



Facultad de Medicina
Escuela de Medicina
Programa de Magíster 963 en Ciencias Médicas
Mención Biología Celular y Molecular

**“Infarto agudo de miocardio en ratas diabéticas:
Modelo experimental de isquemia *in vivo*”**

Rienzi Díaz Navarro

Este trabajo fue elaborado bajo la supervisión del Director de Tesis Prof. Mario Párraga San Román en el laboratorio del Departamento Ciencias Biomédicas de la Escuela de Medicina, Facultad de Medicina, aprobado por los miembros de la Comisión.

Dr. Mario Párraga San Román
Director de Tesis

Dr. Sebastián San Martín Henríquez
Co-Director de Tesis

Dra. Caroline Weinstein-Oppenheimer
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Claudio Aguayo Tapia
Comisión Evaluación Tesis

Dr. Juan Villena García
Comisión Evaluación Tesis

**Valparaíso, Chile
2015**

AGRADECIMIENTOS

Agradecimientos especiales a mi Tutor Dr. Mario Párraga San Román y co-Tutor Dr. Sebastián San Martín Henríquez, por su constante apoyo y paciencia.

Agradezco también a todos los Profesores del Programa de Magíster de Biología Molecular y Celular de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, por entregarme las herramientas fundamentales que me permitieron comenzar a comprender el excitante mundo de las ciencias fundamentales.

A mis compañeros de Magíster que me han honrado con su amistad y compañerismo, al mismo tiempo de haberme regalado momentos inolvidables.

A Pablo Olivero y Claudio Córdova, por su valiosa contribución al generar y analizar las imágenes de miocardio con isquemia aguda, información relevante en el presente estudio experimental

A Juan Francisco Varas y Natalia Pérez por su enorme ayuda en los estudios inmunohistoquímicos.

A Claudia Delgado, médico veterinario, por su profesionalismo al cuidado de los animales que formaron parte de este estudio experimental. También, a las técnicas veterinarias Betsabeth y Laura por su activa colaboración.

A Carlos Henríquez, por su asesoramiento en el análisis estadístico de esta tesis.

A Elizabeth Revecco, dedicada y eficiente secretaria del Magíster de Biología Molecular y Celular.

A los académicos, Caroline Weinstein Oppenheimer, Claudio Aguayo Tapia y Juan Villena García quienes revisaron este manuscrito enriqueciéndolo con sus sugerencias.

A mi familia y a todos quienes me apoyaron y creyeron en mí.

Con gratitud y humildad.

Rienzi Díaz Navarro

CONTENIDO

AGRADECIMIENTOS	2
CONTENIDO	3
RESUMEN	5
SUMMARY	6
1. INTRODUCCIÓN.	8
MUERTE CELULAR EN EL IAM.	10
AUTOFAGIA	10
APOPTOSIS	13
NECROSIS	15
2. HIPÓTESIS	22
3. OBJETIVOS GENERALES	23
4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
5. MATERIALES Y MÉTODOS	24
Objetivo General 1	24
5.1. Animales	24
5.2. Anestesia y ventilación	24
5.2.1. Inducción anestésica	24
5.2.2. Intubación y ventilación	27
5.3. Monitorización del animal.	29
5.4. Procedimiento quirúrgico	30
5.5. Procesamiento de los corazones.	32
Medición de área de miocardio en riesgo de infarto e infartado.	32

Objetivo General 2	36
5.6. Inducción experimental de diabetes	36
5.7. Inmunohistoquímica	37
Determinación de parámetros de muerte celular cardiaca	37
Distribución de Caspasa-3 activa y Ciclofilina-D	37
5.8. Histología	39
5.9. Análisis estadístico	39
6. RESULTADOS	40
6.1. Objetivo general 1	40
6.2. Objetivo general 2	44
6.2.1. Área de miocardio en riesgo e infartado	46
6.2.2. Parámetros de muerte celular cardiaca [inmunohistoquímica]	49
Caspasa-3 activa	49
Ciclofilina-D	52
6.2.3. Histología	55
7. DISCUSIÓN	59
Plataforma quirúrgica experimental de isquemia miocárdica aguda	59
Isquemia miocárdica aguda en ratas diabéticas	62
8. CONCLUSIONES	66
9 BIBLIOGRAFÍA	67

RESUMEN

El infarto agudo de miocardio [IAM], es la principal causa de muerte en el mundo occidental y en Chile. Por otra parte, la Diabetes Mellitus [DM] es una enfermedad metabólica que aumenta el riesgo de desarrollar patología cardiovascular e incidencia de complicaciones post infarto, como insuficiencia cardíaca y muerte, pero los mecanismos moleculares involucrados en esta asociación son aún desconocidos. Por lo tanto, llegar a comprender los procesos biomoleculares relacionados con la muerte celular en el IAM, es esencial para fomentar el desarrollo de estrategias que la prevengan.

Objetivo: Determinar el área en riesgo de infarto [AR] e infarto y la abundancia de parámetros de muerte celular por apoptosis y necrosis en corazón de ratas diabéticas, secundaria a treinta minutos de isquemia post ligadura quirúrgica de la arteria coronaria descendente anterior [ADA].

Materiales y Métodos: Para cumplir con este objetivo, se desarrolló en el laboratorio del Departamento de Ciencias Biomédicas de la Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso, un protocolo de isquemia miocárdica aguda en corazón de ratas, mediante la ligadura quirúrgica permanente de la ADA. Los experimentos se realizaron en una sala de microcirugía especialmente diseñada y equipada para la ejecución de cirugía cardíaca experimental *in vivo*. Para desarrollar el protocolo, se estudió cuarenta ratas machos Sprague-Dowley [SD] en un período de 9 meses. Posteriormente, cinco ejemplares SD con DM inducida experimentalmente y seis controles, fueron aleatoriamente incorporados al protocolo de isquemia aguda desarrollado. La DM se indujo mediante la administración de Aloxano vía intraperitoneal. Se consideró ratas diabéticas aquellas con glicemia superior a 200 mg/dL. En este experimento, se determinó el área de miocardio en riesgo de infarto [AR] mediante la técnica de doble tinción con azul de Evans [AE] y trifeniltetrazolio [TTC]; el daño estructural del miocardio a través de histología convencional y en estudios inmunohistoquímicos, se cuantificaron parámetros de muerte celular por apoptosis [abundancia de Caspasa-3 activa] y necrosis [abundancia de Ciclofilina-D] por medio del conteo de células marcadas.

Resultados: No se identificó áreas de infarto en ninguno de los animales estudiados del grupo control y diabético. El AR promedio fue mayor en el grupo control 31,3% [IC 95%: 26,6-35,9] vs el grupo diabético 23,7% [IC 95%: 18,4-28,9] [p<0.009]. No se observó diferencias en la abundancia de Caspasa-3 activa y Ciclofilina-D, entre los grupos control y diabético. En la histología convencional, se encontró pequeñas zonas de miocardio estructuralmente anormal en algunos animales en ambos grupos.

Conclusiones: La isquemia aguda de miocardio por treinta minutos no provocó infarto macroscópicamente identificable en las ratas diabéticas y la expresión de parámetros de muerte celular no fueron más abundantes que en los controles. Una explicación hipotética de estos hallazgos podría ser que la DM en su fase temprana, tendría un efecto cardioprotector sobre el insulto isquémico en el corazón de la rata diabética.

SUMMARY

Acute myocardial infarction [AMI] is the leading cause of death in the Western world and in Chile. Moreover, diabetes mellitus [DM] is a metabolic disease that significantly increases the risk of developing cardiovascular disease and post myocardial complications, such as heart failure and death, however, the molecular mechanisms involved in this association are unknown. Therefore, understanding the biomolecular processes related to cell death in AMI, is essential to promote the development of strategies to prevent it.

Objective: To determine the area at risk of infarction [RA], area of infarction and the abundance of parameters of cell death by apoptosis and necrosis in heart of diabetic rats, secondary to thirty minutes of ischemia post-surgical ligation of the left anterior descending coronary artery [LAD].

Material and Methods: To meet this goal, in the Department of Biomedical Sciences laboratory of the School of Medicine, University of Valparaiso, Chile, a protocol of

acute myocardial ischemia in rat heart by permanent surgical ligation of the LAD was developed. Experiments were performed in a room specially designed and equipped to perform *in vivo* experimental cardiac microsurgery. To set this protocol, forty male Sprague-Dawley rats [SD] were studied over a period of nine months. Subsequently, five male SD rats with experimentally induced DM and six controls were randomly allocated into the acute ischemia protocol developed. DM was experimentally induced by intraperitoneal administration of alloxan. Rats with blood glucose higher than 200 mg/dL were considered to be diabetic. During the experiment, RA was determined by using a double staining technique with Evans blue and triphenyltetrazolium; myocardial structural damage through conventional histology; and parameters of cell death by apoptosis and necrosis by counting labeled cells in immunohistochemical studies.

Results: No areas of infarction were identified in any of the animals studied both diabetics and controls. The AR average was higher in the control group 31.3% [95% CI: 26.6 to 35.9] vs the diabetic group 23.7% [95% CI: 18.4 to 28.9] [$p < 0.009$]. No differences in the abundance of Caspase-3 active and Cyclophilin-D, between control and diabetic groups were found. In conventional histology, small areas of structurally abnormal myocardium were found in some animals in both groups.

Conclusions: Acute myocardial ischemia for thirty minutes caused no identifiable macroscopic infarction in diabetic rats and parameters of cell death were not larger than in the controls. A hypothetical explanation is that the DM in its early stage would have a cardioprotective effect against the ischemic insult in the diabetic rat heart. A hypothetical explanation for these findings might be that DM in its early stage would have a cardioprotective effect on the ischemic insult in the diabetic rat heart.

1. INTRODUCCIÓN

El infarto agudo de miocardio [IAM] secundario a enfermedad coronaria aterosclerótica [ECA] complicada, es la principal causa de muerte en el mundo occidental [1,2,3] y también en Chile [4].

Por otro lado, la Diabetes Mellitus [DM] es una enfermedad metabólica que aumenta significativamente el riesgo de desarrollar patología cardiovascular, especialmente ECA [5,6], e incrementa la incidencia de complicaciones en el IAM, como insuficiencia cardíaca [IC] y/o muerte [7-9].

El IAM, es consecuencia de la oclusión trombótica de una arteria coronaria, evento patológico descrito hace más de cien años atrás [10]. El mecanismo fisiopatológico de este proceso, es la erosión o fisura de una placa de aterosclerosis coronaria, incidente que desencadena la cascada de coagulación con la formación de un trombo y obstrucción del vaso enfermo [11,12] [Figura 1].

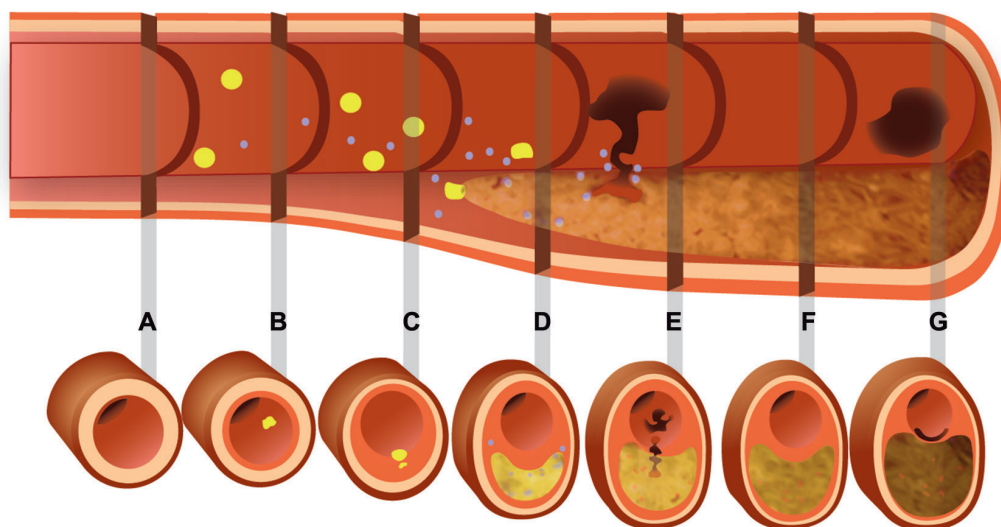


Figura 1. Proceso de iniciación, progresión y complicación de la placa aterosclerótica en un vaso coronario. A, coronaria normal. B, acumulación de lípidos en la íntima del vaso. C, etapa fibrolipídica. D, progresión de la lesión con mediadores inflamatorios que expresan factor tisular [procoagulante] y proteinasas que degradan la matriz debilitando la cubierta fibrosa de la placa. E, ruptura de la cápsula fibrosa que causa trombosis no-oclusiva de la placa aterosclerótica. Si los mecanismos protrombóticos prevalecen sobre los fibrinolíticos, se produce trombosis oclusiva desencadenándose un síndrome coronario agudo. F, reabsorción del trombo con respuesta de cicatrización [acumulación de colágeno, proliferación de células de músculo liso], transformando la placa fibroadiposa en placa fibrosa y/o calcificada, que puede estenotar significativamente el vaso y producir angina de pecho. G, erosión superficial de la capa endotelial con formación de un trombo oclusivo que causa un infarto agudo de miocardio [Adaptado de Ref. 12].

Durante el siglo recién pasado, hubo importantes avances en el tratamiento de esta grave enfermedad cardíaca. A comienzos de la década de los sesenta, se pone en función las Unidades Coronarias [13], progreso que permitió reducir la mortalidad del IAM de 30% a 15%, al optimizarse el manejo de las arritmias ventriculares complejas y bloqueo aurículoventricular de alto grado. Su tratamiento actual - la terapia de reperfusión miocárdica - se inició a mediados de la década de los setenta, cuando se realizó por primera vez la lisis de un trombo coronario, mediante infusión directa de un trombolítico - la estreptoquinasa [SK] - en la arteria coronaria ocluida de un paciente con IAM [14]. Posteriormente, se demostró el efecto beneficioso de la SK administrada por vía intravenosa periférica [15]. La terapia de reperfusión, ha mejorado las expectativas de vida de los pacientes que sufren un IAM [16,17]. Por lo tanto, el objetivo terapéutico actual en esta enfermedad, es el restablecimiento del flujo sanguíneo en la arteria coronaria relacionada con el infarto, desobstruyendo la oclusión trombótica mediante trombolisis intravenosa periférica o angioplastia, procedimientos que permiten reperfundir el miocardio isquémico [18,19]. Sin embargo, aunque la reperfusión miocárdica constituye un gran avance en el tratamiento del IAM - porque reduce la muerte celular por isquemia al restablecer el flujo coronario - puede también producir daño de los cardiomiocitos que sobreviven a la isquemia, mediante un proceso biomolecular que se ha denominado "fenómeno de no reflujo", producto del daño microvascular con edema de las células cardíacas y endoteliales [20-21], fenómeno que se asocia a un pronóstico adverso [22,23].

En el IAM, la obstrucción de la arteria coronaria, produce isquemia del cardiomiocito por falta de oxígeno, situación que afecta principalmente la función mitocondrial, provocando cese del metabolismo aeróbico, detención del proceso de fosforilación oxidativa, interrupción de la síntesis de ATP con rápida disminución de su concentración y aumento en la concentración de ADP, AMP y Pi. Como consecuencia de lo anterior, se activa temporalmente el metabolismo anaeróbico con producción de ATP a través de la vía glucolítica, proceso metabólico que aumenta la producción de lactato. La perpetuación de la isquemia llevará al cardiomiocito a un estado de acidosis intracelular, gatillándose una cascada de reacciones

bioquímicas, moleculares y fisiológicas que estimulan el aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno [ERO], hecho que finalmente provocará la muerte celular. Si bien el daño de los cardiomiocitos depende de la duración de la isquemia, que lesiona el sarcolema provocando un incremento masivo del Ca^{++} intracitoplasmático, la reperfusión miocárdica amplifica el daño de la membrana sarcoplasmática y también el de la membrana mitocondrial [24,25].

El restablecimiento del flujo sanguíneo debe ser - idealmente - precoz después de iniciado el proceso isquémico, circunstancia que en la práctica clínica ocurre muy ocasionalmente. Se ha estimado que si la reperfusión ocurriese precozmente, sería posible reducir en aproximadamente 50% el daño del miocardio con isquemia severa [26]. A su vez, la prevención del daño por reperfusión mediante terapia de cardioprotección, podría contribuir a una reducción adicional del daño postinfarto, mejorado el resultado clínico [27].

MUERTE CELULAR EN EL IAM

La muerte celular del cardiomiocito en el IAM puede ocurrir por 3 mecanismos: autofagia, apoptosis y necrosis [28].

AUTOFAGIA

La autofagia representa un mecanismo de respuesta de supervivencia celular, que repone energía bajo situaciones de estrés como la isquemia [28]. Durante el proceso autofágico, se produce la formación de un compartimento de doble membrana, denominado autofagosoma, que engloba el material intracitoplasmático a ser degradado [proteínas y orgánulos]. Lo primero que ocurre, es la formación de una cisterna membranosa llamada fagóforo, que crece luego en longitud y tiene la capacidad de reconocer el material que posteriormente será degradado. El autofagosoma, se fusiona posteriormente con lisosomas, orgánulos ricos en enzimas hidrolíticas que provocarán la digestión de su contenido [29]. Durante la autofagia, se produce la activación espacial y temporal de múltiples componentes moleculares que forman parte de las rutas de señalización de este proceso, las que pueden

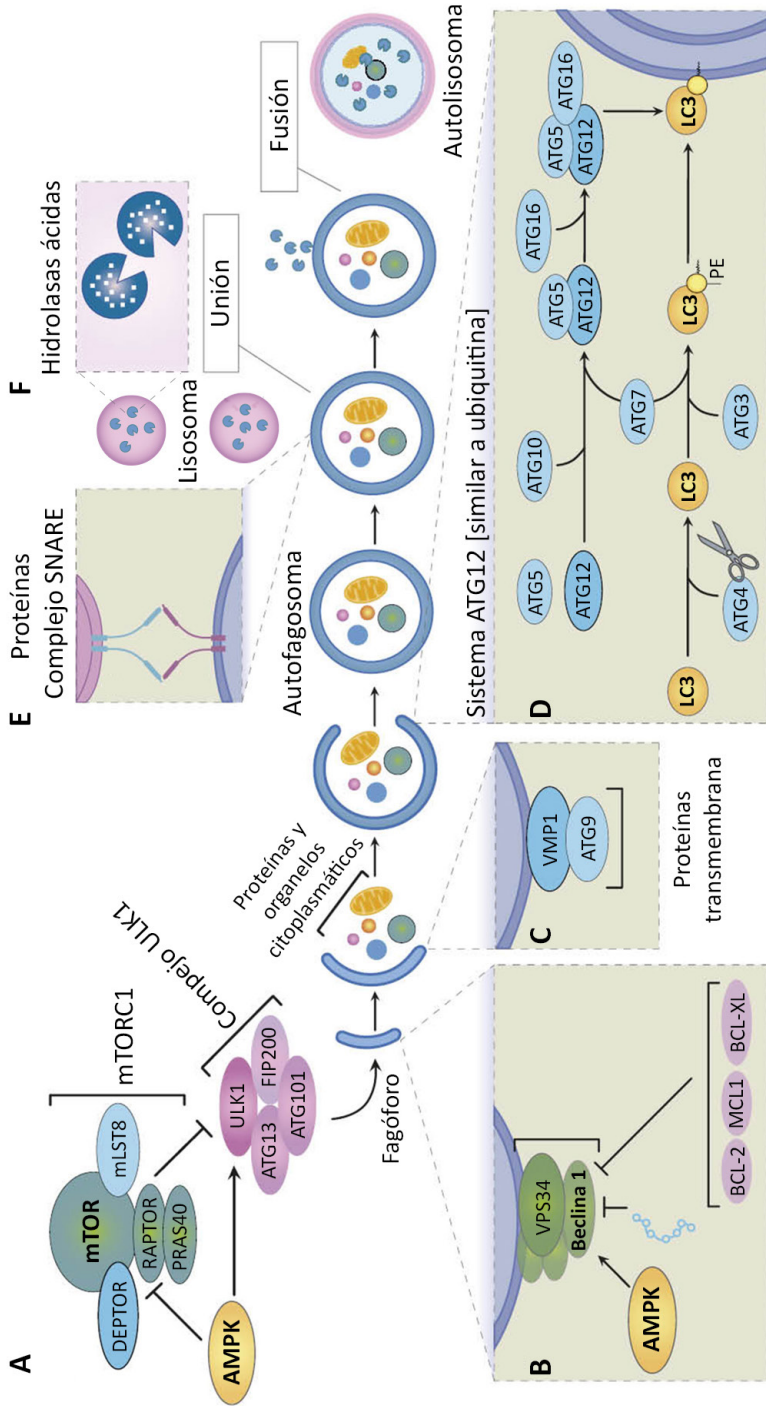


Figura 2. Proceso de autofagia que se inicia con la formación del fagoforo, con mayor frecuencia en la zona de contacto entre las mitocondrias y el retículo endoplasmático. Como se observa en la figura, la autofagia implica la activación espacial y temporal coordinada de múltiples componentes moleculares, que incluyen el complejo ULK1 el que está funcionalmente acoplado al complejo mTOR, un regulador negativo de autofagia [ver parte A]. AMPK inhibe mTOR y activa ULK1 iniciándose el proceso autofágico. El complejo de VPS34 y Beclina 1 [comúnmente inactivado por la acción de proteínas anti-apoptóticas de la familia BCL-2 y las señales de otros componentes] se activa por acción de AMPK provocando la nucleación del fagoforo [ver parte B]. Posteriormente, dos proteínas transmembrana VMP1 y ATG9, reclutan lípidos para el fagoforo [ver parte C]. Luego, el autofagosoma se forma por la activación de dos sistemas de conjugación de proteínas tipo ubiquitina ATG12 y LC3, que incluyen una proteasa ATG4, que escinde LC3 en su terminal carboxilo], la enzima ligasa E-1, ATG7 [común a ambos sistemas de conjugación] y las enzima ligasa E-2, ATG10 [del sistema ATG12] y ATG3 [del sistema LC3], catalizan en conjunto la conjugación covalente de ATG12 a ATG5 [la que en conjunto con ATG16 forma la enzima ligasa E-3 de LC3] y de fosfatidiletanolamina [PE] a LC3 [ver parte D]. La fusión entre el autofagosoma y los lisosomas es mediada por la acción de varias enzimas tipo SNARE [ver parte E]. Finalmente, enzimas lisosomales hidrolizan las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos almacenados en el autofagosoma, a un pH bajo óptimo [ver parte F]. Destaca también como el LC3 permanece asociado al autofagosoma y autolisosoma, facilitando su identificación. AMPK, proteína quinasa activada por AMP; ATG, autophagy-related gene; DEPTOR, dominio DEP con proteína que interactúa con mTOR [mammalian target of rapamycin]; ULK1 Unc-51 like autophagy activating kinase 1; [Adaptado de Ref. 30].

operar independientemente, de forma paralela y/o a través de interconexiones [30] [Figura 2].

Entre estos, el complejo sensible a rapamicina 1 [mTOR1, por sus siglas en inglés] es un regulador negativo de la autofagia, que es inhibido por la estimulación de la proteína quinasa activada por AMP [AMPK], gatillándose de esta manera el proceso autofágico [Figura 2]. Otra ruta de señalización lo constituye el complejo de Beclina 1-proteína vacuolar tipo-34 [Vps34], que es inactivado por acción de proteínas anti-apoptóticas de la familia Bcl-2 [BCL2, BCLX-L, MCL1] y que también se activa por acción de la AMPK, estimulándose el inicio de la autofagia [Figura 2]. Posteriormente, dos proteínas transmembrana, la proteína relacionada con autofagia-9 [Atg9] y la proteína vacuolar de membrana 1 [VMP1], reclutan los lípidos para la formación del fagóforo, mientras que para el sellado del autofagosoma, se requiere de la participación de dos sistemas de conjugación paralelos, similares al proceso de conjugación de ubiquitina. Por un lado, el sistema de cadena ligera 3 de la proteína 1 asociada al microtúbulo [LC3-I, por sus siglas en inglés] y por el otro, las cascadas de conjugación con participación de proteínas relacionadas con la autofagia [ATG, por sus siglas en inglés], en particular el sistema ATG-12. Por último, los eventos de fusión del autofagosoma y lisosoma para formar un autofagolisosoma, son todavía poco claros. Sin embargo, se cree que ATG adicionales que median la fusión de vesículas [SNARE], estarían involucradas en este proceso. Finalmente, la autofagia culmina con la hidrólisis de las proteínas, lípidos y ácidos nucleicos contenidos en el autofagolisosoma, por acción de las enzimas lisosomales [Figura 2].

Durante el proceso isquémico secundario a la oclusión coronaria permanente, se produce un incremento del proceso autofágico por activación de la AMPK que inhibe mTOR, potente inhibidor de este proceso. Por otra parte, la inhibición de la autofagia produce el aumento del tamaño del infarto, como ha sido experimentalmente demostrado en ratones transgénicos sometidos a un modelo de isquemia-reperfusión [IR], hallazgo que sugiere un rol de protección de la autofagia durante la isquemia prolongada [31]. Sin embargo, la repuesta autofágica se hace

disfuncional durante la reperfusión. Por tanto, la autofagia puede ser protectora durante la isquemia y perjudicial durante la reperfusión. Esta diferencia se explica porque durante el proceso isquémico, la autofagia es inducida por AMPK, mientras que durante la reperfusión, se activa por aumento en la abundancia de beclina 1, un mecanismo independiente de AMPK [32].

APOPTOSIS

La muerte celular por apoptosis es mediada por dos mecanismos, la vía extrínseca por estimulación de receptores de membrana y la vía intrínseca, en la que participan las mitocondrias y el retículo endoplasmático [Figura 3]. Sin embargo, ambas vías conducen a la activación de las caspasas. Las caspasas son proteasas que se encuentran en el citoplasma en su forma inactiva - procaspasas - activándose por dimerización para producir hidrólisis de los enlaces peptídicos de proteínas estructurales y regulatorias, desencadenando la muerte celular por apoptosis. Durante el proceso apoptótico, existen conexiones entre ambas vías que amplifican las señales de muerte celular por este mecanismo [28] [Figura 3].

En el IAM, si bien la vía extrínseca e intrínseca participan en la muerte del cardiomiocito por apoptosis, es la vía intrínseca la que juega un rol central. En este caso, la escisión de la molécula BID por caspasa-8 activa y también por otras proteasas no caspasas como las calpaínas durante el IAM, conectan la vía apoptótica extrínseca e intrínseca amplificando la respuesta apoptótica [33,34].

La apoptosis, es considerada por algunos investigadores, el mecanismo de muerte predominante en el IAM, desencadenado por la oclusión quirúrgica de una arteria coronaria en corazón de ratas, con una incidencia máxima cuatro horas y media después de la oclusión coronaria permanente [35]. Sin embargo, otros autores consideran que el proceso apoptótico se inicia durante el periodo de isquemia para ejecutarse durante la reperfusión [36].

APOPTOSIS

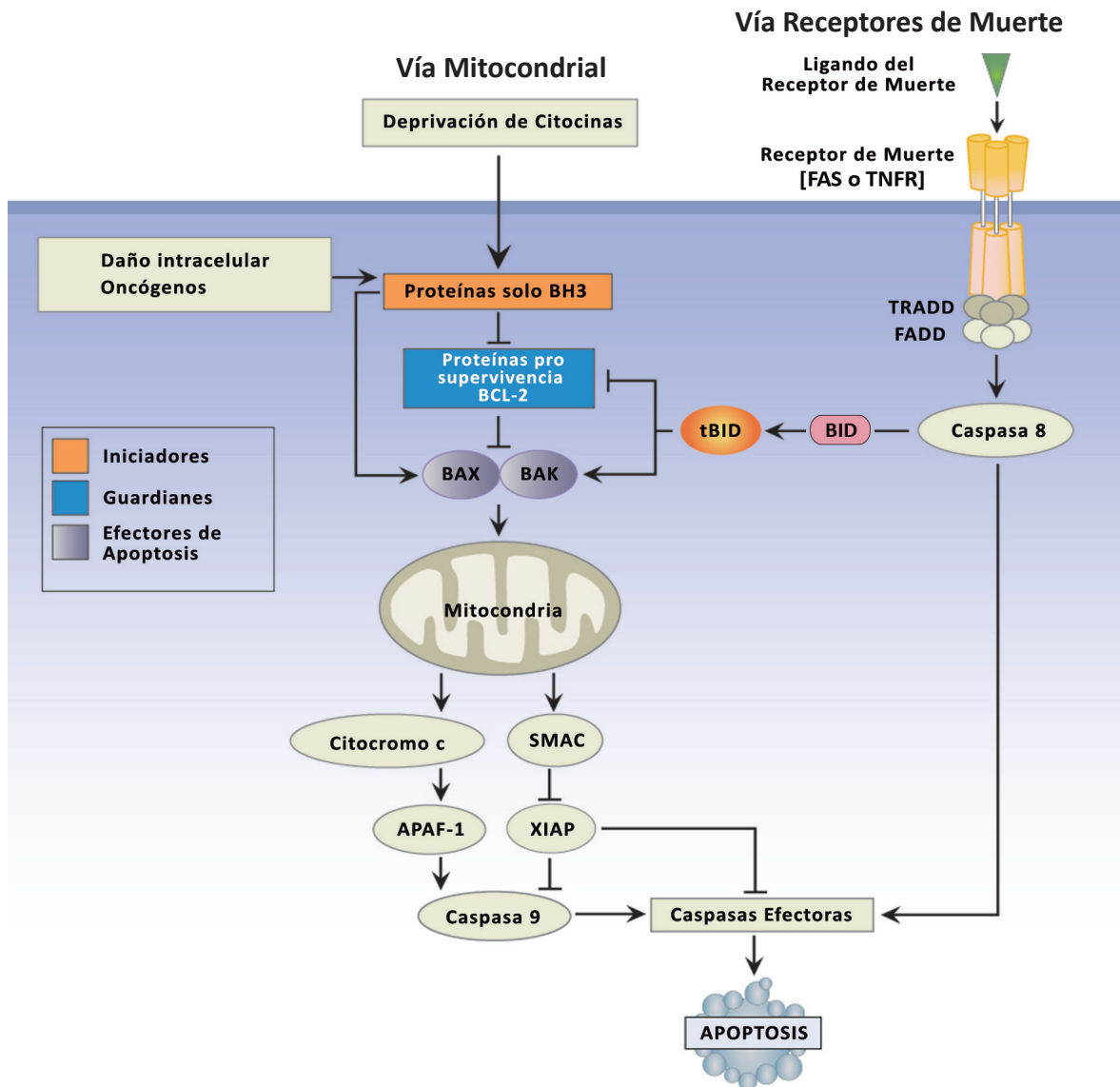


Figura 3. Proceso de apoptosis a través de la vía mitocondrial [intrínseca] y receptores de muerte [vía extrínseca]. Diversos estímulos citotóxicos estimulan la vía mitocondrial, regulada por proteínas de la familia BCL-2. Estas estimulan las proteínas solo BH3 [iniciadores], que activan las proteínas pro-apoptóticas BAX y BAK, que alteran la membrana externa de la mitocondria, estimulando la liberación de citocromo c y SMAC [por su sigla en inglés, second mitochondria-derived activator of apoptosis], que producen la activación de caspasa-9. El citocromo c lo hace activando APAF-1 [por su sigla en inglés, apoptotic protease activating factor 1] y SMAC inhibiendo el inhibidor de caspasa XIAP [por su sigla en inglés, X-linked inhibitor of apoptosis protein]. La vía extrínseca, se activa cuando ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral [TNF, por su sigla en inglés], como FAS o TNFR, activan sus respectivos receptores en la membraba plasmática. La anterior activa la caspasa-8, a través de las proteínas FADD [por su sigla en inglés, FAS-associated death domain protein] y TRADD (por su sigla en inglés, TNRF-associated death domain protein). Ambas vías, convergen en la activación de las caspasa efectoras [caspasa 3, caspasa 6, caspasa 7]. Además, tBID (la forma trunca de BID), generada por la acción proteolítica de la caspasa-8 sobre BID, puede incorporarse en la vía de apoptosis mitocondrial amplificando la respuesta apoptótica [Adaptado de Ref. 34]. BID; por su sigla en inglés, BH3 Interacting Death Domain

NECROSIS

La muerte celular del cardiomiocito por necrosis, se activa por isquemia miocárdica prolongada con o sin reperfusión. Como fue señalado, la isquemia genera hipoxia activando el metabolismo anaeróbico que produce acidosis intracelular. Esta última, se instaura progresivamente durante la isquemia, contribuyendo a la sobrecarga patológica de iones sodio $[Na^+]$ por acción del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana sarcoplasmática. De esta manera, iones H^+ son bombeados fuera de la célula y iones Na^+ al interior de la misma, lo que genera un aumento del Na^+ intracelular. Además, producto de los niveles bajos de ATP, el Na^+ no puede ser bombeado fuera del citoplasma por la bomba Na^+/K^+ , de modo que la sobrecarga de Na^+ intracitosólica activa en reversa, el intercambiador Na^+/Ca^{2+} de la membrana celular, provocando una sobrecarga de Ca^{2+} [37]. De esta manera, el cardiomiocito se deshace del exceso de Na^+ que se acumula durante la isquemia, a costa de una entrada deletérea de Ca^{2+} desde el medio extracelular. El aumento de la concentración intracitoplasmática de este ión, induce la liberación adicional de Ca^{2+} desde el retículo endoplasmático, aumentando adicionalmente su concentración. Así, la isquemia prolongada activa enzimas calcio-dependientes como fosfolipasa-A2, nucleasas y calpaínas, que degradan componentes celulares esenciales que no tienen posibilidad de reparación por falta de ATP. Es más, la hidrólisis del ATP incrementa los niveles de AMP, molécula que por acción de la 5' nucleotidasa forma adenosina, nucleósido que posteriormente es metabolizado a través de la vía de degradación de las purinas, provocando una depleción total de nucleótidos de adenina [37].

Por otra parte, la disfunción mitocondrial aumenta la generación de ERO [anión superóxido, radicales hidroxilos, peróxido de hidrógeno], moléculas que dañan componentes celulares esenciales del cardiomiocito, comprometiendo su función vital mediante la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y rotura del ADN [38]. Durante el proceso de reperfusión, se produce una rápida normalización de la acidosis intracelular estimulándose también el estrés oxidativo [EO], eventos que junto a la sobrecarga de Ca^{2+} producen la apertura de un canal de alta conductancia,

en la membrana interna de la mitocondria, denominado poro de permeabilidad transitoria mitocondrial [PPTM] [39-41] [Figura 4], que provoca el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, detención de la producción de ATP y muerte celular por necrosis con ruptura de la membrana sarcoplasmática y respuesta inflamatoria [42-44].

El PPTM, permanece cerrado durante la isquemia para abrir inmediatamente iniciada la reperfusión. Así, el PPTM parece ser cebado durante la isquemia y su apertura se activa durante la reperfusión, sin embargo, aún permanece sin explicación definitiva, la interacción biomolecular entre las subunidades del PPMT y los factores desencadenantes de su apertura [ERO, Ca^{++} , reducción del potencial de membrana mitocondrial] [45, 46].

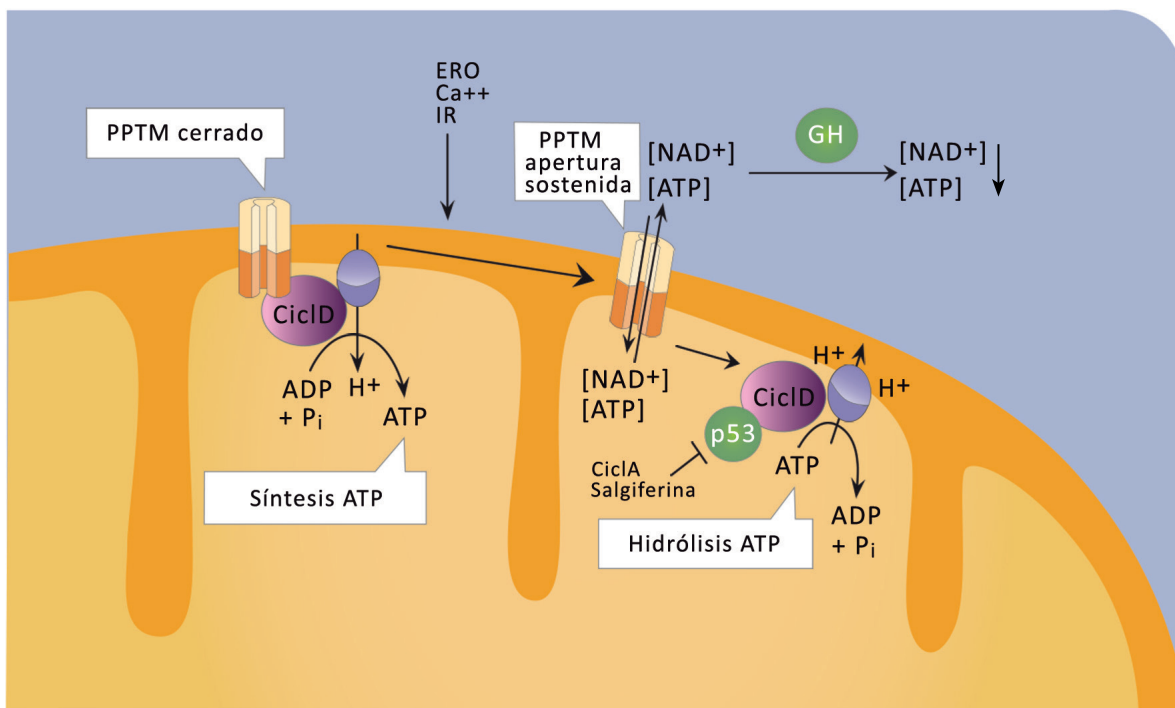


Figura 4. Proceso de regulación de muerte celular por necrosis y el rol de la ciclofilina-D, proteína de la matriz mitocondrial. Esta proteína tiene actividad péptido-prolil-isomerasa y contribuye en apertura del PPTM. Este poro abriría por la estimulación persistente de Ca^{++} , ERO o producto del daño de IR, que resulta en la translocación del NAD⁺ desde la matriz mitocondrial al citosol y pérdida del potencial de membrana mitocondrial. La actividad en reversa de la F₀F₁ ATPasa con hidrólisis del ATP, tiende a recuperar el potencial mitocondrial. Posteriormente, los depósitos de NAD⁺ son depletados por la acción de la NAD⁺ glicohidrolasa [GH, por su sigla en inglés]. Ésto, en combinación con la depleción del ATP, conduce a la necrosis regulada. Este proceso puede ser inhibido por inmunosupresores como la ciclosporina A [CicA] y salgiflerina A [SfA]. IR, isquemia reperfusión; NAD, nicotinamida adenina dinucleótido; PPTM, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial [Adaptado de Ref. 41].

Un modelo propuesto para el PPTM, es que se trataría de un canal conformado por dímeros de la adenino nucleótido translocasa [ANT] y el transportador de fosfato inorgánico mitocondrial [TPi] [47], cuyos cambios de interacción produciría variación en la sensibilidad del PPTM al Ca^{2+} , como ocurre con el uso de ciclosporina A o la ablación de ANT [46]. La ciclosporina A, no afecta la interacción de ciclofilina-D y la ANT, pero inhibe la unión de ciclofilina-D y el TPi [47]. Otra explicación propuesta, es que la ciclosporina A y la eliminación de la ciclofilina-D inhibirían la apertura del PPTM desenmascarando efectos inhibitorios del TPi [48].

El modelo actualmente propuesto para el PPTM [Figura 5] [45], considera la formación de dímeros entre ANT y TPi, en la membrana interna de la mitocondria. La ciclofilina-D, se uniría al TPi produciendo cambios conformacionales en esta molécula, en ANT o en ambos, producto del aumento en la concentración de Ca^{++} en la matriz mitocondrial. Al mismo tiempo, el EO y el acoplamiento del Pi al TPi, acentúa la unión de ciclofilina-D y TPi, que puede - por otra parte - ser inhibida por la unión de nucleótidos de adenina con ANT, superando la interacción entre ANT y TPi. El estrés oxidativo[EO], también activa la apertura de PPTM al prevenir la unión de los nucleótidos de adenina a ANT [45].

Como se observa en la Figura 5, la ciclosporina-A, un fármaco inmunosupresor, impide la unión de la ciclofilina-D a TPi inhibiendo la apertura del PPMT, mientras tanto la sangliferina - un inmunosupresor natural - inhibe la actividad péptido-proli-isomerasa de la ciclofilina-D, sin provocar su disociación. Por otra parte, el pH bajo y el Mg^{++} también inhibe la apertura de PPTM [45].

Como se mencionó previamente, la ciclofilina-D es una proteína que posee un importante rol regulador del PPTM [ver figura 4 y 5]. De hecho, las células carentes de ciclofilina-D son resistentes a la muerte celular por sobrecarga de Ca^{2+} y estrés oxidativo, pero no así a los estímulos apoptóticos. En modelos experimentales de IR, se ha demostrado que ratones con deficiencia de ciclofilina-D tienen infartos más pequeños [49, 50].

MUERTE CELULAR POR NECROSIS PPTM

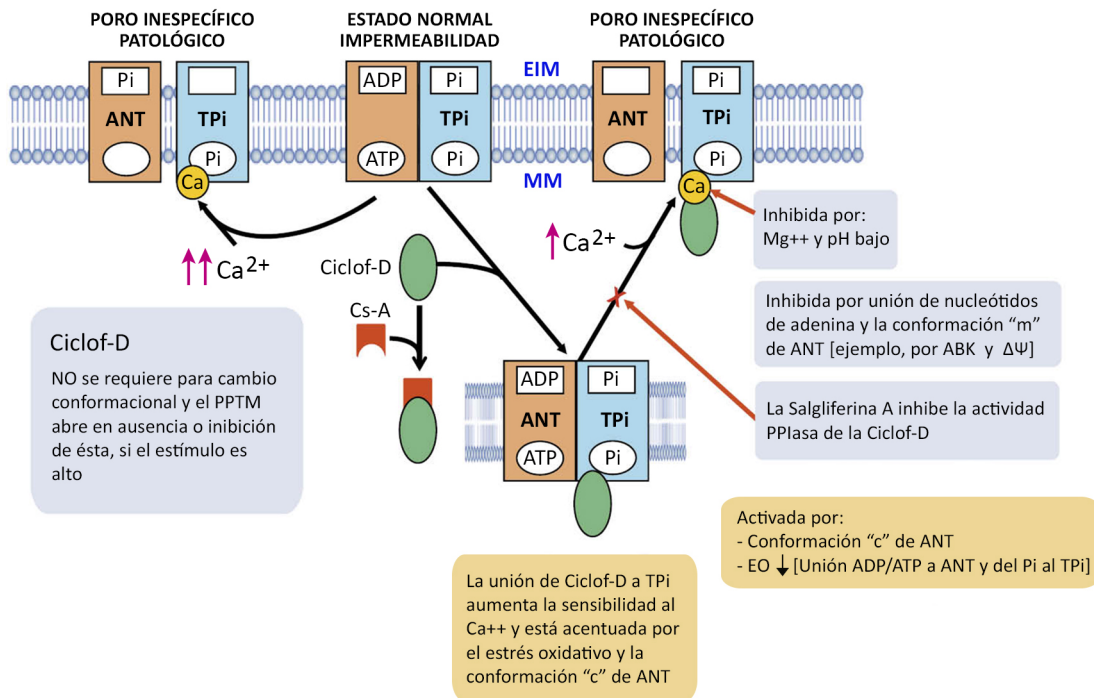


Figura 5. Mecanismo molecular actualmente propuesto para la formación del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial [PPTM]. ABK, ácido bongkrékico; ADP, adenosín difosfato; ANT, adenino nucleótido traslocasa; ATP, adenosín trifosfato; Ca, calcio; Ciclof-D, ciclofilina D; Cs-A, ciclosporina A; EO, estrés oxidativo; EIM, espacio intermembrana; MM, transitoria mitocondrial; Mg, magnesio; Pi, fósforo inorgánico; PPlasa, péptido-prolil-isomerasa; PPTM, poro de permeabilidad transitoria mitocondrial; TPi, transportador de fósforo inorgánico; ΔΨ, potencial de membrana [Adaptado de Ref. 45].

En el modelo experimental, se ha demostrado que el uso de ciclosporina A - un fármaco inmunosupresor - es capaz de reducir el tamaño del infarto, al interferir con la apertura del PPMT [51, 52] [Figura 5]. En el modelo animal *in vivo*, se ha observado que la necrosis en el IAM tiene una incidencia máxima, a las 24 horas de oclusión permanente de una arteria coronaria [35]. Recientemente, en un ensayo clínico aleatorizado y doble ciego, la administración de Ciclosporina A en pacientes con IAM, antes de la realización de angioplastia coronaria, disminuyó significativamente la liberación de enzimas miocárdicas y el tamaño del infarto cuantificado por resonancia cardíaca [53].

Por otro lado, la ECA - sustrato anatomopatológico del IAM - se asocia a numerosos

factores de riesgo entre los que destaca la DM [5,6]. A su vez, la DM aumenta la incidencia de IC y/o muerte en los pacientes que sufren un IAM [8,9]. En los diabéticos, el daño cardiovascular [CV] está relacionado con la duración de la DM y el control de la glicemia [54, 55]. Estudios epidemiológicos han mostrado que la incidencia de complicaciones micro y macrovasculares está directamente asociada a la severidad de la hiperglicemia del paciente diabético [56, 57], y su adecuado control reduce el riesgo de complicaciones microvasculares [54, 55]. Aún más, el control intensivo de la glicemia - precozmente durante el curso de la enfermedad - reduce los eventos cardiovasculares en el largo plazo [58, 59]. A la fecha, los mecanismos biomoleculares involucrados con la asociación entre DM, ECA y pronóstico adverso post-infarto son desconocidos [60,61]. Sin embargo, en el modelo animal se ha demostrado que en la diabetes existe una disminución de la expresión de receptores de potencial transitorio V1 [TRPV1] [62], localizados en los nervios sensoriales del miocardio y en la región perivascular de la superficie epicárdica de los ventrículos [63]. Estos receptores, actúan como sensores de la isquemia miocárdica y protegen al corazón mediante la liberación de sustancias cardioprotectoras como el péptido relacionado con el gen de la calcitonina [CGRP] y la sustancia P [SP] [64].

Sin embargo, la DM puede afectar la estructura y función cardíaca provocando IC independientemente de la existencia de ECA, en una condición patológica denominada miocardiopatía diabética [61, 65], cuyo factor etiopatogénico crítico es la hiperglicemia [66]. Por otra parte, se ha demostrado en el modelo animal que la hiperglicemia desencadena la producción de ERO, induciendo la muerte temprana del cardiomiocito a contar del tercer día con máxima incidencia a los siete días, fenómeno que puede prevenirse con la administración de insulina [67].

Aunque la duración de la DM - experimentalmente inducida - influye sobre el tamaño del infarto en un corazón diabético sometido a un proceso de IR, los resultados han sido contradictorios. En un estudio, el tamaño del infarto luego de treinta minutos de isquemia y cuatro horas de perfusión, una semana después de inducida la DM con estreptozotocina [SZ], fue más pequeño que en los controles, efecto protector que desapareció a las ocho semanas. Esta observación sugiere que la

duración de la diabetes influye sobre la tolerancia a la injuria por IR, existiendo factores protectores que se expresarían durante la primera semana de evolución de la DM [68]. Otros investigadores, muestran resultados comparables, al obtener infartos de menor tamaño en ratas diabéticas a las dos y cuatro semanas de inducida la DM con SZ, resultado que se pierde a las seis y veinte semanas, respectivamente [69,70].

Estos estudios, demostrarían que la resistencia del corazón diabético a la injuria por IR está aumentada en el curso temprano de la DM inducida farmacológicamente, fenómeno que estaría relacionado con la activación de mecanismos de supervivencia del cardiomiocito, como el aumento en la expresión de AKT y óxido nítrico sintasa [70], o la activación de ERK [69]. Otro mecanismo de supervivencia miocárdica estaría representado, por la disminución del flujo de glucosa hacia el cardiomiocito, fenómeno que atenúa la actividad del intercambiador de Na^+/K^+ y del intercambiador Na/Ca^{2+} , reduciendo el flujo de ión Ca^{2+} hacia el citoplasma, disminuyendo su concentración y secundariamente el proceso de necrosis [68].

Las investigaciones citadas previamente, representan observaciones en corazón diabético de ratas sometidas a procesos de IR y no traducen lo que ocurre exclusivamente durante la isquemia. Algunos autores, sostienen que el proceso apoptótico se iniciaría con la isquemia para ejecutarse durante la reperfusión [36, 71]. Otros, plantean que la apoptosis es el mecanismo de muerte predominante en el IAM, en ratas sometidas a oclusión quirúrgica permanente de una arteria coronaria [68]. Contrariamente a lo señalado, algunos estudios muestran que la isquemia miocárdica prolongada en el IAM, con o sin reperfusión, induce la muerte del cardiomiocito por necrosis [72]. Por último, existe evidencia de que la duración de la isquemia estaría relacionada con la tasa de necrosis, mientras que la duración de la reperfusión con la cuantía de apoptosis [73].

Hasta ahora, el conocimiento de los mecanismos de muerte celular del cardiomiocito en corazón diabético, durante la isquemia miocárdica, es incompleto. La posibilidad de conocer con exactitud el tipo de muerte celular durante la isquemia

miocárdica, su incidencia, magnitud y temporalidad, así como los procesos biomoleculares involucrados, permitiría fomentar la investigación de nuevos agentes cardioprotectores los que administrados antes de la terapia de reperfusión, podrían potencialmente disminuir o evitar el daño por reperfusión y las principales complicaciones post infarto, como la IC y/o muerte.

2. HIPÓTESIS

El infarto de miocardio es de mayor tamaño en ratas diabéticas que en ratas control y la expresión de parámetros de muerte celular cardiaca apoptótica y necrótica más abundante, luego de 30 minutos de isquemia continua por ligadura quirúrgica permanente de la ADA.

3. OBJETIVOS GENERALES

1. Desarrollar y poner en funcionamiento un modelo in vivo murino [ratas] de isquemia miocárdica que permita estudiar los procesos celulares y/o biomoleculares involucrados.
2. Determinar el área de infarto y la abundancia de parámetros de muerte celular por apoptosis y necrosis en corazón de ratas diabéticas, luego de 30 minutos de isquemia continua por ligadura quirúrgica permanente de la ADA.

4. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Medir el tamaño del área de miocardio en riesgo e infartado en corazón de ratas diabéticas, luego de 30 minutos de isquemia continua por ligadura quirúrgica permanente de la ADA, mediante técnica de doble tinción con azul Evans 1% [AE] y cloruro de trifeniltetrazolio 1% [TTC].
2. Cuantificar parámetros de muerte celular por apoptosis [abundancia de caspasa-3 activa] y necrosis [abundancia de ciclofilina D] en miocardio en riesgo e infartado, luego de 30 minutos de isquemia continua por ligadura quirúrgica permanente de la ADA, por medio de técnicas de inmunohistoquímica sobre cortes histológicos de 5 μm de grosor.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo General 1

5.1. Animales

Los animales utilizados fueron ratas machos SD, todos adquiridos en el Bioterio de la Pontificia Universidad Católica de Chile.

Los animales fueron mantenidos en la Unidad de Modelos Experimentales del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, en condiciones controladas de luz [12 horas de ciclos de luz/oscuridad], temperatura ambiental de 21°C, humedad ambiental de 50%, ventilación adecuada y libre de ruidos, recibiendo una dieta de pellets comerciales y agua ad libitum, cumpliendo así con todas las normas bioéticas según la “Guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio”, publicado por el “National Health Institute” [NIH N° 85-23, revisado 1996]. Este estudio experimental fue aprobado por el Comité de Bioética para la Investigación de la Universidad de Valparaíso [011-2012].

Se utilizaron 40 ratas machos Sprague-Dowley, con edad entre 8-12 semanas y un peso promedio de 617.9 ± 8.9 gramos [Rango 445-710]. Los experimentos se llevaron a cabo entre septiembre 2012 y mayo de 2013, en una sala de microcirugía especialmente diseñada y equipada para cirugía cardíaca experimental in vivo [ver Figuras 6 y 7].

5.2. Anestesia y ventilación

5.2.1. Inducción anestésica

Para la inducción de la anestesia las ratas fueron depositadas en una caja de inducción anestésica de 29x44x29 cm [Harvard Apparatus, USA] administrándose



Figura 6. Sala de microcirugía, localizada en Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina, Universidad de Valparaíso.



Figura 7. Sala de microcirugía. Tabla operatoria temperada [Flecha amarilla]; máscara de anestesia para ratas [Flecha roja]; ventilador mecánico Inspire [Flecha naranja]; monitor cardiaco [Flecha azul], lámpara quirúrgica [Flecha verde].

una mezcla de isoflurano 5% con oxígeno 100% [74], mediante la utilización de un sistema de anestesia adhoc [Harvard Apparatus, USA] [Figuras 8 y 9].

Una vez comprobado que el animal estaba anestesiado [sin respuesta al pellizcamiento de la nariz o cola], fue trasladado a una tabla operatoria temperada que permite mantener la temperatura corporal del animal en 37°C [Figura 10] y continuar la anestesia a través de una máscara especial para ratas [Harvard Apparatus, USA] [Figura 11].

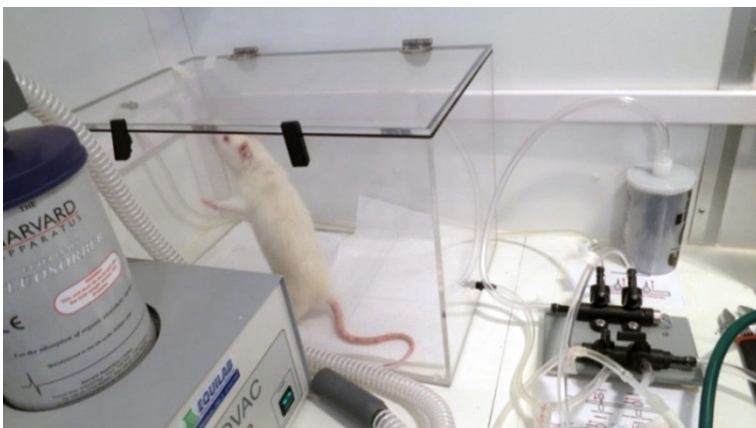


Figura 8. Caja de inducción anestésica para ratas [Harvard Apparatus, USA].

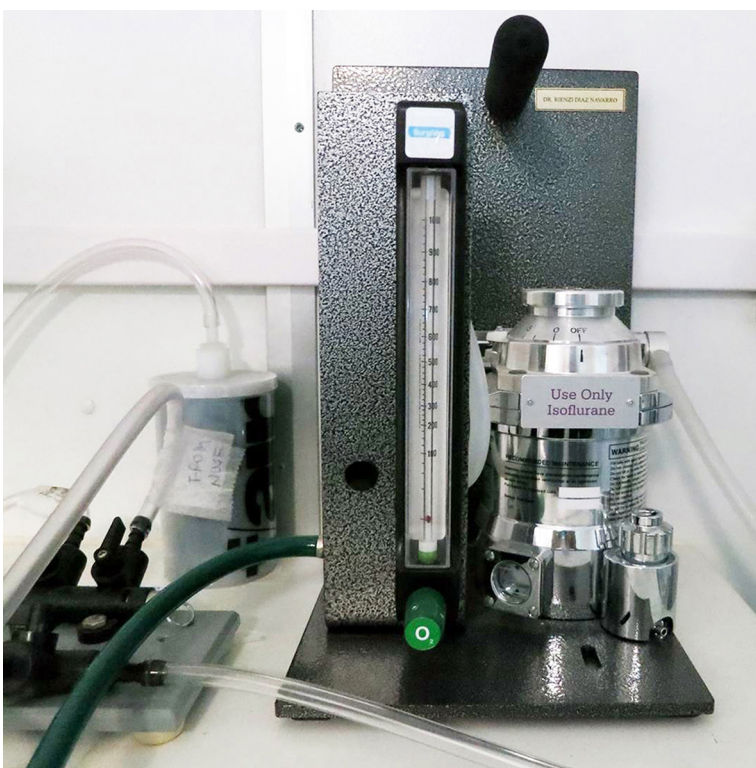


Figura 9. Sistema de anestesia para la administración de isoflurano en animales [Harvard Apparatus, USA].

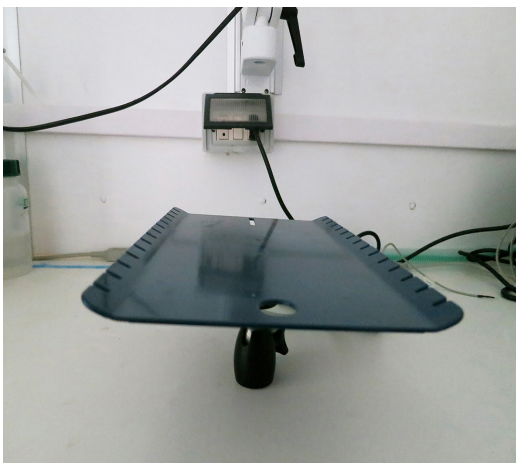


Figura 10. Tabla quirúrgica temperada para roedores [Harvard Apparatus, USA].



Figura 11. Rata en tabla operatoria. Administración de anestesia a través de máscara adhoc [Flecha roja].

5.2.2. Intubación y ventilación

Con el animal anestesiado y en condiciones de asepsia, se realizó traqueotomía e intubación [75] con una cánula para ratas de acero inoxidable [3,0 mm de diámetro exterior, longitud 55 mm] con adaptador en Y para la conexión entre cánula y ventilador [Harvard Apparatus, USA] [Figura 12].

Una vez concluida la intubación, se inició la ventilación mecánica del animal, utilizándose un ventilador mecánico para roedores volumen-control [VC], que permite calcular automáticamente los parámetros respiratorios óptimos, luego que se incorpora el peso del animal [Inspira ASVP, Harvard Apparatus, USA] [Figura 13]. Al mismo tiempo, se utilizó un sistema de anestesia FLUOVAC para animales pequeños, con sistema de recolección de residuos que absorbe y elimina vapores anestésicos del área de trabajo, proporcionando protección y seguridad al personal expuesto [Figura 13]. Los animales permanecieron anestesiados con isoflurano en dosis de 0.5-1.5% mezclado con oxígeno 100%, durante todo el desarrollo del experimento [74].

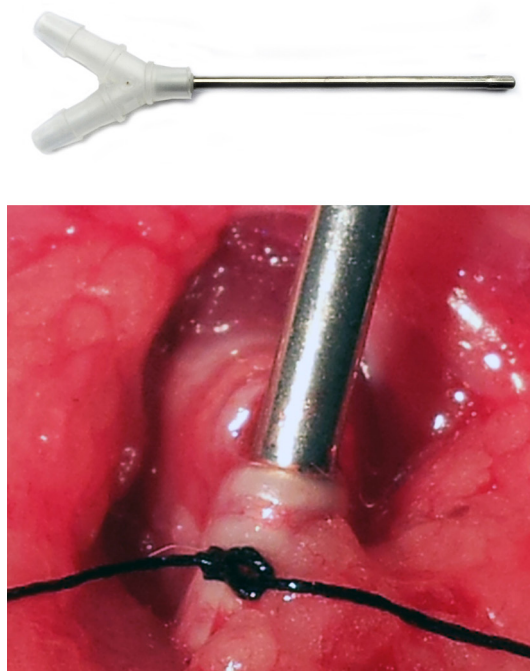


Figura 12. Arriba, cánula para intubación post traqueotomía en ratas. Abajo, cánula *in situ* luego de traqueotomía.



Figura 13. Izquierda, ventilador Inspira ASVV, Harvard Apparatus, USA, volumen/control. Derecha, sistema de seguridad FLUOVAC, para la recolección de residuos anestésicos.

5.4. Procedimiento quirúrgico

El corazón de rata tiene una longitud promedio de 21 mm y un ancho de 13 mm. El diámetro de la ADA es aproximadamente 0.2 mm [Figura 15]. En consecuencia, para la realización de cirugía cardíaca en ratas, el cirujano debe utilizar una lupa quirúrgica. En este experimento se utilizó una lupa Galileo 3,25 X [Surgical Acuity, Class III Hi Res, Through The Lens, Galilean] [Figura 16].

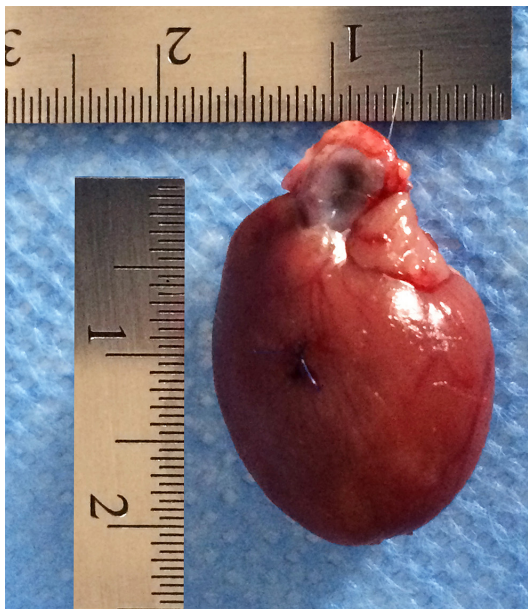


Figura 15. Corazón de rata. Eje longitudinal 20 mm; eje transverso 16 mm.



Figura 16. Lupa quirúrgica para microcirugía [Surgical acuity].

El tórax fue abierto en condiciones asépticas, mediante una esternotomía que permitió acceder al corazón de manera óptima. Se removió cuidadosamente el saco pericárdico y localizó la ADA, rama principal de la arteria coronaria izquierda. Luego, la ADA se ligó cerca de su origen, aproximadamente a 2-3 mm de la intersección, entre el tracto de salida del ventrículo derecho y el borde inferior de la aurícula izquierda, utilizándose una sutura de Prolene 6.0 [Ethicon]. Con el objeto de facilitar la ligadura del vaso, se utilizó un cotonete de algodón presionando suavemente sobre la superficie del ventrículo izquierdo [VI], maniobra que permite disminuir el movimiento del corazón [76]. La presencia de isquemia se comprobó por la observación de palidez y/o cianosis en la pared anterior y lateral del VI, también por el registro de isquemia en el electrocardiograma [76-79] [Figura 17]. La ADA se mantuvo permanentemente ligada por un período de 30 minutos.

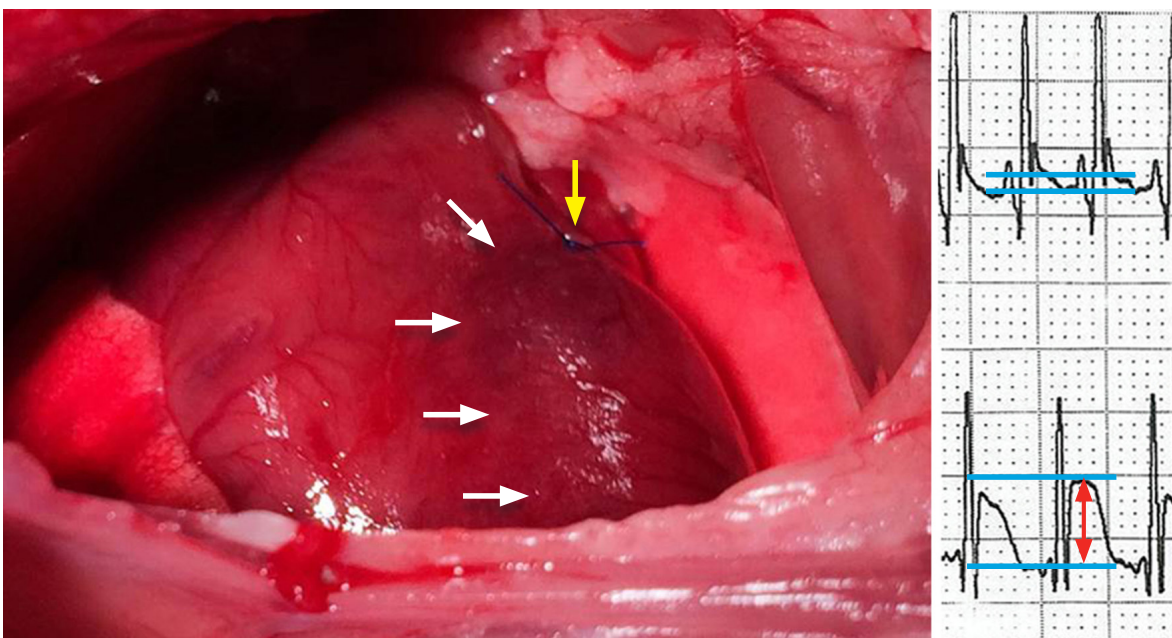


Figura 17. Izquierda, corazón de rata con área de cianosis en territorio de miocardio irrigado por la ADA [Flechas blancas], por debajo del sitio de la ligadura [flecha amarilla]. Derecha arriba, electrocardiograma basal. Derecha abajo, trazado electrocardiográfico post ligadura, muestra supradesnivel del segmento ST de 7 mm [entre barras azules], manifestación electrocardiográfica de la isquemia. ADA, arteria descendente anterior.

El instrumental quirúrgico utilizado durante este protocolo se describe la Tabla 1.

TABLA 1. Instrumental quirúrgico utilizado durante protocolo isquemia

Nombre	Compañía	N° Catálogo
Pinzas anguladas 45°	Fine Science Tools	11063-07
Pinzas Dumont	Fine Science Tools	11253-27
Pinzas Moria	Fine Science Tools	13370-31
Pinzas hemostáticas Kelly	Fine Science Tools	13018-14
Pinzas hemostáticas Micro-Mosquito	Fine Science Tools	13011-12
Porta agujas	Fine Science Tools	12075-12
Tijeras de disección puntiagudas	Fine Science Tools	14568-09
Tijeras de disección romas	Fine Science Tools	14072-10
Tijeras Vannas Spring	Fine Science Tools	15003-08

5.5. Procesamiento de los corazones

MEDICIÓN DEL ÁREA DE MIOCARDIO EN RIESGO DE INFARTO E INFARTADO

El área en riesgo de infarto [AR] fue determinada mediante una técnica de doble tinción con AE 1% y TTC 1% [76-81]. Al término de los 30 minutos de isquemia, la aorta torácica ascendente fue clampeada, luego de lo cual se inyectó 1 ml de AE 1% directamente a la cavidad ventricular mediante punción en el ápex del VI [82]. Posteriormente, se extrajo rápidamente el corazón, se lavó con solución salina tamponada con fosfato, pH 7.4 [PBS] para eliminar el exceso de AE y luego se recortó el tejido auricular. El colorante AE tiñe el tejido miocárdico que no es irrigado por la ADA [sin isquemia], mientras que el área miocárdica en riesgo de infarto [AR] - relacionada con la ADA ligada - no se tiñe, exhibiendo un color rojo pálido [Figura 18]. El AR, se define como el área de hipoperfusión [isquemia] durante la oclusión aguda de una arteria coronaria, la que incluye injuria celular reversible e irreversible [83, 84]. En este experimento, el AR corresponde al territorio de miocardio irrigado por la ADA.



Figura 18. Corazón de rata después de la ligadura permanente de la ADA [Flecha naranja] sometido a un periodo de isquemia de 30 minutos. Izquierda, cara anterior del corazón en la que se observa una extensa AR correspondiente al territorio irrigado por la ADA, de color pálido que no se tiñió con AE [trébol blanco]. El territorio de miocardio normal [no irrigado por la ADA] se tiñe de color azul oscuro [asterisco verde]. Derecha, cara posterior del corazón, muestra tejido miocárdico normal [irrigado por la ACD], teñido íntegramente de color azul oscuro por el colorante AE. AE, azul de Evans; AR, área en riesgo; ACD, arteria coronaria derecha ADA, arteria coronaria descendente anterior.

Posteriormente, el corazón es depositado en una matriz de acero inoxidable diseñada específicamente para corazón de rata [Zivic Instruments, USA] [Figura 19], que permite seccionarlo perpendicularmente a su eje largo - desde el ápex a la base del corazón - en cinco cortes homogéneos de tres milímetros cada uno [cortes E, D, C, B, A], mediante hojas de rasurar de acero inoxidable.

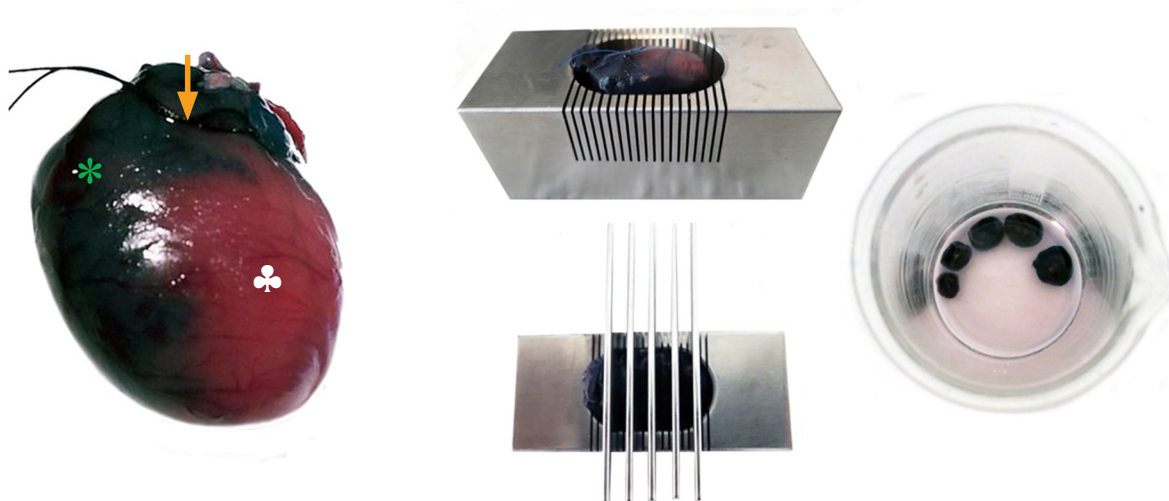


Figura 19. Izquierda, corazón de rata sometido a 30 min de isquemia continua por ligadura quirúrgica de la ADA [Flecha naranja], muestra una extensa AR correspondiente al territorio irrigado por la ADA de color rojo pálido [trébol blanco], luego de la administración de AE. El territorio de miocardio normal [no irrigado por la ADA] se tiñe de color azul oscuro [asterisco verde]. Centro arriba, el mismo corazón depositado en matriz de acero inoxidable - específicamente diseñada para corazón de ratas - para ser seccionado. Centro abajo, cinco hojas de afeitar de acero inoxidable en posición para seccionar el corazón en cinco cortes de 3 mm cada uno, desde el ápex hacia la base del corazón. Derecha, los cinco cortes homogéneamente obtenidos en un contenedor con solución de TTC 1%. ADA, arteria descendente anterior; AE, azul de Evans; AR, área en riesgo; TTC, trifeníltetrazolio.

Estos cortes, se incubaron luego en 15 ml del colorante TTC1% [Sigma Chemical] en PBS durante 15 min a 37°C. A continuación, los cortes se fijan en formalina 10% tamponada, que por sus propiedades anfipáticas elimina los ácidos grasos [85], mejorando el contraste entre el AR y el área de infarto. El TTC1% tiñe el tejido del AR metabólicamente activo de color rojo, mientras que la zona infartada no se tiñe [76-82] [Figura 20]. La coloración roja es producto de la reacción de deshidrogenación del TTC en presencia de deshidrogenasa láctica [86]. El tejido infartado no se tiñe con AE ni TTC, puesto que corresponde a un tejido metabólicamente inactivo con ausencia, o muy escasa presencia de deshidrogenasa láctica [Figura 20].

Finalmente, cada corte fue fotografiado, utilizándose una cámara digital DP71 de 5 megapíxeles montada en un microscopio Olympus IX 81. Se tomaron entre 20-30 imágenes de secciones contiguas de cada corte, las que fueron posteriormente reconstruidas mediante el programa Adobe Photoshop CS6, obteniéndose una imagen de altísima resolución para cada corte. Luego se eliminó el tejido correspondiente a la pared libre del ventrículo derecho en cada una de las imágenes. La imágenes fueron analizadas mediante el uso del programa ImageJ 1.47v (National Institutes of Health, <http://imagej.nih.gov/ij>) de libre disponibilidad en la web, para lo cual se generaron una serie de instrucciones específicas [Macro desarrollado específicamente para este experimento, por los investigadores Pablo Olivero y Claudio Córdova del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso], las que de manera secuencial y automática seleccionan la imagen, ajustan el umbral de colores para visualizar el AR de cada imagen, analizando y cuantificando el número de píxeles de ésta y del total del corte del VI, generándose finalmente un informe en Microsoft Excel 2010, que entrega la relación AR/VI [76-78].

Los reactivos y soluciones que se utilizaron en el presente estudio experimental, se describen en la Tabla 2.

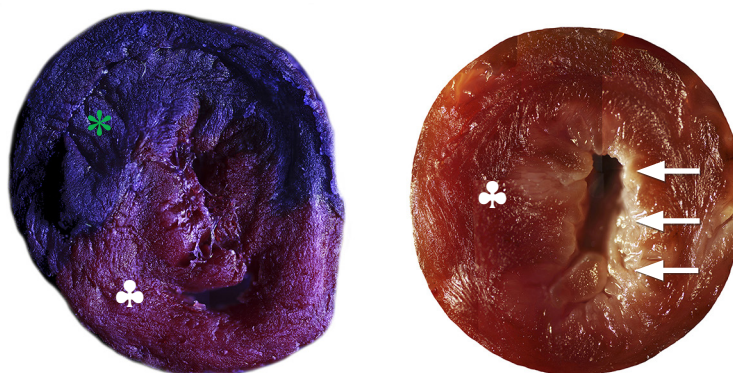


Figura 20. Cortes de corazón de rata a nivel apical en dos animales distintos, sometidos a 30 minutos de isquemia, teñidos con AE y TTC. Izquierda, el territorio de miocardio normal [no isquémico] aparece teñido de azul por AE [asterisco verde]. El AR [tejido miocárdico en riesgo pero viable], se teñió de color rojo con TTC [trébol blanco]. Derecha, tejido miocárdico en riesgo pero viable, teñido de color rojo con TTC y una pequeña zona no teñida, que corresponde a un pequeño infarto [Flechas blancas]. AE, azul de Evans; AR, área en riesgo; TTC, trifeniltetrazolio.

Tabla 2. Reactivos y soluciones utilizadas en el protocolo de isquemia in vivo en corazón de ratas

Solución	Composición	Conservación	Caducidad
AE 1%	1 g de AE en 100 ml Solución salina 0.9%	4 °C	Semanal
TTC 1%	1 g de TTC en 100 ml de PBS 0.1 Molar	4 °C	Diaria
PBS 0.1 Molar	Solución Stock: NaCl, 87.9 g; KH_2PO_4 , 2.74 g; NaHPO_4 , 11.35 g [Preparar en 1 L de H_2O destilada] Solución de trabajo: diluir 100 ml de solución Stock en 900 ml de H_2O destilada; Medir pH (7.2-7.4). Ajustado el pH, aforar hasta 1 L con H_2O destilada, concentración final 0.1 Molar	4 °C	Semanal
Formalina tamponada 10%	100 ml de Formaldehído 37%, 4 gr NaH_2PO_4 , 6.5 gr Na_2HPO_4 , 900 ml H_2O destilada	4 °C	Mensual

AE, azul de Evans; TTC, trifeniltetrazolio; PBS, tampón fosfato salino.

OBJETIVO GENERAL 2

Se estudiaron doce ratas macho Sprague Dawley con edad promedio $96,7 \pm 15,0$ días [Rango 90-127] y peso promedio $415,9 \pm 18,8$ g [Rango 385-443] al momento de la inducción.

5.6. Inducción experimental de diabetes

Para la inducción experimental de DM, se administró Aloxano en una dosis de 125 mg/kg en solución salina a través de la vía intraperitoneal [87]. Las ratas control recibieron un volumen equivalente de solución salina por la misma vía. La glicemia se midió a las 48 horas luego de la administración de aloxano, mediante el uso de un monitor de glucosa Advantage [Roche], utilizando muestras de sangre obtenidas de la vena femoral de los animales. Se consideraron ratas diabéticas aquellas que tenían glicemia superior a 200 mg/dl [88]. Para garantizar la viabilidad de las ratas diabéticas, éstas recibieron una inyección de 1 UI de insulina subcutánea cada 24 horas. Uno de los animales inducidos murió antes de la cirugía. Posteriormente, los animales del grupo control [n=6] y del grupo diabético [n=5], fueron aleatoriamente incorporadas al protocolo de isquemia ya descrito. La aleatorización se realizó con el programa Stata. Los tratamientos se mantuvieron enmascarados para el investigador principal y todos los colaboradores que realizaron evaluaciones y mediciones, en las distintas etapas de la investigación [tamaño del AR, estudio histológico y conteo de células marcadas en inmunohistoquímica]. La cirugía en el grupo diabético fue realizada 9.6 ± 0.5 días [rango 9-10] desde el día de la inducción de la diabetes. El protocolo quirúrgico empleado fue el descrito previamente.

5.7. Inmunohistoquímica

DETERMINACIÓN DE PARÁMETROS DE MUERTE CELULAR CARDIACA

DISTRIBUCIÓN DE CASPASA-3 ACTIVA Y CICLOFILINA-D

Para detectar y cuantificar parámetros de muerte celular cardiaca, se estudió la presencia de proteínas relacionadas con muerte celular por apoptosis [caspasa-3 activa] y necrosis [ciclofilina-D], presentes en el miocardio de los animales incluidos en el presente experimento. Para su identificación, se empleó la técnica de inmunohistoquímica sobre cortes histológicos de 5 μm de grosor, de muestras de la sección apical [corte E] y medio-ventricular [corte C] del VI del corazón de los animales estudiados.

Después de la desparafinación [tres pasajes de xilol durante 10 min cada uno], las secciones se hidrataron e incubaron con H_2O_2 al 3% diluido en PBS [V/V] durante 30 minutos, para bloquear la actividad de la peroxidasa endógena. Los preparados se lavaron con PBS [pH 7,3] y se bloquearon los sitios de antígenos inespecíficos con Cas-block [Invitrogen] y suero normal de cabra [Sigma] por 30 min cada uno. Luego, siguiendo las recomendaciones del fabricante, se aplicaron los siguientes anticuerpos primarios: anticuerpo policlonal hecho en conejo contra Caspasa-3 activa [ab13847; dilución: 1:500] y anticuerpo policlonal hecho en conejo diluido en PBS contra ciclofilina-D [Thermo Scientific PA3-022; dilución: 1:1000], los que se incubaron a 4°C durante toda la noche. Posteriormente, las secciones se lavaron con PBS y se incubaron con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo hecho en cabra unido con peroxidasa [H+L] [Invitrogen], en una dilución 1:1500 para la caspasa activa y 1:500 para la ciclofilina-D en PBS. Luego, para revelar la unión antígeno-anticuerpo, se usó amino-etil-carbazol [AEC] en presencia de peróxido de hidrógeno [Vector NovaRED]. Por último, las secciones tisulares se contratiñeron con hematoxilina de Harris, se deshidrataron rápidamente por alcoholes en concentraciones ascendentes, aclararon en xilol y se montaron con Entellán [Merck]. El conteo de células marcadas con caspasa-3 activa y ciclofilina-D, se realizó en los cortes previamente señalados. Cada uno de cortes fue analizado en microscopio

a un aumento 10X, identificándose 10 campos con marcaje celular acentuado para cada una de las técnicas inmunohistoquímicas previamente descritas. Luego se capturaron 10 imágenes digitalizadas de campos cercanos al endocardio en un aumento de 40x, utilizándose un microscopio [CX21, Olympus] con cámara digital [DP71, Olympus] y el programa DP Controller [Olympus].

En cada campo de visión, se contó el número de células marcadas positivamente [cmp] para cada una de las técnicas inmunohistoquímicas, en cardiomiocitos con núcleos claramente identificados. El procedimiento fue realizado por dos observadores ciegos a la intervención. Los datos fueron almacenados en una planilla Excel para su posterior análisis.

En la tabla 3, se muestran los reactivos utilizados durante la ejecución del experimento.

Tabla 3. Reactivos utilizados durante el estudio experimental

Reactivo	Compañía
AC 1° policlonal de conejo anti- caspasa-3	Abcam
AC 1° policlonal de conejo anti- ciclofilina D	Thermo Scientific
AC 2° peroxidasa-IgG de cabra anti-conejo	Invitrogen
Amino-etil-carbazol	Vector NovaRED
Azul de Evans	Sigma Chemical
Cas-block	Invitrogen
Hematoxilina de Harris	Arquimed
Peróxido de hidrógeno	Merck; Vector NovaRED
Trifeniltetrazolio	Sigma Chemical
Suero normal de cabra	Sigma

5.8. Histología

Se realizó estudio histológico con técnica convencional de hematoxilina-eosina, para evaluar la existencia de cambios estructurales en el tejido miocárdico del VI sometido a un periodo de isquemia continua de 30 minutos de duración, por oclusión quirúrgica de la ADA.

5.9. Análisis estadístico

Previo a la selección del procedimiento paramétrico o no paramétrico, se utiliza el test de Shapiro-Wilk [SW], para verificar si los datos provienen de un modelo gaussiano. Luego, se aplicó el test de Wilcoxon o test de Student, dependiendo de los resultados del SW. Se propuso trabajar con un nivel de significancia $\leq 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Objetivo general 1

Para el desarrollo de este protocolo experimental de isquemia miocárdica aguda, se estudiaron cuarenta ratas macho Sprague Dawley [SD], realizándose los estudios en un periodo de 9 meses.

Las características anatómicas de la ADA, observadas en el grupo de animales estudiados, era de tres tipos: I) la ADA se divide en dos ramos principales descendiendo ambos hacia el ápex del ventrículo izquierdo [VI] [50%]; II) la ADA discurre como único vaso hacia al ápex del VI, emergiendo de ésta algunos ramos de dimensiones variables [37,5%]; III) la ADA desciende hacia el ápex como vaso único dando origen en su trayecto a algunos ramos diagonales [12,5%] [Figura 21].

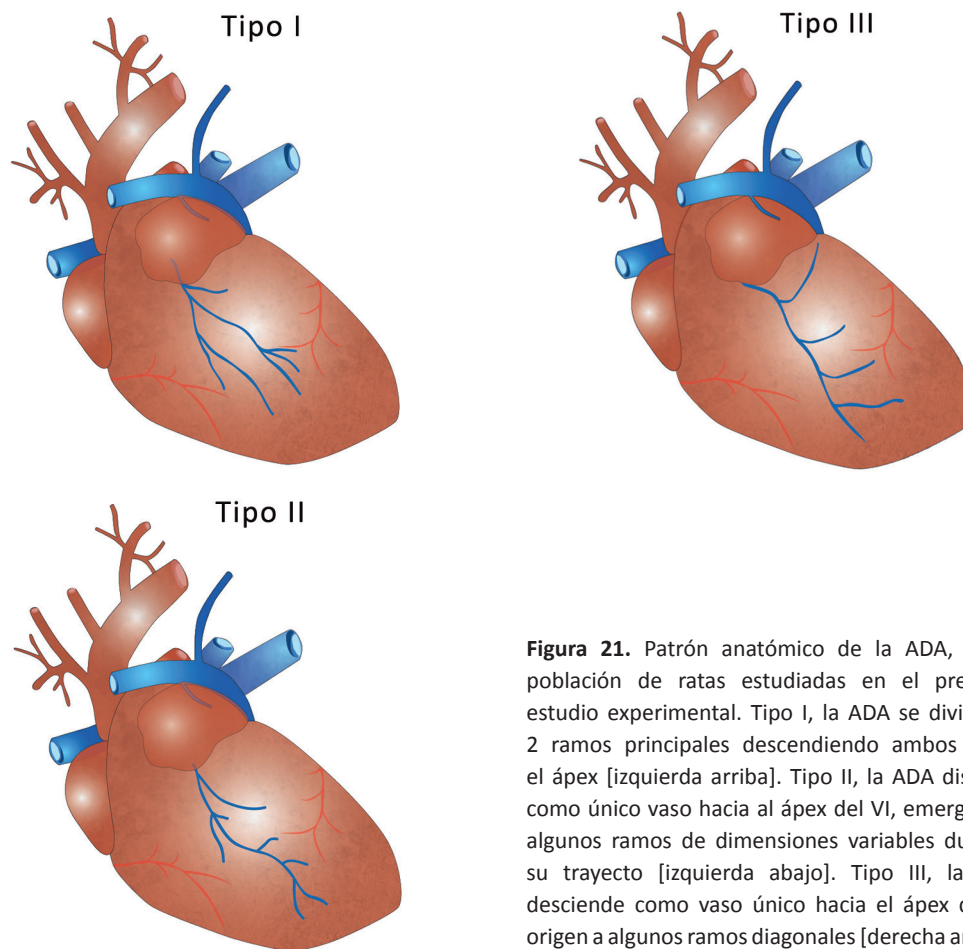


Figura 21. Patrón anatómico de la ADA, en la población de ratas estudiadas en el presente estudio experimental. Tipo I, la ADA se divide en 2 ramos principales descendiendo ambos hacia el ápex [izquierda arriba]. Tipo II, la ADA discurre como único vaso hacia al ápex del VI, emergiendo algunos ramos de dimensiones variables durante su trayecto [izquierda abajo]. Tipo III, la ADA desciende como vaso único hacia el ápex dando origen a algunos ramos diagonales [derecha arriba].

En la tabla 4, se muestra la incidencia de los eventos que ocurrieron, luego de la ligadura de la ADA. La detención del flujo en la ADA, provocó isquemia en el territorio miocárdico irrigado por este vaso con aparición de palidez en todos los casos, hipocinesia en el 80% y cianosis en 75%. Mientras que en el 82.5% de los casos, se registró elevación del segmento ST en el electrocardiograma [ver Figura 17]. Nueve animales [22.5%] desarrollaron arritmia cardíaca. Uno presentó extrasístoles ventriculares, cinco desarrollaron taquicardia ventricular autolimitada y tres fibrilación ventricular, arritmia que provocó la muerte de estos animales. Otras dos ratas, fallecieron como consecuencia de un fallo anestésico.

Tabla 4. Eventos durante protocolo de isquemia miocárdica *in vivo* [Ratas]

Evento	n = 40	
Palidez	40 [100%]	
Cianosis	30 [75%]	
Hipocinesia	32 [80%]	
Elevación de ST	33 [82.5%]	
Arritmias	9 [22,5%]	1 EV; 5 TVA; 3 FV
Muerte	5 [12,5%]	3 FV; 2 fallo anestésico

TVA, taquicardia ventricular autolimitada; FV, fibrilación ventricular; EV, extrasistolía ventricular

Este protocolo se dividió en etapas I y II, con el objeto de evaluar el efecto de la curva de aprendizaje sobre el tiempo de ejecución de los siguientes procesos: inducción anestésica, traqueotomía-canulación, toracotomía, ligadura de la ADA. En la tabla 5 y en las Figuras 22, 23, 24 y 25, se muestran las comparaciones de las variables indicadas en las etapas I y II. Durante la etapa II, hubo una significativa reducción del tiempo de ejecución en todos los procesos.

Tabla 5. Tiempos de procesos en protocolo de isquemia miocárdica en modelo murino *in vivo* [Ratas].

Características		Etapa		Probabilidad de significación
		I	II	
Cantidad de animales	[n]	20	20	
Inducción anestésica	[min]	9,3 [IC 95%: 7,1-11,1]	4,6 [IC 95%: 3,8-5,4]	< 0,0001
Traqueotomía	[min]	8,5 [IC 95%: 6,9-10,1]	4,1 [IC 95%: 3,5-4,6]	< 0,0001
Toracotomía	[min]	9,6 [IC 95%: 8,1-11,0]	4,8 [IC 95%: 4,3-5,2]	< 0,0001
Ligadura ADA	[min]	12,0 [IC 95%: 9,9-14,1]	6,2 [IC 95%: 5,2-7,2]	< 0,0001

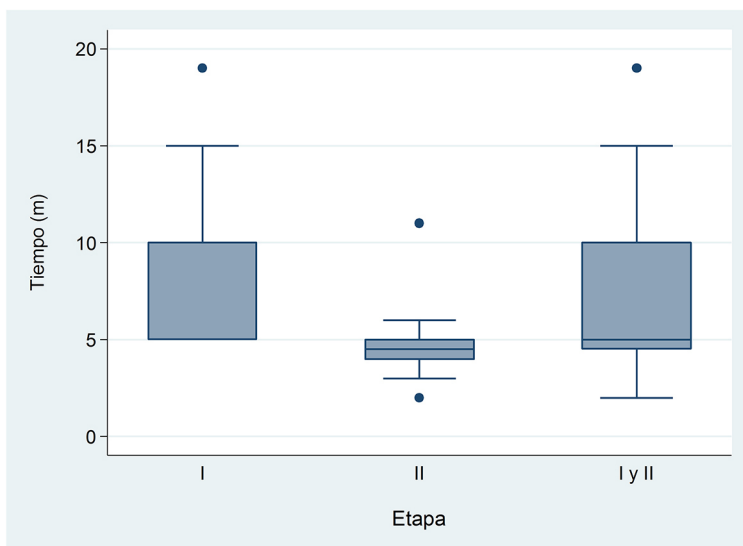


Figura 22. Tiempo de la inducción anestésica, según etapa.

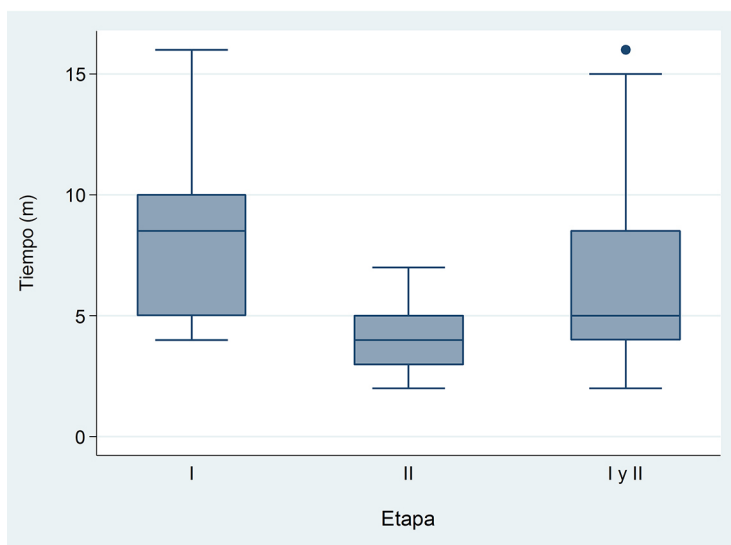


Figura 23. Tiempo para realizar la traqueotomía, según etapa.

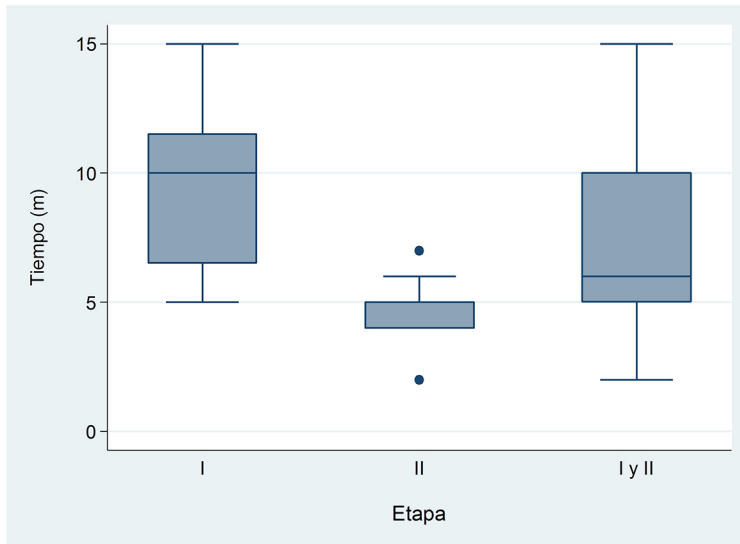


Figura 24. Tiempo utilizado para realizar la toracotomía, según etapa.

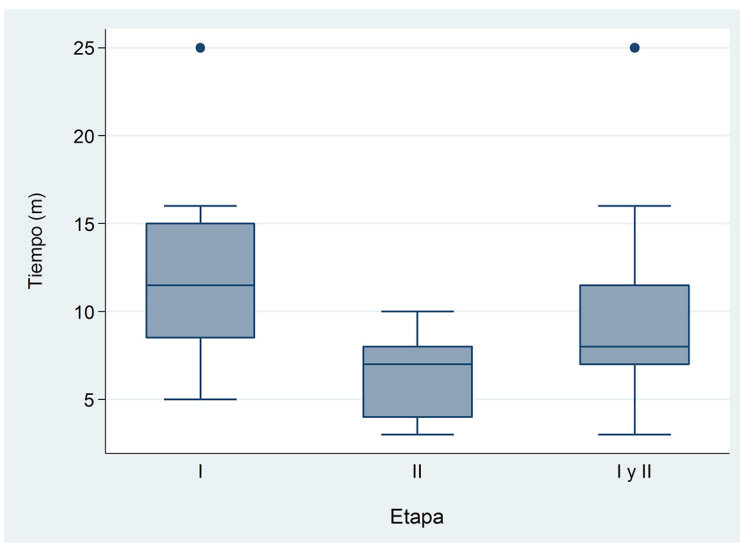


Figura 25. Tiempo utilizado para realizar la ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, según etapa.

6.2. Objetivo general 2

En la tabla 6, se muestra la comparación de características generales del grupo control y diabético. Como se observa, no hay diferencias significativas en el peso de los animales antes de la inducción de la DM. El día de la cirugía, la edad promedio del grupo diabético era mayor que la del grupo control, pero esta diferencia no alcanzó significancia estadística. Sin embargo, la glicemia era significativamente mayor en el grupo diabético respecto del grupo control [428,2 vs 125,3 gramos, $p < 0,001$] y el peso significativamente menor [350,0 vs 429,0 gramos, $p < 0,0001$].

Tabla 6. Características generales del grupo control vs grupo diabético

	Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]	Probabilidad de significación
Peso/pre-inducción [g]	414,3 [IC 95%: 393,5-435,1]	417,8 [IC 95%: 393,6-442,0]	NS
Edad/día cirugía [días]	97,5 [IC 95%: 96,9 -98,1]	121,8 [IC 95%: 83,1 -160,6]	NS
Peso día cirugía [g]	429,0 [IC 95%: 407,8-450,2]	350,0 [IC 95%: 323,1-476,9]	<0,0001
Glicemia día cirugía [mg/dL]	125,3 [IC 95%: 121,6-129,1]	428,2 [IC 95%: 216,2-640,2]	<0,001

La disminución del peso - desde la inducción de la diabetes (día de aleatorización) y el día de la cirugía, fue significativamente mayor en los animales del grupo diabético respecto del grupo control [-67,8 g [IC 95%: -116,2-19,4] vs 14,7 g [IC 95%: -5,51-34,8] [$p < 0,0007$] [Figura 26].

Las características anatómicas de la ADA y los eventos observados luego de la ligadura de la ADA, se describen en las Tablas 7 y 8, respectivamente.

Tabla 7. Características anatómicas de la arteria descendente anterior

	Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]
Tipo I	2	3
Tipo II	3	2
Tipo III	1	0

Tabla 8. Eventos durante el desarrollo del experimento

	Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]
Palidez	6	5
Cianosis	6	4
Hipocinesia/acinesia	6	4
Elevación de ST	6	4
Arritmias	No	1

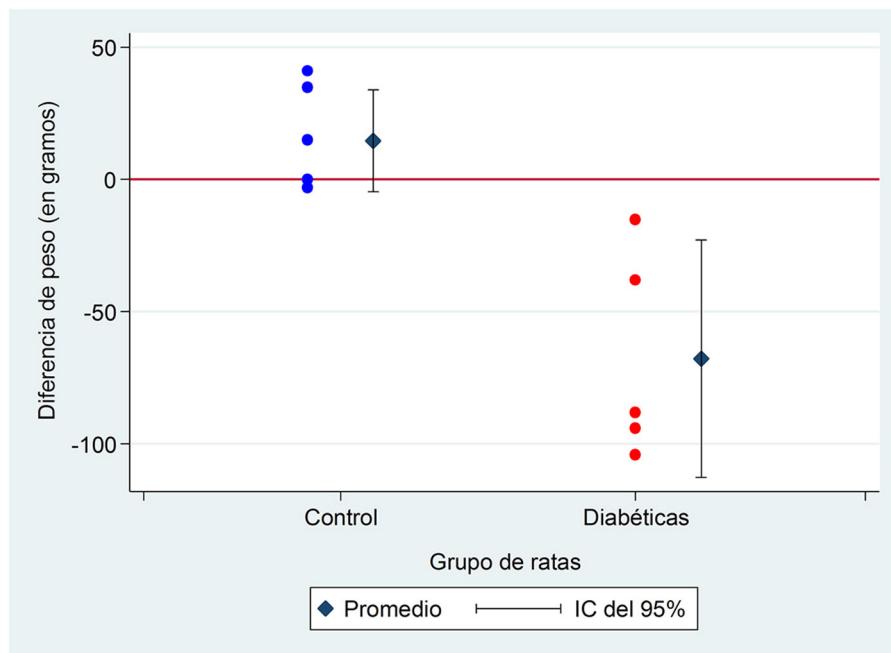


Figura 26. Diferencia del peso en el grupo control vs el grupo diabético [valores individuales y promedio con intervalo de confianza [IC], que se produjo desde la inducción de la diabetes y el día de la cirugía experimental. El grupo diabético experimentó una marcada reducción del peso en comparación a los controles [$p < 0,0001$].

6.2.1. Área de miocardio en riesgo e infartado

No se identificó áreas de infarto en ninguno de los animales estudiados del grupo diabético y control. Sin embargo, el AR promedio fue mayor en el grupo control 31,3% [IC 95%: 26,6-35,9] vs el grupo diabético 23,7% [IC 95%: 18,4-28,9], diferencia estadísticamente significativa [$p < 0.009$] [Figura 27].

La administración de 1 mL de AE1% directa a la cavidad del VI por punción apical, una vez clampeada la aorta torácica ascendente [82], fue suficiente para discriminar con nitidez entre el tejido sano que se tiñe de color azul y el tejido isquémico [AR] que no se tiñe [ver Figura 18]. Por otra parte, la utilización de una matriz de acero inoxidable diseñada específicamente para corazón de ratas, permitió la obtención de cortes homogéneos del VI y comparables entre los distintos animales [ver Figura 19].

La incubación de los cortes con TTC1%, hizo posible diferenciar el AR con miocardio viable que se tñió de color rojo [ver Figura 20].

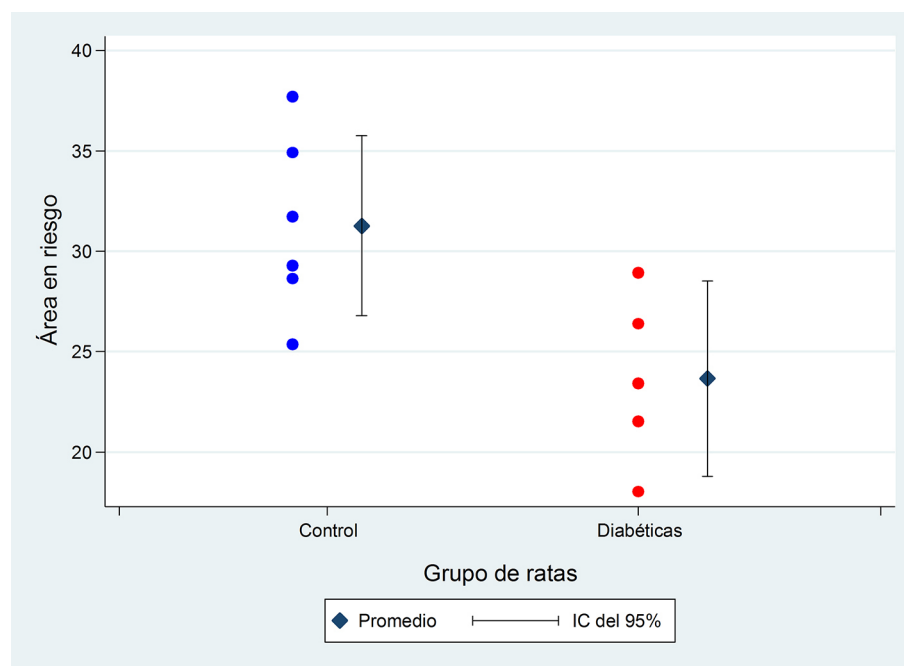


Figura 27. Diferencia del área en riesgo [AR] entre ratas del grupo control y del grupo diabéticas [valores individuales y promedio con intervalo de confianza [IC]. El AR, es significativamente mayor en los controles respecto de las ratas diabéticas [$p < 0,0001$].

El análisis del AR en cada de uno de los cortes de VI - organizados desde la base del corazón al ápex - se muestra en la Tabla 9 y en la Figura 28. Como se observa, el AR fue significativamente mayor en los cortes A y C del grupo control respecto del grupo diabético.

Tabla 9. Área en riesgo en cortes del ventrículo izquierdo desde la base al ápex.

	Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]	Probabilidad de significación
Corte A	28,7 [IC 95%: 21,1-36,2]	11,2 [IC 95%: -1,3-23,7]	0,004
Corte B	21,0 [IC 95%: 11,4 -30,7]	17,2 [IC 95%: 1,8 -32,6]	NS
Corte C	32,3 [IC 95%: 22,1-42,4]	17,7 [IC 95%: 3,2-32,1]	0,02
Corte D	32,9 [IC 95%: 21,1-44,9]	32,4 [IC 95%: 15,4-49,4]	NS
Corte E	42,4 [IC 95%: 28,7-54,3]	39,8 [IC 95%: 14,8-64,7]	NS

Corte A, base del ventrículo izquierdo [VI]. Corte E, ápex del VI.

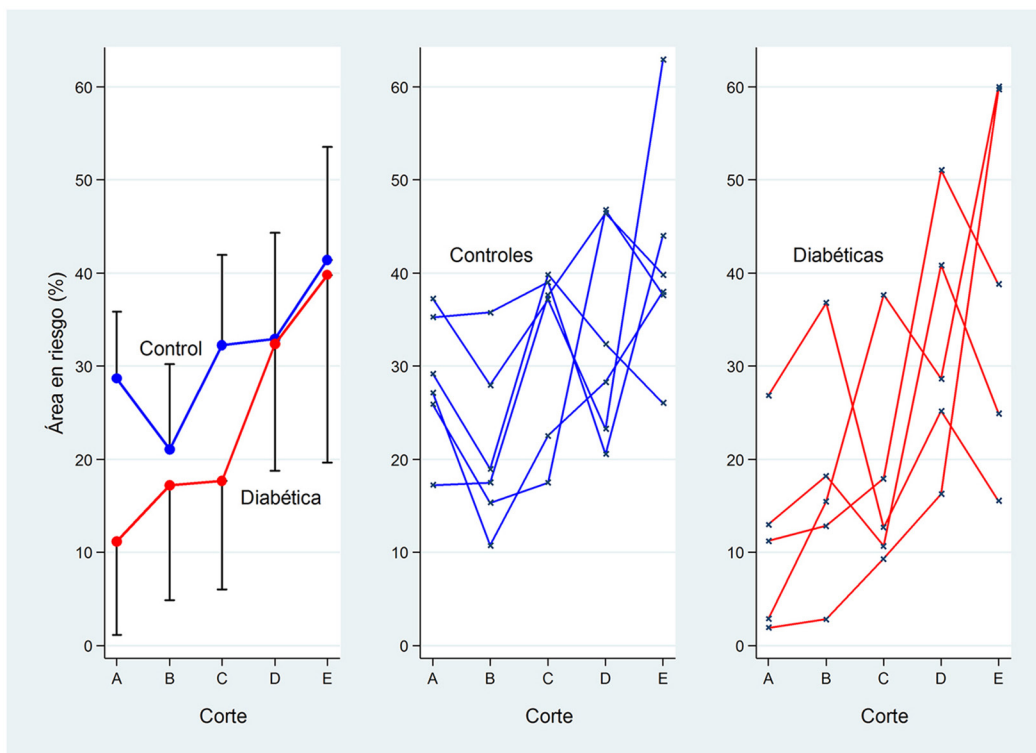


Figura 28. Izquierda: Área en riesgo [AR] promedio a través de cinco cortes del ventrículo izquierdo desde la base al ápex [A a E]. Centro, AR en los animales del grupo control. Derecha, AR en los animales del grupo diabético.

En la figura 29, se muestran los cortes del corazón de un animal del grupo diabético.

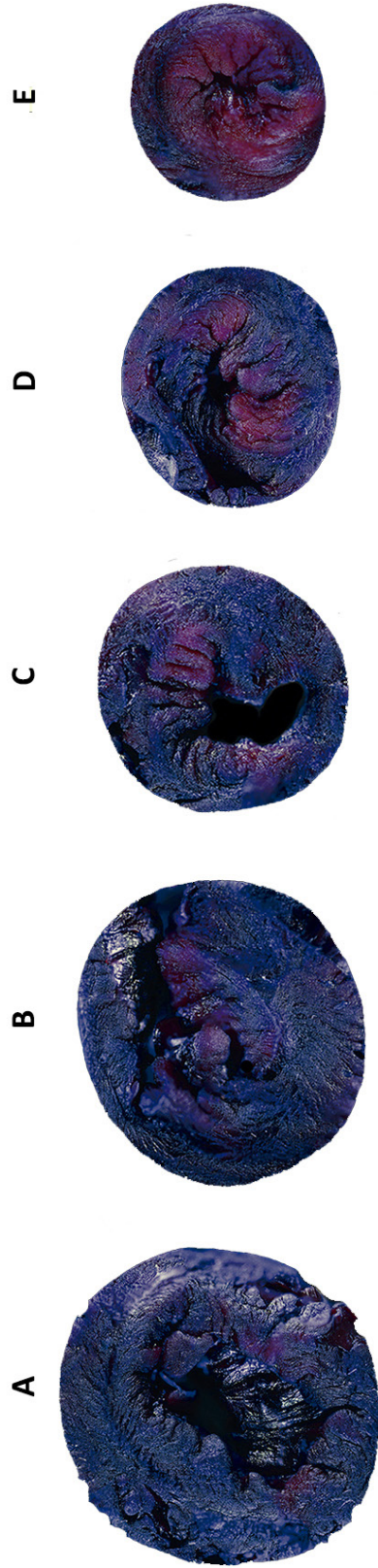


Figura 29. Cortes de corazón desde la base al ápex [cortes A, B, C, D y E] de un animal del grupo diabético [Rata nº 11], después de un periodo de isquemia de 30 minutos, luego de la ligadura permanente de la arteria coronaria descendente anterior. El AR, se estudió mediante la técnica de doble tinción con AE 1% y TTC 1%. El tejido miocárdico no isquémico aparece teñido de color azul por el colorante AE [tejido miocárdico no irrigado por la ADA]. El AR [tejido isquémico pero viable] se tiñe de color rojo por el colorante TTC. Posteriormente, se estimó el porcentaje del AR respecto del área total del VI, mediante el programa Imagem, aplicándose un Macro desarrollado por investigadores del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso [PO y CC]. Corte A: 1,9%; corte B: 2,8%; corte C: 9,3%; corte D: 16,3%; corte E: 59,7%. El AR, es significativamente mayor en el corte E [ápex de VI]. AR, área en riesgo; AE, azul de Evans; TTC, trifeniltetrazolio; VI, ventrículo izquierdo.

6.2.2. Parámetros de muerte celular cardiaca [inmunohistoquímica]

CASPASA-3 ACTIVA

En la Tabla 10 y Figura 30, se muestra el número de células cardiacas marcadas con Caspasa-3 activa en los cortes C y E, del animal control no sometido a isquemia y de los animales tratados del grupo control y diabético. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de cardiomiocitos marcados con Caspasa-3 activa entre los grupos control y diabético. Destaca, sin embargo, que el marcaje del animal sano no sometido a isquemia no difiere significativamente de los dos grupos estudiados.

Tabla 10. Distribución de Caspasa 3 activa en corte C [medial] y corte E [apical] de ventrículo izquierdo

	Control [n=1]	Animales sometidos a Isquemia		Probabilidad de significación
		Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]	
Corte C [cmp]	8,8	10,1 [IC 95%: -0,7-20,1]	9,1 [IC 95%: 4,9-13,2]	NS
Corte E [cmp]	8,3	8,9 [IC 95%: 1,9 -15,8]	5,7 [IC 95%: 0,02 -11,4]	NS

Corte C [medial] y Corte E [apical] del ventrículo izquierdo. cmp, células con marcaje positivo.

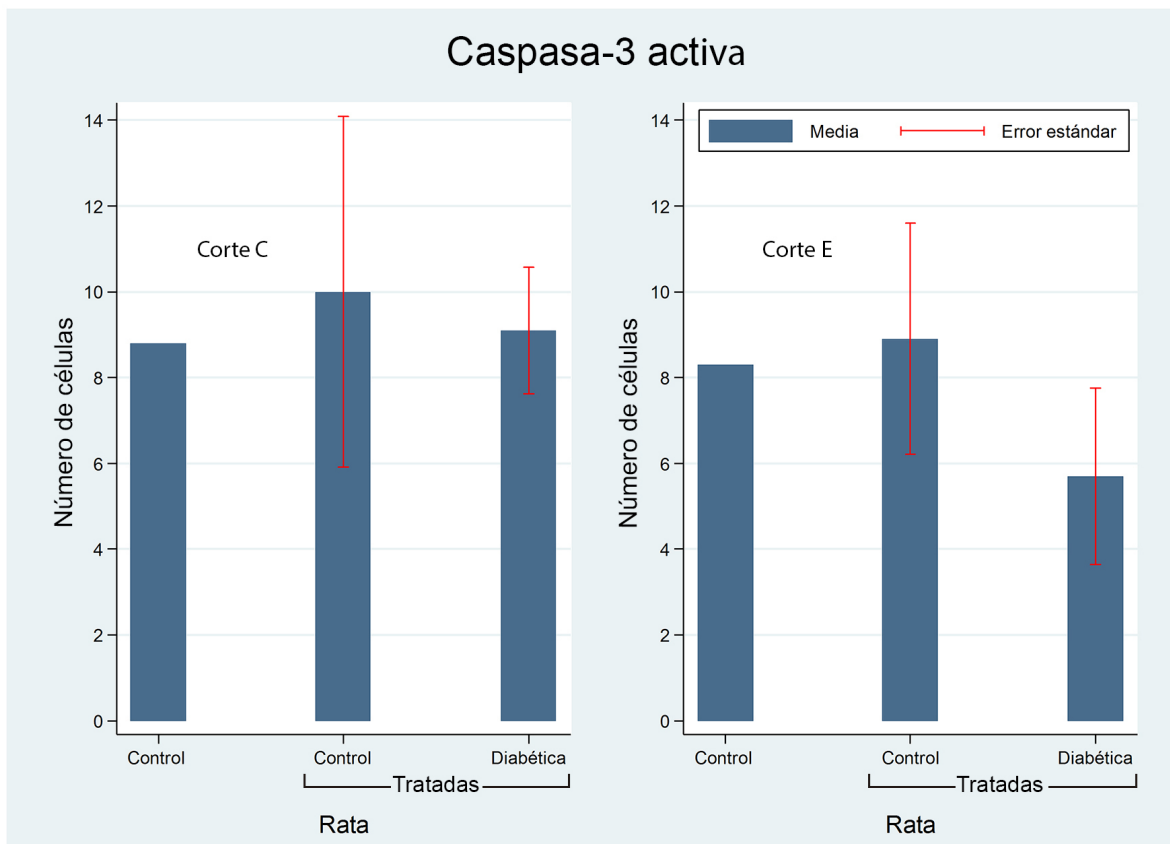


Figura 30. Diferencia de cardiomiocitos marcados con Caspasa-3 activa en rata control no sometida a isquemia, y entre ratas del grupo control y del grupo diabético, en los cortes C [izquierda] y E [derecha].

En la Figura 31, se muestra el estudio inmunohistoquímico con marcaje de Caspasa-3 activa en cortes de VI en un animal del grupo control [corte E] y un animal del grupo diabético [corte C], así como el control negativo de la técnica.

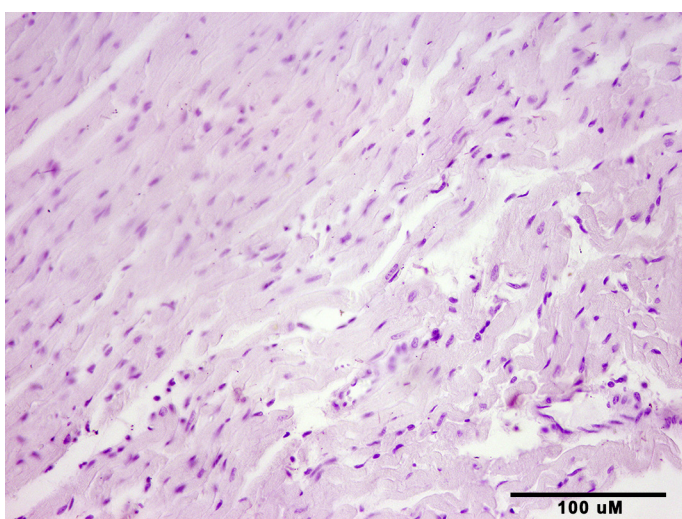
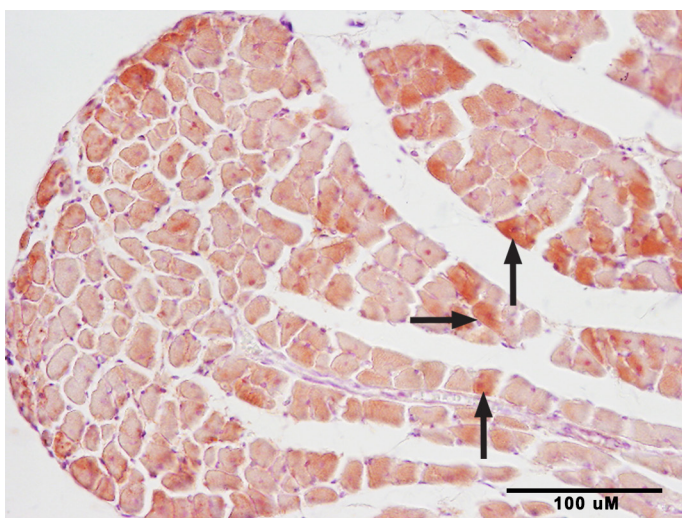
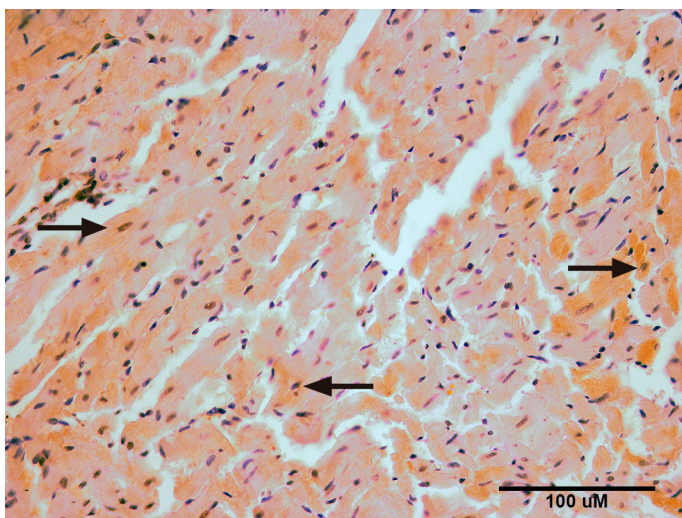


Figura 31. Marcaje con Caspasa-3 activa. Arriba, cardiomiocitos con marcación en corte E [ápex], en rata control n° 1 [Flechas negras]. Centro, cardiomiocitos con marcación en corte C [corte medio de VI], en rata diabética N° 10 [Flechas negras]. Abajo, control negativo para Caspasa-3 [corte no expuesto a anticuerpo].

CICLOFILINA-D

En la Tabla 11 y Figura 32, se presenta el número de células cardíacas marcadas con Ciclofilina-D en los cortes C y E, del animal control no expuesto a isquemia y de los animales tratados del grupo control y diabético. No hubo diferencia estadísticamente significativa en el número de cardiomiocitos marcados con Ciclofilina-D entre los grupo control y diabético. En el animal control-control, el marcaje en el corte C, es prácticamente nulo [0,2 cmp], no existiendo marcaje en el corte E.

Tabla 11. Distribución de Ciclofilina D en corte C [medial] y corte E [apical] de ventrículo izquierdo

	Control [n=1]	Animales sometidos a Isquemia		Probabilidad de significación
		Grupo Control [n=6]	Grupo Diabético [n=5]	
Corte C [cmp]	0,2	8,4 [IC 95%: 3,0-13,9]	5,1 [IC 95%: 1,9-8,2]	NS
Corte E [cmp]	0	6,8 [IC 95%: 0,9 -12,7]	5,8 [IC 95%: 0-13,2]	NS

Corte C [medial] y Corte E [apical] del ventrículo izquierdo. cmp, células con marcaje positivo.

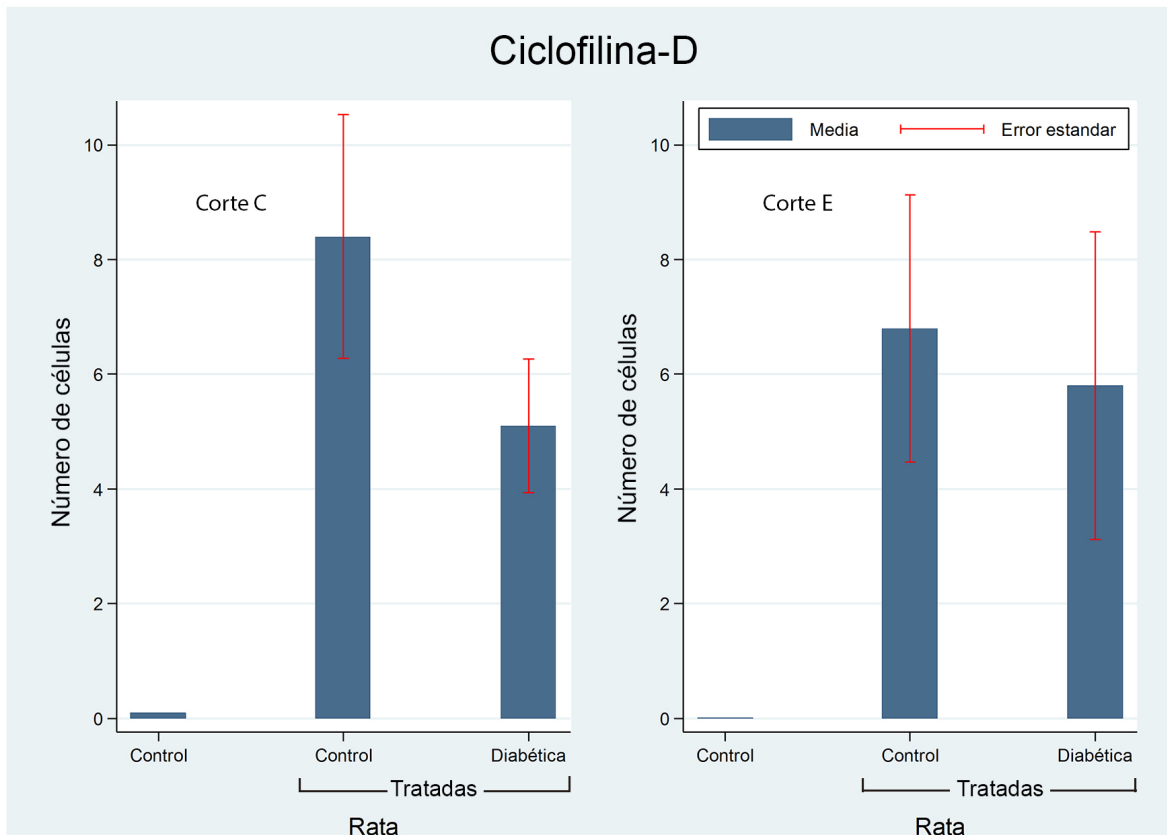


Figura 32. Diferencia de cardiomiocitos marcados con Ciclofilina-D en rata control no sometida a isquemia, y entre ratas del grupo control y del grupo diabético en corte C [izquierda] y corte E [derecha].

En la Figura 33, se muestra el estudio inmunohistoquímico con marcaje de Ciclofilina-D en cortes de VI en un animal del grupo control [corte E] y otro del grupo diabético [corte C], así como del control negativo para la técnica.

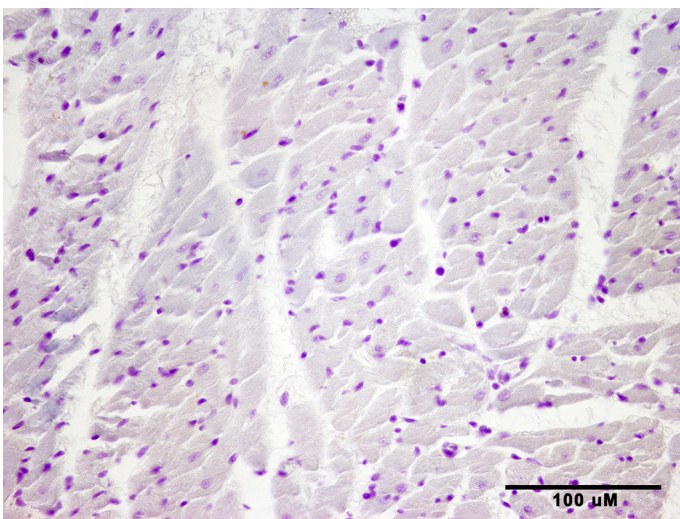
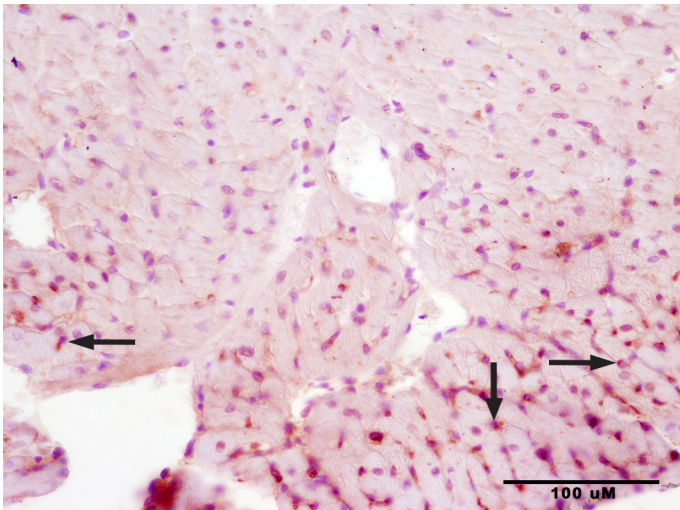
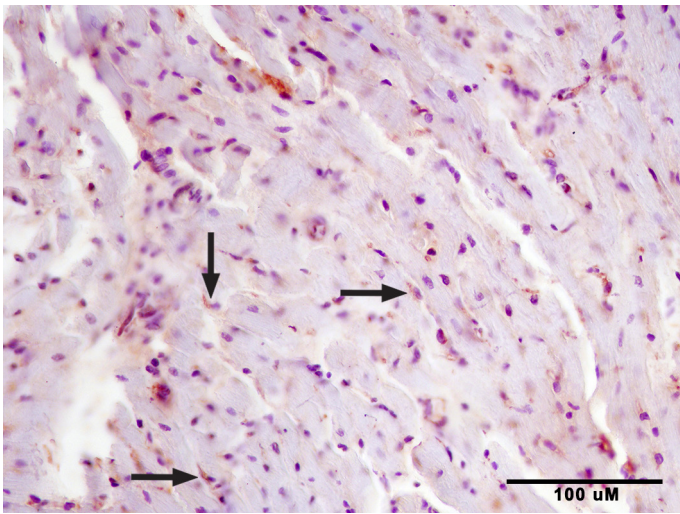


Figura 33. Marcaje con Ciclofilina-D. Arriba, cardiomiocitos con marcación en corte E [ápex], en rata control n° 4 [Flechas negras]. Centro, cardiomiocitos con marcación en corte C [corte medio de VI], en rata diabética N° 11 [Flechas negras]. Abajo, control negativo para Ciclofilina-D [corte no expuesto a anticuerpo].

6.2.3. Histología

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina, mostraron en un animal del grupo control sometido a isquemia, un pequeño foco con hemorragia intersticial, fragmentación de algunas fibras musculares y edema [Figura 34] y en otro animal un área de necrosis de coagulación con eosinofilia de fibras y pérdida de sus núcleos [Figura 35]. En el grupo diabético, en tres animales se encontró una pequeña zona con un par de fibras musculares necróticas con células mononucleares a su alrededor [Figura 36]. El análisis histológico del corazón en los restantes animales del grupo control y diabético, así como del animal control-control fue normal.

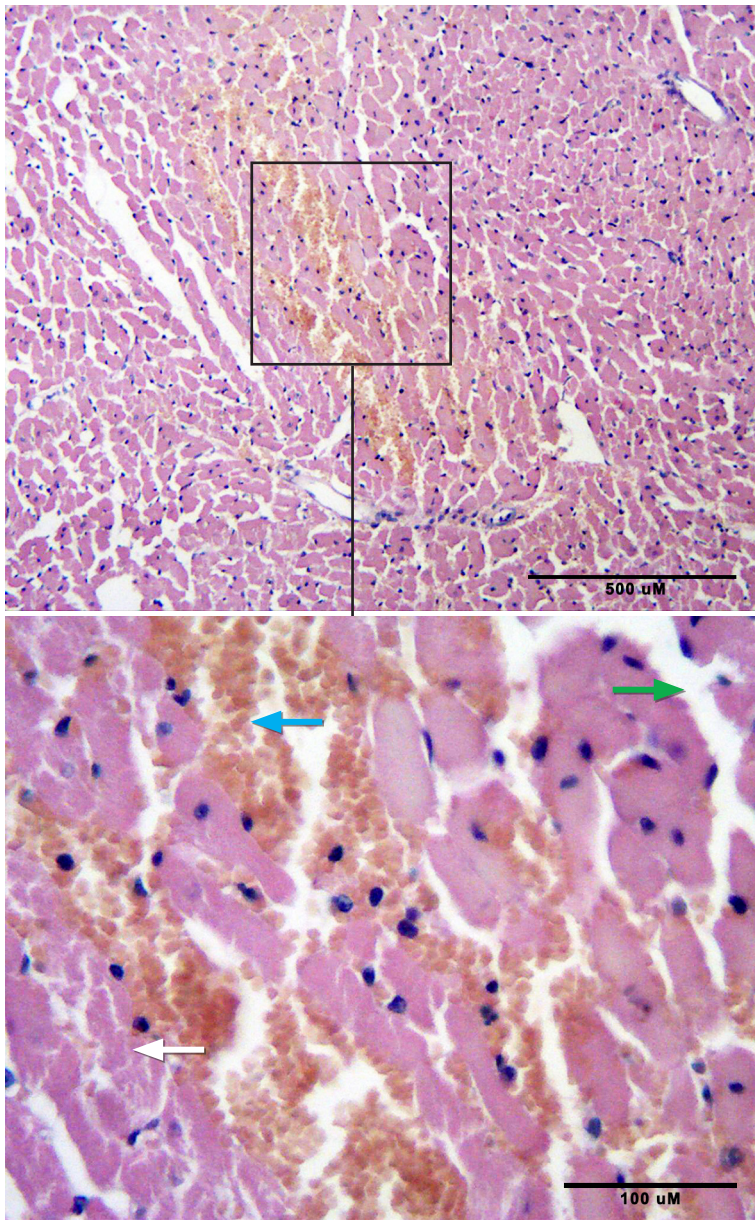


Figura 34. Histología con tinción de hematoxilina-esosina en corte C [medial] de ventrículo izquierdo de una rata control [n°2]. Arriba, con aumento 10x se observa pequeño foco de hemorragia intersticial, fragmentación de algunas fibras musculares y edema [cuadrado negro]. Abajo, con aumento 40x se visualiza con mayor claridad los hallazgos descritos: hemorragia intersticial [Flecha azul], fragmentación de fibras musculares [Flecha blanca] y edema [Flecha verde].

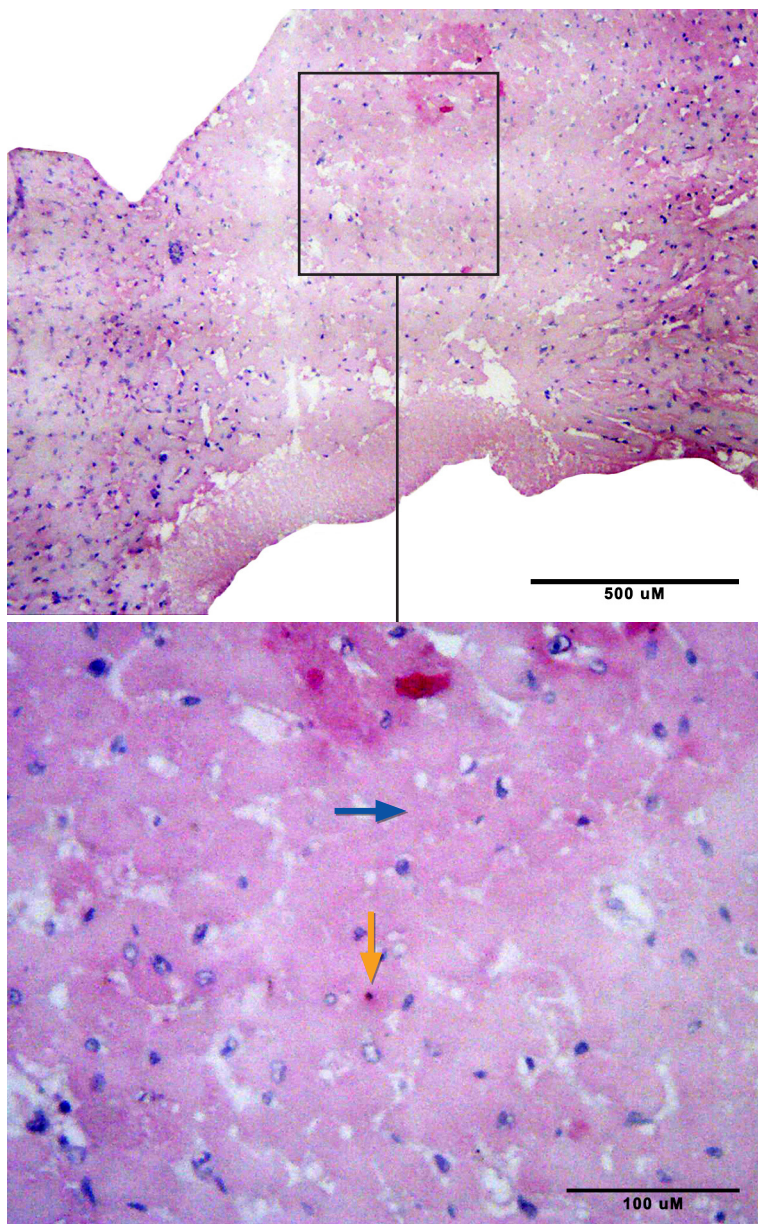


Figura 35. Histología con tinción de hematoxilina-esosina en corte C [medial] de ventrículo izquierdo de una rata control [n°6]. Arriba, con aumento 10x se observa un área de necrosis de coagulación con eosinofilia de fibras y pérdida de sus núcleos [cuadro negro]. Abajo, con aumento 40x se visualiza con mayor claridad los hallazgos descritos: coagulación de fibras con pérdida de sus núcleos [Flecha azul] y picnosis [Flecha naranja].

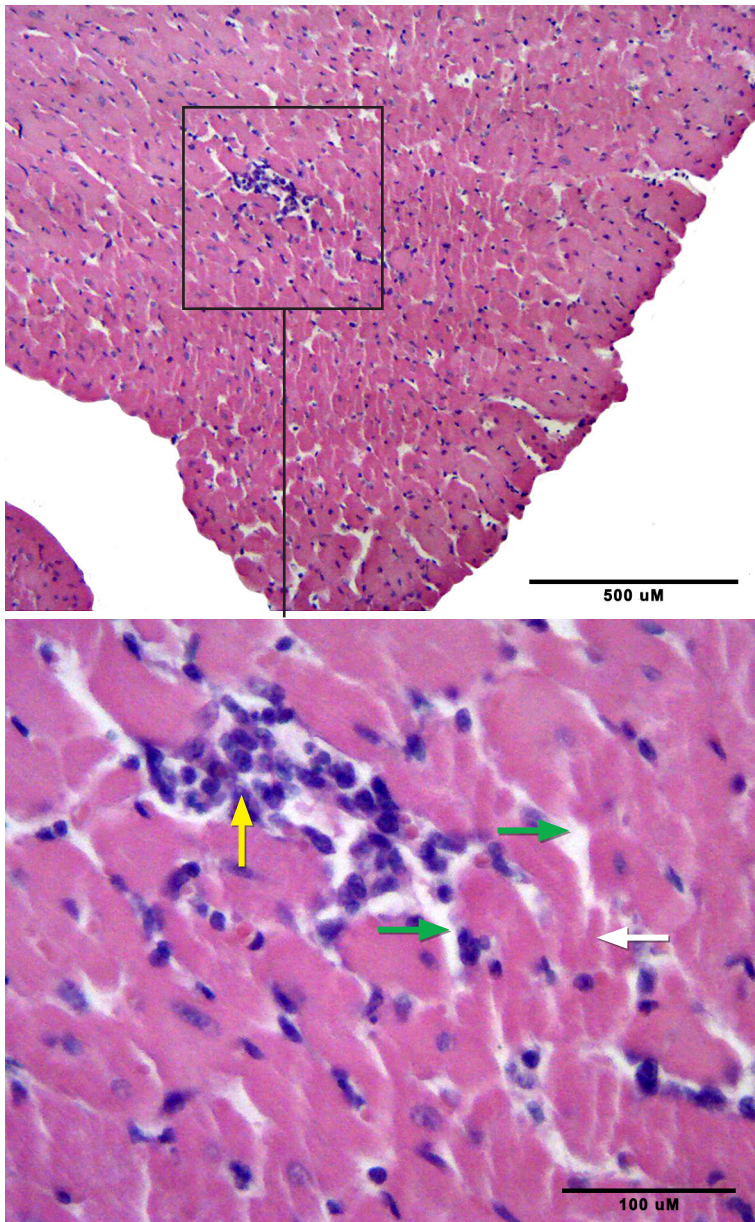


Figura 36. Histología con tinción de hematoxilina-esosina en corte C [medial] de ventrículo izquierdo de una rata diabética [n°7]. Arriba, con aumento 10x se observa una pequeña zona con un par de fibras musculares necróticas con células mononucleares a su alrededor y edema [cuadrado negro]. Abajo, con aumento 40x se visualiza con mayor claridad los hallazgos descritos: células mononucleares [Flecha amarilla], edema [Flechas verdes], fragmentación de fibras musculares [Flecha blanca].

7. DISCUSIÓN

La muerte del cardiomiocito en el IAM, ha sido estudiada en modelos animales, comúnmente en pequeños mamíferos como ratones y ratas, luego de la ligadura de una rama coronaria importante, remediando las características y la evolución del IAM en humanos [89]. Este modelo permite que la duración de la oclusión sea definida por el investigador según su objetivo experimental, permitiendo su reproducibilidad [90].

Si bien, la oclusión de una arteria coronaria en la rata, no es análoga a la patogénesis de la enfermedad coronaria, causa del infarto en el hombre [11], su evolución histológica es comparable [91,92]. La extrapolación a los humanos de los resultados obtenidos en estos modelos, aunque discutible, es desde el punto de vista de la biología celular y molecular válida [88]. El modelo animal en ratas, resulta ventajoso porque son económicas de mantener, la cirugía no es muy compleja y el corazón es lo suficientemente pequeño, permitiendo la cuantificación del infarto en pocos cortes histopatológicos [91].

PLATAFORMA QUIRÚRGICA EXPERIMENTAL DE ISQUEMIA MIOCÁRDICA AGUDA

A continuación, se discutirá el desarrollo y puesta en funcionamiento de una plataforma de isquemia miocárdica aguda en ratas. Previo a su ejecución, se realizó una extensa y minuciosa revisión bibliográfica de la literatura médica y experimental [76-86,93] y una capacitación en cirugía experimental en el Departamento de Medicina Regenerativa de la Clínica Mayo [Rochester, USA], contando, además, con la colaboración de expertos de esta institución para su puesta en marcha. Un total de cuarenta ratas Sprague Dawley, fueron incluidos para desarrollar un protocolo experimental íntegro y reproducible. Los animales fueron intervenidos en tabla quirúrgica temperada para mantener la temperatura corporal en 37°C. El anestésico utilizado fue isoflurano en dosis de 5% mezclado con oxígeno al 100% para la inducción en caja anestésica [ver Figura 8], mientras que la dosis de mantención fue 2-3% durante todo el desarrollo de la cirugía [74]. Los animales fueron intubados mediante una traqueotomía, puesto que es una técnica más simple y permite

una fijación más segura de la cánula endotraqueal, evitando su desplazamiento accidental que puede ser fatal [75], como ocurrió en uno de nuestros animales durante el curso del experimento. La ventilación mecánica de los animales se realizó utilizando un ventilador modalidad volumen control [ver Figura 13]. La arteria coronaria que se ligó fue la ADA, vaso que presentó algunas variantes anatómicas, hallazgo que amplía lo observado por otros autores [93]. Se identificó tres tipos de anatomía de la ADA, siendo los más comunes el tipo I [50%] y II [37.5%] [ver Figura 21]. En el tipo I, la ADA se divide en dos ramos principales que descienden hacia el ápex del VI y en el tipo II, la ADA discurre como único vaso hacia la región apical del VI. El abordaje quirúrgico de la ADA, se realizó mediante una esternotomía [75], a diferencia de otros protocolos en los que se utiliza toracotomía izquierda [76-78, 94-98]. Con esta técnica, no es necesario el uso de un retractor quirúrgico que puede ocasionar incidentalmente la muerte del animal, producto de hemorragia secundaria a lesiones de la orejuela izquierda y/o arteria pulmonar [98]. Uno de los momentos cruciales del procedimiento, es conseguir pasar el punto de la sutura por el sitio exacto, dificultado por la elevada frecuencia cardíaca del corazón de la rata. Para obviar esta situación, se utilizó un cotonete de algodón presionando la superficie del VI delicadamente, maniobra que disminuye el movimiento del corazón, evitándose el desgarro de la arteria coronaria o el miocardio bajo ésta [76]. Una vez ligada la ADA, se observó un área de isquemia en el miocardio irrigado por este vaso, que fue comprobada por la aparición de palidez en todos los animales [Tabla 4]. El patrón anatómico de la ADA no influyó en los eventos observados post-ligadura. El AR de infarto fue calculada mediante la técnica de doble tinción con azul AE1% y TTC1% [76-79]. Al término de treinta minutos de isquemia y luego de clampearse la aorta ascendente, se administró 1 ml de AE1% directamente a la cavidad del VI por punción apical [82], dosis que fue suficiente para discriminar con nitidez entre el tejido sano - no dependiente de la irrigación de la ADA - que se tiñió de color azul y el AR [tejido isquémico] que no se tiñió [ver Figura 18]. Se extrajo el corazón rápidamente, eliminándose el exceso de AE con solución de PBS, se recortó el tejido auricular, seccionándose el corazón en 5 cortes homogéneos de 3 milímetros cada uno, en matriz de acero inoxidable [ver Figura 19]. Los cortes fue-

ron inmediatamente incubados en TTC 1% y fijados en formalina tamponada 10%. El TTC tiñió de color rojo el tejido miocárdico isquémico pero metabólicamente activo [ver Figura 20] [76-81]. Posteriormente, se obtuvo entre 20-30 imágenes de secciones contiguas de cada corte las que fueron reconstruidas mediante el programa Adobe Photoshop CS6, obteniéndose imágenes de altísima resolución que después se analizaron mediante el programa ImageJ 1.47v de libre disponibilidad en la web, aplicándose un procedimiento de análisis de las imágenes [macro] desarrollado específicamente para este experimento por investigadores del Centro de Investigaciones Biomédicas de la Escuela de Medicina de la Universidad de Valparaíso, que de manera secuencial y automática entrega la relación AR/VI.

En la tabla 4, se describen los eventos que se observaron luego de la ligadura de la ADA. Se produjo palidez en la zona de isquemia en la totalidad de los casos y con menor incidencia hipocinesia [80%], cianosis [75%], elevación del segmento ST [82.5%] [ver Figura 17] y arritmias [22.5%]. La mortalidad total alcanzó un 12.5%, cifra comparable con otros estudios [93,97,98], cuya causa fue fibrilación ventricular en tres animales y en dos un fallo anestésico. Las dos últimas ocurrieron en la etapa I, y pueden ser atribuidas a la curva de aprendizaje, toda vez que no ocurrieron durante la etapa II. Mientras que el desarrollo de FV es inherente a la isquemia aguda del miocardio y magnitud del tejido miocárdico isquémico [99,100]. Con el objeto de evaluar el efecto que la curva de aprendizaje tuvo sobre el desarrollo del protocolo implementado, éste se dividió en las etapas I y II, estimándose los tiempos de ejecución de los siguientes procesos: inducción anestésica, traqueotomía-canulación, toracotomía y ligadura de la ADA. Durante la etapa II, hubo una significativa reducción del tiempo de ejecución en todos los procesos [Tabla 5], lo que traduce la importancia del entrenamiento para realización de este tipo de microcirugía de manera rápida y eficaz [Figuras 22 a 25].

Esta plataforma experimental, posibilitará la realización de estudios *in vivo*, en un corazón *in situ*, a semejanza de lo que ocurre en el ser humano, a diferencia de otros modelos como el corazón aislado y perfundido en un sistema Langendorff, o en cultivos celulares [101].

ISQUEMIA MIOCÁRDICA AGUDA EN RATAS DIABÉTICAS

En el presente estudio experimental, se evaluó si la DM constituye un factor que amplifica el daño del cardiomiocito, producto de isquemia miocárdica aguda secundaria a la ligadura quirúrgica permanente de la ADA, mediante la aplicación del protocolo previamente descrito.

La DM es un reconocido factor de mal pronóstico en la cardiopatía isquémica [5-9], cuyos mecanismos moleculares no están completamente aclarados a la fecha. Recientemente, sin embargo, se ha observado que la DM inducida experimentalmente, puede afectar algunas vías de cardioprotección endógenas, al disminuir la expresión de receptores de potencial transitorio V1 [14,15], estructuras que actúan como sensores de la isquemia miocárdica, protegiendo al corazón durante el proceso isquémico al liberar sustancias que ejercen un rol de cardioprotección [16].

En el modelo experimental *in vivo*, se ha demostrado que la isquemia miocárdica produce cambios ultraestructurales precoces en el cardiomiocito con pérdida de su función contráctil, la que se recupera íntegramente si la reperfusión ocurre precozmente [<15 min], de modo que la injuria celular en estas condiciones es reversible [102]. Por otra parte, si la isquemia se prolonga 20 minutos o más - independientemente de la restauración del flujo coronario - se produce daño celular irreversible, vale decir muerte celular [103-105].

Los animales en esta investigación fueron sometidos a un periodo de isquemia de 30 minutos sin reperfusión posterior, ligando quirúrgica y permanentemente la ADA, intervención que provocó un AR de consideración [$> 20\%$ del VI] [ver figura 29], que se midió mediante la técnica de doble tinción con AE y TTC ya descrita [77-79]. El tamaño del AR fue significativamente mayor en el grupo control en comparación al grupo diabético [31,3% versus 23,7%, $p<0,009$] [ver Figura 27], diferencia muy probablemente relacionada con el sitio de oclusión de la ADA, puesto que el AR representa el tejido hipoperfundido [isquémico] bajo la ligadura. En este sentido, la oclusión quirúrgica de la ADA en el grupo control, muy probablemente fue realizada en un sitio más proximal al origen del vaso en la aorta. No obstante lo

anterior, no se observó zonas de infarto macroscópicamente visibles en los cortes anatómicos analizados con la doble tinción, en ninguno de los animales estudiados. Sin embargo, en el examen histológico convencional se encontró en el grupo control y diabético, algunos animales con pequeños focos en los que se identificó un tejido miocárdico con estructura anormal, incluyéndose la fragmentación de algunas fibras musculares, hemorragia intersticial y edema [Figura 34], necrosis de coagulación [Figura 35], o fibras musculares necróticas con infiltración de células inflamatorias y edema [Figuras 36]. Estos hallazgos coinciden con los comunicados por otros investigadores, quienes luego de ligar la ADA en ratas, provocaron isquemia por 30 minutos sin reperfusión, proceso que generó importantes AR con algunas zonas de tejido infartado apenas detectable [95]. Estos autores, al añadir tiempos de reperfusión variables post isquemia, encontraron un aumento significativo del tamaño del infarto [96]. En otro estudio de IR, la prolongación del tiempo de isquemia de 30 minutos a 45 minutos y 60 minutos, manteniendo constante el tiempo de reperfusión post-isquemia en 120 minutos, también incrementó significativamente el tamaño del infarto de 18% a 40% y 69%, respectivamente [79]. Por lo tanto, el tamaño del infarto - estimado como la proporción del área de tejido infartado respecto del área de tejido en riesgo - depende de la duración de la isquemia, si el tiempo de reperfusión post isquémico se mantiene constante [79]. Estos resultados muestran que la isquemia aguda de treinta minutos, no fue suficiente para producir un IAM macroscópicamente identificable en el corazón de los animales del grupo control y diabético. Lo anterior, evidenciaría que el corazón diabético no es más vulnerable que el control frente a un periodo de isquemia aguda sin reperfusión posterior. Por otra parte, el AR observada en los animales estudiados, representaría principalmente tejido miocárdico en riesgo pero viable.

La muerte del cardiomiocito en el IAM, ocurre por tres mecanismos: autofagia, apoptosis y necrosis [28], siendo los dos últimos los más estudiadas a la fecha. Para algunos autores, la apoptosis es el mecanismo de muerte preponderante en el IAM en ratas, experimentalmente inducido por oclusión quirúrgica de una arteria coronaria, mientras que para otros el proceso apoptótico se iniciaría durante el periodo de isquemia, para ejecutarse durante la reperfusión [36,71]. En cuanto a la necro-

sis, el PPTM asociado a la muerte celular por este mecanismo, parece ser cebado durante la isquemia permaneciendo cerrado, para abrir inmediatamente se inicia la reperfusión, proceso no evaluado en el presente estudio [45, 46]. En esta investigación, el estudio histoquímico con marcación de caspasa-3 activa, para estudiar muerte celular por apoptosis, no mostró diferencias estadísticamente significativas en la abundancia de esta proteína entre el grupo control y diabético en los cortes medial del VI [corte C]: 10,1 cmp versus 9,1 cmp [NS] y apical [corte E]: 8,9 cmp versus 5,7 cmp [NS], respectivamente [ver Figura 31]. Por lo tanto, la respuesta del corazón diabético y del control a isquemia miocárdica de 30 minutos, es similar en ambos grupos. Esta observación, demostraría que el corazón diabético no es más vulnerable a la isquemia, como fue señalado previamente. Sin embargo, llama la atención que el marcaje con caspasa-3 activa en el animal control no expuesto, haya sido similar al de los grupos estudiados [corte C: 8,8 cmp y corte E: 8,3 cmp]. Una de las razones hipotéticas que se podría argüir para explicar esta observación, sería el excesivo aumento del nivel de catecolaminas en sangre producto del estado de estrés gatillado por la cirugía misma y por disfunción ventricular como consecuencia de la apertura del tórax, remoción del pericardio y pérdida de sangre, todos factores que pueden afectar la hemodinamia [106]. Lamentablemente, este parámetro no fue registrado en las cirugías realizadas en esta investigación. El aumento de las catecolaminas pueden tener un efecto tóxico directo sobre el cardiomiocito - a través de un mecanismo de agresión miocárdica hiperadrenérgica - que causaría elevación de la adenilciclase y los niveles de calcio, desencadenando la formación de EROs, que iniciarían la respuesta de genes de estrés e inducción de apoptosis y/o necrosis[107-109]. Respecto de la muerte celular por necrosis, el marcaje con ciclofilina-D como expresión de muerte celular por esta vía, tampoco fue diferente en el grupo diabético versus el control en el corte C: 5,1 cmp versus 8,4 cmp [NS] y corte E: 5,8 cmp versus 6,8 cmp [NS], respectivamente. En consecuencia, en el corazón diabético la abundancia de ciclofilina-D - proteína relacionada con muerte celular por necrosis - como respuesta a isquemia aguda de treinta minutos, es comparable a la del grupo control. Sin embargo, el marcaje inmunohistoquímico para ciclofilina-D en el animal control no expuesto fue negati-

vo en los cortes E y C, a diferencia de lo que ocurrió con el marcaje de caspasa-3 activa, lo que sugiere que el estímulo hiperadrenérgico no sería suficiente para activar la expresión de ciclofilina-D, pero sí para activar la caspasa-3.

La respuesta equivalente del corazón diabético y del control frente a la isquemia aguda, podría ser atribuido a la mayor resistencia que el corazón diabético tiene ante el insulto isquémico, como ha sido demostrado por otros investigadores, aunque el modelo que ellos utilizaron fue el de IR [68-70]. El mecanismo de cardioprotección, se manifiesta en el curso temprano de la DM [primeras cuatro semanas post inducción], pero se pierde después de las seis semanas [69,70]. En este estudio, los animales diabéticos fueron sometidos al protocolo de isquemia aguda dentro de las primeras dos semanas después de la inducción de la DM. La cardioprotección resultaría de la activación de mecanismos de supervivencia del cardiomiocito, como lo es el aumento en la expresión de AKT y óxido nítrico sintasa [70], la activación de ERK [69], o la disminución del flujo de glucosa hacia el cardiomiocito, fenómeno que atenúa la actividad del intercambiador de Na^+/K^+ y del intercambiador Na/Ca^{++} , reduciendo el flujo de ión Ca^{++} hacia el citoplasma, disminuyendo su concentración y secundariamente el proceso de necrosis [68]. Para confirmar la hipótesis planteada, se requiere de estudios adicionales que repliquen este protocolo de isquemia en animales con DM, cuyo tiempo de evolución haya superado las seis semanas desde la inducción experimental de la diabetes.

8. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló y estandarizó un modelo *in vivo* de isquemia miocárdica aguda en ratas.
2. La isquemia aguda de miocardio de treinta minutos de duración no provoca infarto macroscópicamente identificable en las ratas y los parámetros de muerte celular no son más elevados en ratas diabéticas con respecto a sus contrapartes normoglicémicas. Esto, evidencia que el corazón diabético no es más vulnerable a la isquemia aguda luego de 10 días de inducida la DM.

9 BIBLIOGRAFÍA

1. Rayner M, Allender S, Scarborough P. Cardiovascular disease in Europe. *Eur J Cardiovasc Prev Rehabil* 2009; 16 [Suppl 2]:S43-47
2. Lozano R, Naghavi M, Foreman K, et al. Global and regional mortality from 235 causes of death for 20 age groups in 1990 and 2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 2012; 380: 2095-2128
3. Roger VL, Go AS, Lloyd-Jones DM, et al. Heart disease and stroke statistics 2011 update: a report from the American Heart Association. *Circulation*. 2012; 125:188-197
4. <http://web.minsal.cl/portal/url/item/72213ed52c3323d1e04001011f01398.pdf>
5. Brown JR, Brown JR, Edwards FH, et al. The diabetic disadvantage: historical outcomes measures in diabetic patients undergoing cardiac surgery - the pre-intravenous insulin era. *Seminars in Thoracic and Cardiovascular Surgery* 2006; 18:281-288
6. Miketic JK, Miketic JK, Hravnak M, et al. Factors influencing the outcomes of patients with both coronary artery disease and diabetes enrolled in standard cardiac rehabilitation programs: a literature review. *The Journal of cardiovascular nursing*. 2011; 26:210-217
7. Fisher BM. Heart abnormalities in IDDM. *Diabetologia* 1997; 40 [Suppl 2]:S127-129
8. Flaherty JD, Flaherty JD, Davidson CJ, et al. Diabetes and coronary revascularization. *JAMA* 2005; 293:1501-1508
9. Katayama T, Nakashima H, Takaqi C, et al. Clinical outcomes and left ventricular function in diabetic patients with acute myocardial infarction treated by primary coronary angioplasty. *Int Heart J* 2005; 46:607-618
10. Herrick JB. Clinical features of sudden obstruction of the coronary arteries. *JAMA* 1912; 59:2015-2020

11. Arbustini E, Dal B, Morbini P, et al. Plaque erosion is a major substrate for coronary thrombosis in acute myocardial infarction. *Heart* 1999; 82:269-272
12. Libby P. Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 2001;104:365-372
13. Julian DG. Treatment of cardiac arrest in acute myocardial ischemia and infarction. *Lancet* 1961; 2(7207):840-844
14. Chazov EL, Mateeva LS, Mazaev AV, et al. Intracoronary administration of fibrinolytic in acute myocardial infarction. *Terapevticheskii Arkhiv* 1976; 48:8-19
15. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochinasi nell'Infarto Miocardico (GISI). Effectiveness of intravenous thrombolytic treatment in acute myocardial infarction. *Lancet* 1986; 1(8478):397-402
16. van Domburg RT, Sonnenschein K, Nieuwlaet R, et al. Sustained benefit 20 years after reperfusion therapy in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 2005; 46:15-20
17. Domburg RT, Hendriks JM, Kamp O, et al. Three life years gained after reperfusion therapy in acute myocardial infarction: 25-30 years after a randomized controlled trial. *Eur J Prev Cardiol* 2012; 19:1316-1323
18. Steg G, James SK, Atar D, et al. ESC Guidelines for the management of ST elevation acute myocardial infarction. *Eur Heart J* 2012; 33:2569-2619
19. Kristensen SD, Laut KG, Fajadet J, et al. Reperfusion therapy for ST elevation acute myocardial infarction 2010/2011: current status in 37 ESC countries. *Eur Heart J* 2014;35:1957-1970
20. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54:1496-1508
21. Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. Myocardial no-reflow in humans. *JACC* 2009; 54:281-292

22. Jaffe R, Charron T, Puley G, Dick A, Strauss BH. Microvascular Obstruction and the No-Reflow Phenomenon After Percutaneous Coronary Intervention. *Circulation* 2008; 117:3152-3156
23. Bekkers SC, Yazdani SK, Virmani R, Waltenberger J. Microvascular obstruction: underlying pathophysiology and clinical diagnosis. *J Am Coll Cardiol* 2010; 55:1649-1660
24. Vilar-Rojas C, Guzman-Grenfell AM, Hicks JJ. Participation of oxygen-free radicals in the oxido-reduction of proteins. *Arch Med Res* 1996; 27:1-6
25. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999; 138:S69-75
26. Miura T, Miki T. Limitation of myocardial infarct size in the clinical setting: current status and challenges in translating animal experiments into clinical therapy. *Basic Res Cardiol* 2008; 103:501-512
27. Yellon DM, Hausenloy DJ. Mechanisms of Disease. Myocardial Reperfusion Injury. *N Engl J Med* 2007; 357:1121-1135
28. Whelan RS, Kaplinskiy V, Kitsis RN. Cell Death in the Pathogenesis of Heart Disease: Mechanisms and Significance *Annu Rev Physiol* 2010; 72:19-44
29. Nishida K, Kyo S, Yamaguchi O, Sadoshima J, Otsu K. The role of autophagy in the heart. *Cell Death Differ* 2009;16:31-38
30. Mariño G, Niso-Santano M, Baehrecke EH, Kroemer G. Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:81-94
31. Takagi H, Matsui Y, Hirotani S, et al. AMPK mediates autophagy during myocardial ischemia in vivo. *Autophagy* 2007; 3:405-7.
32. Matsui Y, Takagi H, Qu X, et al. Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy. *Circ Res* 2007;100: 914-922

33. Scarabelli TM, Stephanou A, Pasini E, et al. Different signaling pathways induce apoptosis in endothelial cells and cardiac myocytes during ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 2002; 90:745-748
34. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:49-63
35. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996; 74:86-107
36. Freude B, Masters TN, Robicsek F, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000; 32:197-208
37. Schäfer C, Ladilov Y, Insete J, et al. Role of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in reoxygenation-induced cardiomyocyte injury. *Cardiovasc Res* 2001; 51:241-50
38. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* 2007; 87:99-163
39. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995; 307:93-98
40. Di Lisa F, Menabo R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD(+) and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem* 2001; 276:2571-2575
41. Vanden Berghe T, Linkermann A, Jouan-Lanhouet S, Walczak H, Vandenabeele P. Regulated necrosis: the expanding network of non-apoptotic cell death pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014; 15:135-147
42. Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from car-

diac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88:581-609

43. Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfielda KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366:79-94

44. Halestrap AP, Pasdois P. The role of the mitochondrial permeability transition pore in heart disease. *Biochim Biophys Acta* 2009; 1787: 1402-1415

45. Halestrap AP. A pore way to die: the role of mitochondria i reperusión injury and cardioprotection. *Biochem Soc Trans* 2010; 38:841-860

46. Miura T, Tanno M. The mPTP and its regulatory proteins: final common targets of signalling pathways for protection against necrosis. *Cardiovasc Res* 2012; 94:181-189

47. Leung AW, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 2008; 283:26312-26323

48. Basso E, Petronilli V, Forte MA, Bernardi P. Phosphate is essential for inhibition of the mitochondrial permeability transition pore by cyclosporin A and by cyclophilin D ablation. *J Biol Chem* 2008; 283:26307-26311

49. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434:658-662

50. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005; 434:652-658

51. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by Cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *Mol Cell Cardiol* 1993; 25:1461-1469

52. Skyschally A, Schulz R, Heusch G. Cyclosporine A at reperfusion reduces infarct size in pigs. *Cardiovasc Drugs Ther* 2010; 24:85-87

53. Piot C, Croisille P, Staat P, et al. Effect of cyclosporine on reperfusion injury in acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 2008; 359:473-481
54. The Diabetes Control and Complications Trial research group. The effect of intensive treatment of diabetes on the development and progression of long-term complications in insulin-dependent diabetes mellitus. *N Engl J Med* 1993; 329:977-986
55. UK Prospective Diabetes Study (UKPDS). Group Intensive blood-glucose control with sulphonylureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33) *Lancet* 1998; 352:837-853
56. Klein R, Klein BE, Moss SE, Davis MD, DeMets DL. Glycosylated hemoglobin predicts the incidence and progression of diabetic retinopathy. *JAMA* 1988; 260:2864-2871
57. Selvin E, Marinopoulos S, Berkenblit G, et al. Meta-analysis: glycosylated hemoglobin and cardiovascular disease in diabetes mellitus. *Ann Intern Med* 2004; 141: 421-431
58. Holman RR, Paul S K, Bethel MA, Matthews DR, Neil HA. 10-year follow-up of intensive glucose control in type 2 diabetes. *N Engl J Med* 2008; 359:1577-1589
59. The Diabetes Control and Complications Trial/Epidemiology of Diabetes Interventions and Complications (DCCT/EDIC) Study Research Group. Intensive diabetes treatment and cardiovascular disease in patients with type 1 diabetes. *N Engl J Med* 2005; 353: 2643-2653
60. Mak KH, Topol EJ. Emerging concepts in the management of acute myocardial infarction in patients with diabetes mellitus. *J Am Col Cardiol* 2000; 35:563-568
61. Capes SE, Hunt D, Malmberg K, et al. Stress hyperglycemia and increased risk of death after myocardial infarction in patients with and without diabetes: a systemic overview. *Lancet* 2000; 355:773-778

62. Song JX, Wang LH, Yao L, et al. Impaired transient receptor potential vanilloid 1 in streptozotocin-induced diabetic hearts. *Int J Cardiol* 2009; 134:290-292
63. Zahner MR, Li DP, Chen SR, Pan HL. Cardiac vanilloid receptor1-expressing afferent nerves and their role in the cardiogenic sympathetic reflex in rats. *J Physiol* 2003; 551:515-523
64. Ren JY, Song JX, Lu MY, Chen H. Cardioprotection by ischemic postconditioning is lost in isolated perfused heart from diabetic rats: Involvement of transient receptor potential vanilloid 1, calcitonin gene-related peptide and substance P. *Regul Pept* 2011; 169:49-57
65. Factor SM, Minase T, Sonnenblick EM. Clinical and morphologic features of human diabetic cardiomyopathy. *Am Heart J* 1980; 99:446-458
66. Grandi AM, Piantanida E, Franzetti I, et al. Effect of glycemic control on left ventricular diastolic function in type 1 diabetes mellitus. *Am J Cardiol* 2006; 97:71-76
67. Cai L, Wang G, Guo L, Jiang Y, Kang YJ. Hyperglycemia-Induced Apoptosis in Mouse Myocardium. Mitochondrial Cytochrome C-Mediated Caspase-3 Activation Pathway. *Diabetes* 2002; 51:1938-1948
68. Ravingerová T, Neckár J, Kolár F. Ischemic tolerance of rat hearts in acute and chronic phases of experimental diabetes. *Mol Cell Biochem* 2003; 249:167-174
69. Xu G. Contradictory effects of short- and long-term hyperglycemias on ischemic injury of myocardium via intracellular signaling pathway. *Exp Mol Pathol* 2004; 76:57-65
70. Ma G. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury by short-term diabetes: enhancement of VEGF formation, capillary density, and activation of cell survival signaling. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* 2006; 373:415-427

71. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996; 79:949-56
72. Reimer KA, Jennings RB, Hill ML. Total ischemia in dog hearts, in vitro 2. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation, and sarcolemmal integrity. *Circ Res* 1981;49:901-911
73. Eefting F, Rensing B, Wigman J, et al. Role of apoptosis in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:414-426
74. http://www.upstate.edu/dlar/pdf/rodent_isoflurane.pdf
75. Pacher P, Nagayama T, Mukhopadhyay P, Bátkai S, Kass DA. Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 2008; 3:1422-1434
76. Eckle T, Grenz A, Köhler D, et al. Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H2533-2340
77. Izumi T, Saito Y, Kishimoto I, et al. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF- κ B activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001; 108:203-213
78. Michael LH, Entman ML, Hartley CJ, et al. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269:H2147-54
79. Redel A, Jazbutyte V, Smul TM, et al. Impact of Ischemia and Reperfusion Times on Myocardial Infarct Size in Mice In Vivo. *Exp Biol Med* 2008; 233:84-93
80. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol* 1985; 121:522-530
81. Schwarz ER, Somoano Y, Hale SL, Kloner RA. What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyl tetrazolium chloride staining in the rat? *J Thromb Thrombolysis* 2000; 10:181-187

82. Suzuki M, Sasaki N, Miki T, et al. Role of sarcolemmal K(ATP) channels in cardioprotection against ischemia/reperfusion injury in mice. *J Clin Invest* 2002;109:509-516
83. Lowe JE, Reime RB, Jennings RB. Experimental infarct size as a function of the amount of myocardium at risk. *Am J Pathol* 1978; 90:363-379
84. Starnavski O, McMullen JR, Schinke M, et al. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16:349-360
85. Bohl S, Medway DJ, Schulz-Menger J, et al. Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2009; 297:H2054-H2058
86. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of the tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Archiv [Pathol Anat]* 1981; 393: 287-297
87. Szkudelski T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. *Physiol Res* 2001; 50:536-546
88. De Carvalho EN, de Carvalho NA, Ferreira LM. Experimental model of induction of diabetes mellitus in rats. *Acta Cir Bras* 2003; 18: 60-64
89. Cuellas-Ramón C, Pérez de Prado A, Pérez-Martínez C, et al. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. *Rev Esp Cardiol Supl* 2013;13[E]:57-63
90. Klocke R, Tian W, Kuhlmann MT, Nikol S. Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 2007;74:29-38
91. Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR. Experimental myocardial infarction in the rat: qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. *Am J Pathol* 1978; 90:57-70

92. Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, et al. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1979; 44:503-512
93. Johns TNP, Olson BJ. Experimental Myocardial Infarction: I. A Method of Coronary Occlusion in Small Animals *Ann Surg* 1954; 140:675-682
94. Tarnavski O, McMullen JR, Schinke M, et al. Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 2004; 16: 349-360
95. Hernando V, Insete J, Sartório CL, et al. Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:271-279
96. Foadoddini M, Esmailidehaj M, Mehrani H, et al. Pretreatment with hyperoxia reduces in vivo infarct size and cell death by apoptosis with an early and delayed phase of protection. *Eur J Cardiothorac Surg* 2011;39:233-240
97. Gao E, Lei YH, Shang X, et al. A novel and efficient model of coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res* 2010;107:1445-1453
98. Olivares G, Morán S, Palacios C, et al. Ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas. *Rev Chilena de Cirugía* 2012;64:15-18
99. Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat. Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation* 1995;92:253-61
100. Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Phase 2 ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction: a neglected target for therapeutic antiarrhythmic drug development and for safety pharmacology evaluation. *Br J Pharmacol* 2005; 145: 551-564
101. Ytrehus K. The ischemic heart-experimental Models. *Pharmacol Res* 2000; 42:193-203

102. Jennings RB, Reimer KA. Lethal Myocardial Ischemic Injury. *Am J Pathol*. Feb 1981; 102: 241-255
103. Jennings RB, Ganote CE. Structural Changes in Myocardium During Acute Ischemia. *Cir Res* 1974; 35 [Suppl 3]:156-172
104. Sommers HM, Jennings RB. Ventricular fibrillation and myocardial necrosis after transient ischemia. Effect of treatment with oxygen, procainamide, reserpine, and propranolol. *Arch Intern Med* 1972; 129:780-789
105. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Petronilli V. The role of mitochondria in the salvage and the injury of the ischemic myocardium. *Biochim Biophys Acta* 1998;1366:69-78
106. Nordbeck P, Bönhof L, Hiller KH, et al. Impact of Thoracic Surgery on Cardiac Morphology and Function in Small Animal Models of Heart Disease: A Cardiac MRI Study in Rats. *Plos One* 2013;8:e68275
107. Rona G. Catecholamine Cardiotoxicity. *J Mol Cell Cardiol* 1985;17:291-306
108. Communal C, Singh K, Pimentel DR, Colucci WS. Norepinephrine stimulates apoptosis in adult rat ventricular myocytes by activation of the beta-adrenergic pathway. *Circulation* 1998; 98:1329-1334
109. Lyon AR, Rees PSC, Prasad S, Poole-Wilson PA, Harding SE. Stress (Takotsubo) cardiomyopathy-a novel pathophysiological hypothesis to explain catecholamine-induced acute myocardial stunning. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* 2008; 5:22-29