney C, Dunger, A, Di Matteo M, Cunningham J, Green M, Green I. Comparison of inhibition of glucose-stimulated insulin secretion in rat islets of Langerhans by streptozotocin and methyl and ethyl nitrosoureas and methanesulphonates. Lack of correlation with nitric oxide-releasing or O6-alkylatingability. *Biochem Pharmacol* 1995;50: 2015-2020.

⁷⁵ Elsner M, Guldbakke B, Tiedge M, Munday R, Lenzen S. Relative importance of transport and alkylation for pancreatic beta-cell toxicity of streptozotocin. *Diabetologia* 2000;43: 1528-1533.

⁷⁶ Ho E, Chen G, Bray T. Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NF kappa B activation offering protection against chemically induced diabetes. *Free Radic Biol Med*; 2000;28(4):604-14.

⁷⁷ Agius C, Gidari A. Effect of streptozotocin on the glutathione s-transferases of mouse liver cytosol. *Biochem. Pharmacol.*, 1985;34:811-819

⁷⁸ Bennett R, Pegg A. Alkylation of DNA in rat tissues following administration of streptozotocin. *Cancer Res* 1981;41: 2786-2790.

⁷⁹ West, E., Simon, OR., Morrison, EY. Streptozotocin alters pancreatic beta-cell responsiveness to glucose within six hours of injection into rats. *West Indian Med J* 1996;45: 60-62

⁸⁰ Skudelski, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Minireview. *Physiol. Res.* 2001;50: 536-546

⁸¹ Skudelski, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Minireview. *Physiol. Res.* 2001;50: 536-546

⁸² Skudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. Minireview. *Physiol. Res.* 2001; 50: 536-546

⁸³ Foglia V, Rodrigue R, Schuster N. Influence of sex in rat diabetes. *Proc. Am Diabetes Assoc.*, 1946;6:511-513.

-
- ⁸⁴ Foglia V, Rodrigue R, Schuster N. Influence of sex in rat diabetes. *Proc. Am Diabetes Asoc.*, 1946;6:511-513.
- ⁸⁵ Rose, Kaye, Pawlina. *Histología, Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. 4ta edición. 2005;Capítulo 16: pags 345-346.
- ⁸⁶ Rose, Kaye, Pawlina. *Histología, Texto y atlas color con Biología Celular y Molecular*. 4ta edición. 2005;Capítulo 16: pags 345-346.
- ⁸⁷ Harwood HJ Jr, Listrani P, Wagner JD. Nonhuman primates and other animal models in diabetes research. *J Diabetes Sci Technol*; 2012;6(3):503–514.
- ⁸⁸ Liang F, Gardner DG. Mechanical strain activates BNG gene transcription through a p38/NF-kappaB-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 1999;104:1603-12
- ⁸⁹ Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target? *Circulation*. 2004;109:1580-9
- ⁹⁰ Fang ZY, Yuda S, Anderson V, Short L, Case C, Marwick TH. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *J Am Coll Cardiol*; 2003;41: 611–617.
- ⁹¹ Levelt E, Mahmood M, Piechnik SK, Ariga R, Francis JM, Rodgers CT, Clarke WT, Sabharwal N, Schneider JE, Karamitsos TD, Clarke K, Rider OJ, Neubauer S. Relationship between left ventricular structural and metabolic remodeling in type 2 diabetes. *Diabetes*; 2016;65:44–52.
- ⁹² Ferrara R, Guardigli G, Ferrari R. Understanding patient needs. Myocardial metabolism: the diabetic heart. *Eur Heart J Supplements*; 2003;5: B15-B18
- ⁹³ Fonarow GC. Managing the patient with diabetes mellitus and heart failure: issues and considerations. *Am J Med*; 2004;116:76S88S.
- ⁹⁴ Basta G, Schmidt AM, De Caterina R. Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovasc Res*; 2004;63:582–592.
- ⁹⁵ Waddingham MT, Edgley AJ, Tsuchimochi H, Kelly DJ, Shirai M, Pearson JT. Contractile apparatus dysfunction early in the pathophysiology of diabetic cardiomyopathy. *World J Diabetes*; 2015;6:943–960.
- ⁹⁶ Hunter JJ, Chien KR. Signaling pathway for cardiac hypertrophy and failure. *N Engl J Med* 1999;341:1276-1283.
- ⁹⁷ Wang C, Hess C, Hiatt W, Goldfine A. Clinical Update: Cardiovascular Disease in Diabetes Mellitus Atherosclerotic Cardiovascular Disease and Heart Failure in Type 2

Diabetes Mellitus – Mechanisms, Management, and Clinical Considerations. *Circulation*; 2016;133:2459–2502.

⁹⁸ Liu Q, Wang S, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *J Diabetes Invest*; 2014;5: 623–634.

⁹⁹ Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia M. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *Am J Med*. 2008; 121:748-57.

¹⁰⁰ Hu X, Bai T, Xu Z, Liu Q, Zheng Y, Cai L. Pathophysiological Fundamentals of Diabetic Cardiomyopathy. *Compr Physiol*; 2017;7:693-711.

¹⁰¹ Liu Q, Wang S, Cai L. Diabetic cardiomyopathy and its mechanisms: Role of oxidative stress and damage. *J Diabetes Invest* 2014; 5: 623–634.

¹⁰² 123RF. [citado 11 abril 2019]. Disponible en: <http://es.123rf.com/clipart-vectorizado/diabetico.html>. [citado 11 abril 2019]

¹⁰³ Dunlay, S., Givertz, M., Aguilar., et al. Type 2 diabetes Mellitus and Heart Failure. A scientific Statement from the American Heart Association and the Heart failure Society of America. *Aha Scientific Statement*. 2017.

¹⁰⁴ Regan TJ, Lyons MM, Ahmed SS, et al. Evidence for cardiomyopathy in familial diabetes mellitus. *J Clin Invest*. 1977; 60:884–899.

¹⁰⁵ Westermann D, Rutschow S, Ja“ger S, et al. Contributions of inflammation and cardiac matrix metalloproteinase activity to cardiac failure in diabetic cardiomyopathy: the role of angiotensin type 1 receptor antagonism. *Diabetes*; 2007;56: 641–646.

¹⁰⁶ Predictores y prevención de la miocardiopatía diabética (DCM). [internet]. Departameto de Fisiología y Biofísica de la Facultad de medicina, Universidad de Louisville, Kentucky, EE.UU. [citado 11 abril 2019]. disponible en: <https://es.slideshare.net/airamsaavedramejia/predictores-y-prevencion-de-la-miocardiopata-diabticadcm>

¹⁰⁷ Navarro, J., Vinocour, M. (2019) Cardiomiopatía diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*. V.9 N.1: 11-27 ISSN-2215 2741.

-
- ¹⁰⁸ Rubler S, Duglash J, Yuceoglu YZ, Kumral T, Brandwood AW, Grisham A. New type of cardiomyopathy associated with diabetic glomerulosclerosis. *Am J Cardiol*; 1972;30: 595-602.
- ¹⁰⁹ Hamby WS, Zoneraich S, Sherman L. Diabetic cardiomyopathy. *JAMA*; 1974;229: 1749-54.
- ¹¹⁰ Donnelly R, Emslie-Smith A, Gardner I, et al. Vascular complications of diabetes. *BMJ*; 2000;320: 1062-1066.
- ¹¹¹ Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia M. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *Am J Med*; 2008;121:748-57.
- ¹¹² Ministerio de Salud. Departamento de Estadísticas e Información en Salud. Disponible en: <http://deis.minsal.cl> [Consultado el 20 mayo 2008].
- ¹¹³ Organización Mundial de la Salud. [internet]. Informe sobre la salud en el mundo 2002: Reducir los riesgos y promover una vida sana. Ginebra: OMS; 2002. [citado 12 mayo 2008]. Disponible en: <http://www.who.int/wlir/2002/es/index.html>
- ¹¹⁴ Marrugat J, Solanas P, D'Agostino RB, Sullivan L, Ordovas J, Cerdán F, et al. Estimación del riesgo coronario en España mediante la ecuación de Framingham calibrada. *Rev Esp Cardiol*; 2003;56: 253-61.
- ¹¹⁵ Liu J, Hong Y, D'Agostino RB, Wu Z, Wang W, Sun J, et al. Predictive value for the Chinese population of the Framingham CHD risk assessment tool compared with the Chinese multi-provincial cohort study. *JAMA*; 2004;291: 2591-9.
- ¹¹⁶ Anderson K, Wilson PW, Odell P, Kannel WB. An updated Coronary Risk Profile. A Statement for Health Professionals. *Circulation*; 1991;83: 356-62.
- ¹¹⁷ Wilson PW, D'Agostino RB, Levy D, Belanger A, Silbershatz H, Kannel WB. Prediction of coronary heart disease using risk factor categories. *Circulation*; 1998;97: 1837-47.
- ¹¹⁸ La enfermedad coronaria y su relación con la diabetes. Fuente: Bayer Diabetes Care. [internet]. Autor: Íñigo Espinar Vicario, Enfermero en el Hospital Saint George en Londres. [citado 2 abril 2019]. Disponible en: <http://fmdiabetes.org/la-enfermedad-coronaria-y-su-relacion-con-la-diabetes/>
- ¹¹⁹ La enfermedad coronaria y su relación con la diabetes. OMENT: Observatorio mexicano de las enfermedades no transmisibles. [citado el 2 abril 2019]. Disponible en: <http://oment.uanl.mx/la-enfermedad-coronaria-y-su-relacion-con-la-diabetes/>

-
- ¹²⁰ Marín-García J, Goldenthal M. La mitocondria y el corazón. The Molecular Cardiology and Neuromuscular Institute. *Rev Esp Cardiol*; 2002;55(12):1293-310
- ¹²¹ McIntyre T, Hazen S. Lipid oxidation and cardiovascular disease: introduction to a review series. *Circ. Res.*, 2010;107; 1167-1169.
- ¹²² Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, and Taegtmeyer H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 200418: 1692–1700.
- ¹²³ Navarro J, Vinocour M. Cardiomiopatía diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Revista Clínica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*. 2019;V.9 N.1:11-27.
- ¹²⁴ Pieper G, Dembny K, Siebeneich W. *Diabetol*. 1998;41: 1220-6.
- ¹²⁵ Tilton R, Kawamura K, Chang J. *J. Clin. Invest.* 1997;99: 2192-202
- ¹²⁶ Aneja A, Tang WH, Bansilal S, Garcia M. Diabetic Cardiomyopathy: Insights into Pathogenesis, Diagnostic Challenges, and Therapeutic Options. *Am J Med*. 2008; 121:748-57.
- ¹²⁷ Brahma M, Pepin M, Wende A. (2017). My Sweetheart Is Broken: Role of Glucose in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J*; 2017;41: 1–9
- ¹²⁸ Brahma M, Pepin M, Wende A. (2017). My Sweetheart Is Broken: Role of Glucose in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J*; 2017;41: 1–9
- ¹²⁹ Brahma M, Pepin M, Wende A. My Sweetheart Is Broken: Role of Glucose in Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Metab J*; 2017;41: 1–9
- ¹³⁰ Acar E, Ural D, Bildirici U, Şahin T, Yılmaz I. Diabetic cardiomyopathy. *Anadolu Kardiyol Derg* 2011; 11: 732-7.
- ¹³¹ Niemann B, Rohrbach S, Miller MR, Newby DE, Fuster V, Kovacic JC. Oxidative Stress and Cardiovascular Risk: Obesity, Diabetes, Smoking, and Pollution Part 3 of a 3-Part Series. *J Am Coll Cardiol*; 2017;70:230–51.
- ¹³² Paneni F, Beckman J, Creager M. Diabetes and vascular disease: pathophysiology, clinical consequences, and medical therapy: part I. *Eur Heart J*; 2013;34:2436-43.
- ¹³³ Jia G, Whaley-Connell A, Sowers JR. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*. 2018;61:21-28
- ¹³⁴ Jia G, Hill MA, Sowers JR. (2018). Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and

insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*. 2018;61:21-28

¹³⁵ Jia G, Whaley-Connell A, Sowers A. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin-resistance-induced heart disease. *Diabetologia*. 2018;61:21-28

¹³⁶ Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*. 2018;122:624-638

¹³⁷ Jia G, Hill MA, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy An Update of Mechanisms Contributing to This Clinical Entity. *Circ Res*. 2018;122:624-638

¹³⁸ Shah M, Brownlee M. (2016). Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res*. 118:1808-29

¹³⁹ Navarro J, Vinocour M. Cardiomiopatia diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Revista Clinica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*. 2019;V.9 N.1:11-27.

¹⁴⁰ Navarro J, Vinocour M. Cardiomiopatia diabética: entidad poco conocida y el impacto terapéutico de los inhibidores del cotransportador sodio-glucosa tipo 2 en el miocardio diabético. *Revista Clinica de la Escuela de Medicina UCR-HSJD*. 2019;V.9 N.1:11-27.

¹⁴¹ Baraka, A, AbdelGawad, H. Targeting Apoptosis in the heart of Streptozotocin-induced diabetic rats. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics* 2015;15 (2): 175-181.

¹⁴² Huynh K, Bernardo BC, McMullen JR, et al. Diabetic cardiomyopathy: mechanisms and new treatment strategies targeting antioxidant signaling pathways. *Pharmacol Ther*; 2014;142(3):375-415.

¹⁴³ Shah M, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res*. 2016; 118:1808-29.

¹⁴⁴ After D, Marks A, Smith C. *Basic Medical Biochemistry: A Clinical Approach*. Williams & Wilkins. 1996;P.331.

¹⁴⁵ Shah M, Brownlee M. Molecular and Cellular Mechanisms of Cardiovascular Disorders in Diabetes. *Circ Res*. 2016; 118:1808-29.

¹⁴⁶ Jia G, Whaley-Connell A, Sowers A. Diabetic cardiomyopathy: a hyperglycaemia and insulin resistance induced heart disease. *Diabetología*. 2018; 61:21-28.

¹⁴⁷ Jia G, Hill M, Sowers JR. Diabetic Cardomyopathy An Update of Mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ. Res*; 2018;122:624-638.

¹⁴⁸ Gilca GE, Stefanescu G, Badulescu O, Tanase DM, Bararu I, Ciocoiu M. Diabetic

Cardiomyopathy: Current Approach and Potential Diagnostic: 2007;1310265.

¹⁴⁹ Jia G, Hill M, Sowers JR. Diabetic Cardiomyopathy An Update of Mechanisms contributing to this clinical entity. *Circ. Res*; 2018;122:624-638.

¹⁵⁰ Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, and Taegtmeyer H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004;18: 1692–1700.

¹⁵¹ Young M, Laws F, Goodwin G, Taegtmeyer, H. Reactivation of peroxisome proliferator-activated receptor alpha is associated with contractile dysfunction in hypertrophied rat heart. *J. Biol. Chem.* 2001;276, 44390–44395

¹⁵² Finck B, Han X, Courtois M, Aimond F, Nerbonne, J. Kovacs A, Gross R, Kelly D. A critical role for PPARalpha-mediated lipotoxicity in the pathogenesis of diabetic cardiomyopathy: modulation by dietary fat content. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003;100, 1226–1231

¹⁵³ Mann D. Tumor necrosis factor-induced signal transduction and left ventricular remodeling. *J. Card. Fail.* 2002; 8, S379–S386

¹⁵⁴ Unger R. The physiology of cellular liporegulation. *Annu. Rev. Physiol.* 2003;65, 333–347.

¹⁵⁵ Listenberger L, Schaffer J. Mechanisms of lipoapoptosis: implications for human heart disease. *Trends Cardiovasc. Med.* 2002;12, 134–138

¹⁵⁶ Zhou Y, Grayburn P, Karim A, Shimabukuro M, Higa M, Baetens D, Orci L, Unger R. Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000;97, 1784–1789

¹⁵⁷ Sharma S, Adroque JV, Golfman L, Uray I, Lemm J, Youker K, Noon GP, Frazier OH, and Taegtmeyer H. Intramyocardial lipid accumulation in the failing human heart resembles the lipotoxic rat heart. *FASEB J* 2004;18: 1692–1700.

¹⁵⁸ Double K et al. The comparative biology of neuromelanin and lipofuscin in the human brain. *Cell Mol. Life Sci.* 2018;65, 1669–1682.

¹⁵⁹ Jolly R, Douglas B, Davey P, Roiri J. Lipofuscin in bovine muscle and brain: a model for studying age pigment. *Gerontology* 41 (Suppl 2), 1995;283–295.

¹⁶⁰ Höhn A, Grune T. Lipofuscin: formation, effects and role of macroautophagy. *Redox Biol* 2013;1:140-4.

¹⁶¹ Rattan SI, Keeler KD, Buchanan JH, Holliday R. Autofluorescence as an index of

ageing in human fibroblasts in culture. *Biosci Rep* 1982;2:561-7.

¹⁶² Di Guardo G. Lipofuscin, Lipofuscin-like pigments and autofluorescence. *European journal of Histochemistry*; volumen 2015;59: 2485.

¹⁶³ Del Roso, A., De Tata, V., Gori, Z., Bergamini, E. Transmural differences of lipofuscin pigment accumulation in the left ventricle of rat heart during growth and aging. *Aging* 1991;3: 19-23.

¹⁶⁴ Höhn A, Jung T, Grimm S, Grune T. Lipofuscin-bound iron is a major intracellular source of oxidants: role in senescent cells. *Free Radic Biol Med*; 2010;48:1100-8.

¹⁶⁵ Cindrova T, Fogarty N, Jones C, Kingdom J. Evidence of oxidative stress-induced senescence in mature, post-mature and pathological human placentas. *Placenta* 2018;68:15-22.

¹⁶⁶ Brunk U, Jones C, Sohal R. A novel hypothesis of lipofuscinogenesis and cellular aging based on interactions between oxidative stress and autophagocytosis. *Mutat. Res.* 1992;275, 395-403.

¹⁶⁷ Terman A, Dalen H, Eaton J, Neuzil J, Brunk U. T. Aging of cardiac myocytes in culture: oxidative stress, lipofuscin accumulation, and mitochondrial turnover. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2004;1019, 70-77.

¹⁶⁸ König J, Ott C, Hugo M, Jung T, Bulteau A, Grune T, Höhn A. Mitochondrial contribution to lipofuscin formation. *Redox biology*, 2017;11, 673-681.

¹⁶⁹ Krog S, Ludvigsen T, Nielsen O, Kirk R, Lykkegaard K, Wulff, E, Olsen L. Myocardial Changes in Diabetic and Nondiabetic Nonhuman Primates. *Veterinary Pathology*. 2020.

¹⁷⁰ Guardo GD. Lipofuscin like pigments and autofluorescence. *Eur J Histochem*: 2015;59 (1):2485.

¹⁷¹ Sohal R, Marzadabi M, Galaris D, Brunk UT. Effect of ambient oxygen concentration on lipofuscin accumulation in cultured rat heart myocytes – a novel in vitro model of lipofuscinogenesis. *Free Radic Biol Med* 1989;6: 23-30.

¹⁷² Marzadabi M, Sohal R, Brunk U. Mechanisms of lipofuscinogenesis: effect of the inhibition of lysosomal proteinases and lipases under varying concentration of ambient oxygen in cultured rat neonatal myocardial cells. *APMIS* 1991;99: 416-426.

¹⁷³ Ostadalova I, Chavatova Z, Wilhem J. Lipofuscin-Like Pigments in the Rat Heart During Early Postnatal Development: Effect of Selenium Supplementation. *Physiol. Res.* 2010;59: 881-886.

¹⁷⁴ Krog S, Ludvigsen T, Nielsen O, Kirk R, Lykkegaard K, Wulff E, Møller J, Pedersen H, Olsen L. Myocardial Changes in Diabetic and Nondiabetic Nonhuman Primates. *Veterinary Pathology*. 2020;I-12.

¹⁷⁵ Zhao Y, Li S, Quan E, Zhang H, Wu Y, Luo Y, Wang J, Zhu J, Liu J. Trimetazidine inhibits cardiac fibrosis by reducing reactive oxygen species and downregulating connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and therapeutic medicine* 2019;18:1477-1485.

¹⁷⁵ Zhao Y, Li S, Quan E, Zhang H, Wu Y, Luo Y, Wang J, Zhu J, Liu, J. Trimetazidine inhibits cardiac fibrosis by reducing reactive oxygen species and downregulating connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and therapeutic medicine* 2019;18:1477-1485.

¹⁷⁸ J. Arias-Díaz y J. Balibrea. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición hospitalaria*. Universidad complutense de Madrid. 2007;vol.22 no.2.

¹⁷⁹ J. Arias-Díaz y J. Balibrea. Modelos animales de intolerancia a la glucosa y diabetes tipo 2. *Nutrición hospitalaria*. Universidad complutense de Madrid. 2007;vol.22 no.2.

¹⁸⁰ M Consuelo Figueroa G, M.Sc, Ismael H Pérez H, M.Sc, Ricardo Mejía Z,* Ph.D. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev.MVZ Córdoba* 2013; 18(Supl):3699-3707.

¹⁸¹ Justil C, Angulo P, Justil H, Arroyo J. Evaluación de la Actividad Hipoglicémica del Extracto Acuoso de *Abuta grandifolia* (Mart.) en Ratitas con Diabetes Inducida por Aloxano. *Rev Inv Vet Perú*; 2015;26(2): 206-212

¹⁸² Lenzen, S. The mechanism of alloxan and streptozotocin induced diabetes. *Diabetología* 2008;51:216-226.

¹⁸³ Druker DJ The role of gut hormones in glucose homeostasis. *J Clin Invest*; 2007;117(1):24-32.

¹⁸⁴ Krog S, Ludvigsen T, Nielsen O, Kirk R, Lykkegaard K, Wulff E, Møller J, Pedersen H, Olsen L. Myocardial Changes in Diabetic and Nondiabetic Nonhuman Primates. *Veterinary pathology*.

¹⁸⁵ Dr. Ramirez. Diabetes junto a ti. 2020.

¹⁸⁶ Barquilla A, Mediavilla J, Comas J, Seguí M, Carramiñana F, Zaballos F.

Recommendations of the American Diabetes Association for the management of diabetes mellitus. 2010;Vol. 36. Núm. 7. páginas 386-391

¹⁸⁷ Taylor R. Type 2 Diabetes Etiology and reversibility. *Diabetes Care*, 2013;Vol.36.

¹⁸⁸ Yu S, Cheng Y, Zhang L, Yin Y, Li B. Treatment with adipose tissue-derived mesenchymal stem cells exerts antidiabetic effects, improves long-term complications, and attenuates inflammation in type 2 diabetic rats. *Stem Cell Research & Therapy* 2019;10:333.

¹⁸⁹ Manjarrez G, Hernández V, Neri, T, Boyzo A, Mondragón J, Hernández J. Hallazgos anatomopatológicos durante el desarrollo de la miocardiopatía diabética en la rata. *Cirugía y Cirujanos*, 2014;vol. 82, núm. 1, enero-febrero, pp. 11-19

¹⁹⁰ Chokshi A, Drosatos K, Cheema FH, Ji R, Khawaja T, Yu S, Kato T, Khan R, et al. Ventricular assist device implantation corrects myocardial lipotoxicity, reverses insulin resistance, and normalizes cardiac metabolism in patients with advanced heart failure. *Circulation*; 2012;125:2844-2853

¹⁹¹ Yunyue Z, Suhua L, Enxi Q, et al. Trimetazidine inhibits cardiac fibrosis by reducing reactive oxygen species and downregulating connective tissue growth factor in streptozotocin-induced diabetic rats. *Experimental and therapeutic medicine* 2019;18: 1477-1485.

¹⁹² Carreño J, Apablaza F, Ocaranza MP, Jalil J. Hipertrofia cardiaca: eventos moleculares y celulares. *Rev Esp Cardiol*; 2006;59(5): 473-86

¹⁹³ Ferrara R, Guardigli G, Ferrari R. Understanding patient needs. Myocardial metabolism: the diabetic heart. *Eur Heart J Supplements*; 2003;5: B15-B18

¹⁹⁴ Fang ZY, Yuda S, Anderson V, Short L, Case C, Marwick TH. Echocardiographic detection of early diabetic myocardial disease. *J Am Coll Cardiol*; 2003;41: 611-617.

¹⁹⁵ Bugyei-Twum A, Advani A, Advani SL, Zhang Y, Thai K, Kelly DJ and Connelly KA. High glucose induces Smad activation via the transcriptional coregulator p300 and contributes to cardiac fibrosis and hypertrophy. *Cardiovas Diabetol* 2014;13: 89.

¹⁹⁶ Krog S, Ludvigsen T, Nielsen O, Kirk R, Lykkegaard K, Wulff E, Møller J, Pedersen H, Olsen L. Myocardial Changes in Diabetic and Nondiabetic Nonhuman Primates. *Veterinary Pathology*. 2020;I-12.

-
- ¹⁹⁷ Terman A, Dalen H, Eaton J, Neuzil J, Brunk U. Aging of Cardiac Myocytes in culture. Oxidative stress, Lipofuscin accumulation and mitochondrial turnover. *Ann N.Y. Acad.Sci.* 2004;1019:70-77.
- ¹⁹⁸ Rattan SI, Keeler KD, Buchanan JH, Holliday R. Autofluorescence as an index of ageing in human fibroblasts in culture. *Biosci Rep* 1982;2:561-7.
- ¹⁹⁹ Del Roso A, De Tata V, Gori Z, Bergamini E. Transmural differences of lipofuscin pigment accumulation in the left ventricle of rat heart during growth and aging. *Aging* 1991;3: 19-23.
- ²⁰⁰ Fanelli C, Pampanelli S, Porcellati F, Bartocci L, Scionti L, Rossetti P, Bolli G. Rate of fall of blood glucose and physiological responses of counterregulatory hormones, clinical symptoms and cognitive function to hypoglycaemia in Type I diabetes mellitus in the postprandial state. *Diabetologia*; 2003;46(Issue 1):53-64.
- ²⁰¹ Figueroa G, M.Sc, Pérez H, M.Sc, Mejía Z, Ph.D. Caracterización de un modelo de diabetes tipo 2 en ratas Wistar hembra. *Rev. MVZ Córdoba* 2013;18(Supl):3699-3707.
- ²⁰² Mendivil C, Sierra I. Acción insulínica y resistencia a la insulina: Aspectos moleculares. *Rev. Facultad de medicina Colombiana* 2005;Vol.53 No.4.
