

**UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
DEPARTAMENT DE FARMACOLOGIA**

**TESIS DOCTORAL 2014**

**DESARROLLO DE UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA. CARACTERIZACIÓN DE LA MUERTE CELULAR Y EFECTO DE LA OBESIDAD EN LA INFLAMACIÓN Y EL REMODELADO VENTRICULAR**

Memoria presentada por Marcos Poncelas Nozal para optar al grado de Doctor por la Universitat Autònoma de Barcelona.

Tesis doctoral realizada en el Laboratorio de Patología Cardiocirculatoria del Hospital Universitari Vall d'Hebron e Institut de Recerca bajo la dirección del Dr. David García Dorado y del Dr. Javier Inserte Igual.

Tesis adscrita al Departament de Farmacologia de la Universitat Autònoma de Barcelona, en el programa de doctorado en Farmacologia con la tutoría de la Dra. Elisabet Vila.

El doctorando,

Marcos Poncelas Nozal

Director de la tesis,

Dr. David García Dorado

Director de la tesis,

Dr. Javier Inserte

Barcelona, Mayo de 2014



# AGRADECIMIENTOS

Tras finalizar un trabajo lleno de dificultades y a veces desesperante como el desarrollo de una tesis doctoral es inevitable que te invada un muy humano egocentrismo que te lleva a concentrar la mayor parte del mérito en ti mismo. Sin embargo, el análisis objetivo te demuestra inmediatamente que la consecución de ese trabajo hubiese sido imposible sin la participación de personas e instituciones que han facilitado las cosas para que este proyecto termine de manera satisfactoria. Por ello, es para mí un verdadero placer y una obligación utilizar este espacio para ser justo y consecuente con ellas, expresándoles mis agradecimientos.

Comencemos por agradecer a mi director de tesis el Dr. David García-Dorado que, hace ya más de cinco años, me diera la oportunidad de desarrollar este trabajo experimental aun siendo yo un bioquímico de vocación. Él logró convencerme de que llegaría a tener “cierta mano” con la fisiología y la experimentación animal a pesar de que lo mío eran las moléculas, y de que en ciertos momentos del desarrollo de esta tesis llegara a soñar con un mundo dominado por los roedores. Evidentemente, también agradecerle la dirección que ha hecho de esta tesis de forma correcta e intachable.

Otro párrafo largo y unipersonal de estos agradecimientos es para Javier Inserte Igual, mi co-director de tesis. Agradecerle que, a pesar de que años atrás, un día cualquiera le “cayera del cielo” la co-dirección de este trabajo experimental, él siempre correspondiera y demostrara un interés tan grande como el mío propio (y no puedo escribir en estas líneas más que el mío propio porque sería políticamente incorrecto). Y al igual que David, ejercer una dirección impecable facilitándome en gran medida el trabajo. Una cosa más, gracias también por descubrirme las salidas en bicicleta de montaña, me enseñaron que los glúteos pueden llegar a romper cáscaras de nuez después de 180 Km pedaleando.

También no olvido mencionar a la Dra. Elisabet Vila, mi tutora de tesis, que se ha mostrado dispuesta a ayudarme en todos los momentos en los que he ido a visitarla. Gracias.

Siguiendo con los agradecimientos referentes a la consecución del trabajo que nos ocupa, quiero dar las gracias al Dr. Jordi Bañeras, una de las partes implicadas en los inicios de este proyecto, y compañero de ecos, glicemias y las tortuosas medidas de presión arterial llevadas a cabo durante el desarrollo experimental. Y a la Dra. Carmem Sartorio, también parte implicada en los inicios, experta cirujana de roedores y excelente maestra donde las haya. Gracias por todo.

Por último, en lo que se refiere a esta parte más institucional, quisiera dar las gracias al Dr. Daniel Sanchís y a María Carmona, pertenecientes al Laboratorio de Señalización Celular y Apoptosis del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida, puesto que gracias a la cesión de sus ratones, han facilitado el desarrollo de una de las partes en las que se divide esta tesis.

Evidentemente, los agradecimientos también van destinados a todos los compañeros del laboratorio que han trabajado conmigo día a día y que han convertido en un placer la experimentación. Gracias a los que están: Úrsula Vilardosa y Eli (ambas se merecen una mención especial pero el intentar demostrar igualdad no me lo permite), Ignasi (gran compañero de *Mitjas*), Ángeles Carmona, Úrsula Gimeno, Antonio, Giuliana, Víctor, Mireia Andrés, Mireia, Juanjo, Paula, Jose, Celia, Amanda, Ángeles Rojas, Neus, Pepe y Marisol; Gracias a los que ya no están: Jose Antonio, Nadia, Esperanza, Elena, María Ángeles García, Dorita y Eduardo (el "Frente Norte" Berciano), Emiliano, Marta, Sergio, Alejandra, Diego, Luis y a todos los que seguro que me he dejado por el camino, porque la memoria no es infalible, y en mi caso, bastante deficitaria.

Tampoco me olvido de dar las gracias a toda la gente que me cruzaba cada día en el Estabulario del VHIR junto con todo su personal, y en especial a Alex Rojo, ya que a él le corresponde también un pedazo de esta tesis. Y como no todo es ciencia, gracias Alex también por esas amenas tertulias en las que disertábamos sobre la esponjosidad del pan que recubre el chorizo en los bollos "preñaos".

Fuera del laboratorio, los agradecimientos deben dirigirse también a todas las personas que han hecho posibles los momentos de diversión, complicidad, desahogo, disertación (con cerveza la ciencia se debate intensamente) y comprensión. Doy gracias a Jordi, Laia, Marc y en definitiva, a todo el laboratorio de Hepatología, del que casi me siento integrante; también a Ana, Aine, Quim, Ari, AnneCé y a alguien más que dejo olvidado, por todos los momentos compartidos; y por último, y no menos importantes, a Isaac y Dani por ofrecerme amistad y hacer posible una de las mejores convivencias que he tenido en mi corta vida (digo corta porque mi intención es llegar a los cien años).

Para acabar, y a mi parecer, siendo esta parte la más importante de estos párrafos, a mi familia, y en especial, a mis tíos Maru y Benito, por ser como mis padres desde el momento en que llegué a Barcelona, y a mis padres, Rafael y María Ángeles. Gracias a mis padres por haberme dado la oportunidad de conseguir lo que soñaba, gracias por haberlo hecho a pesar del enorme sacrificio que ha supuesto para ellos y gracias por no desanimarme nunca ni recibir ninguna queja. Por todo esto, gracias.

Y termino aquí porque considero que ya me he extendido suficiente, y porque suele decirse sabiamente que, cuanto más se habla, o en este caso, cuanto más se escribe, más posibilidades hay de acabar pareciendo idiota.



# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS .....</b>	<b>11</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>13</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>19</b>
<b>1. CARDIOPATIA ISQUÉMICA Y DAÑO POR REPERFUSIÓN .....</b>	<b>21</b>
<b>2. MECANISMOS CELULARES DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN .....</b>	<b>23</b>
<b>3. MUERTE CELULAR DURANTE LA REPERFUSIÓN .....</b>	<b>26</b>
3.1. NECROSIS FRENTE A APOPTOSIS.....	26
3.2. APOPTOSIS DURANTE LA REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.....	27
3.3. LAS PROTEASAS CASPASAS .....	28
<b>4. REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO .....</b>	<b>31</b>
4.1. CITOQUINAS EN EL REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO.....	33
<b>5. INFLUENCIA DE LAS COMORBILIDADES EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....</b>	<b>36</b>
5.1. OBESIDAD .....	36
5.1.1. <i>Fisiopatología de la obesidad</i> .....	36
5.1.2. <i>Factores proinflamatorios y adipoquinas asociados a la obesidad</i> .....	39
5.1.2.1. Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).....	39
5.1.2.2. Interleucina 6 (IL-6) .....	40
5.1.2.3. Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1) .....	41
5.1.2.4. Leptina .....	41
5.1.2.5. Resistina .....	42
5.1.2.6. Adiponectina.....	43
5.1.3. <i>Obesidad y síndrome coronario agudo</i> .....	43
5.1.4. <i>Paradoja de la obesidad</i> .....	45
5.1.4.1. La paradoja de la obesidad en modelos animales .....	46
5.1.4.1.1. <i>Modelos genéticos de obesidad</i> .....	47
5.1.4.1.2. <i>Modelos de obesidad inducida por dieta</i> .....	48
5.1.4.1.3. <i>Modelo de ratón obeso BDF1</i> .....	49
5.1.5. <i>Posibles mecanismos implicados en la paradoja de la obesidad</i> .....	50
5.1.5.1. Las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1.....	50
5.1.5.2. Las adipoquinas leptina, resistina y adiponectina .....	51
5.1.5.3. La insulina .....	53
<b>6. MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN .....</b>	<b>55</b>
6.1. MODELO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA EN RATÓN.....	56
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....</b>	<b>59</b>
HIPÓTESIS.....	61
OBJETIVOS.....	62
<b>MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>63</b>
<b>1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO IN VIVO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.....</b>	<b>65</b>
1.1. ANIMALES.....	65
1.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL.....	65
1.3. ANESTESIA Y VENTILACIÓN .....	66
1.3.1. <i>Anestesia</i> .....	66

1.3.2. Intubación y ventilación .....	67
1.3.3. Gasometría .....	69
1.4. MONITORIZACIÓN DEL ANIMAL .....	69
1.5. CANULACIÓN DE VASOS SANGUÍNEOS .....	71
1.6. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO .....	72
1.7. CUIDADOS Y TRATAMIENTOS POSTQUIRÚRGICOS.....	76
1.8. CÁLCULO DEL EDEMA TISULAR .....	77
1.9. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO .....	77
1.10. DETERMINACIÓN DEL TAMAÑO DEL INFARTO.....	78
1.10.1. Procesado en el procedimiento experimental agudo .....	79
1.10.1.1. Determinación del Área en Riesgo (AR) y del Área de Infarto (AI)....	82
1.10.2. Procesado en el procedimiento experimental crónico.....	83
1.10.2.1. Preparación del tejido e histología.....	84
1.10.2.2. Determinación del Área en Riesgo (AR) y del Área de Infarto (AI)....	84
1.11. EUTANASIA .....	85
<b>2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN .....</b>	<b>86</b>
2.1. RATONES CASPASA3/7 <sup>CRENkx2.5/FL</sup> .....	86
2.2. PROTOCOLO EXPERIMENTAL .....	86
2.3. PROTOCOLO QUIRÚRGICO AGUDO .....	87
2.4. PROTOCOLO QUIRÚRGICO CRÓNICO .....	87
<b>3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN .....</b>	<b>88</b>
3.1. ANIMALES, DIETA Y SEGUIMIENTO EN EL TIEMPO.....	88
3.1.1. Animales .....	88
3.1.2. Dieta.....	89
3.1.3. Protocolo experimental y seguimiento en el tiempo.....	90
3.2. DETERMINACIÓN DE LA GLUCEMIA .....	91
3.3. DETERMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA INSULINA.....	92
3.4. DETERMINACIÓN DE COLESTEROL Y TRIGLICÉRIDOS .....	92
3.5. MEDIDA DE LA PRESIÓN ARTERIAL .....	94
3.6. CÁLCULO DE LA REACTIVIDAD ARTERIAL .....	95
3.6.1. Curvas acumulativas de concentración respuesta a los agonistas. ....	96
3.7. VARIACIONES RESPECTO AL PROTOCOLO QUIRÚRGICO Y TRATAMIENTO POSTQUIRÚRGICO ESTABLECIDO.....	96
3.8. DETERMINACIÓN DE IL-6, MCP-1, TNF-A, INSULINA, LEPTINA Y RESISTINA .....	97
3.9. DETERMINACIÓN DE ADIPONECTINA .....	98
3.10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	99
<b>RESULTADOS .....</b>	<b>101</b>
<b>1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO IN VIVO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.....</b>	<b>103</b>
1.1. ESTUDIO DE LA MORTALIDAD.....	103
1.2. ANESTESIA Y VENTILACIÓN .....	105
1.3. PROCEDIMIENTO QUIRÚRGICO Y OCLUSIÓN TRANSITORIA DE LA ARTERIA CORONARIA DESCENDENTE ANTERIOR (ADA) .....	107
1.4. COMPLICACIONES; EDEMA PULMONAR .....	109
1.5. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO .....	110
1.6. PROCESADO DE LOS CORAZONES .....	111
1.7. CUANTIFICACIÓN DEL ÁREA DE INFARTO Y DEL ÁREA EN RIESGO MIOCÁRDICOS Y EVOLUCIÓN DURANTE LA REPERFUSIÓN.....	112



<b>2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN .....</b>	<b>115</b>
2.1. ESTUDIO DE LA MORTALIDAD.....	115
2.2. PESO CORPORAL Y PESO DEL CORAZÓN .....	115
2.3. ANÁLISIS ECOCARDIOGRÁFICO .....	116
2.4. TAMAÑO DEL INFARTO EN RATONES CASP3/7.....	117
<b>3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....</b>	<b>121</b>
3.1. ESTUDIO DE LA MORTALIDAD.....	121
3.2. EFECTOS DE LA DIETA ALTA EN GRASAS EN RATONES BDF1 .....	122
3.3. PRESIÓN ARTERIAL EN RATONES OBESOS .....	124
3.4. ALTERACIONES EN LA VASOCONSTRICCIÓN AÓRTICA EN RATONES OBESOS.....	124
3.5. ESTUDIO ECOCARDIOGRÁFICO EN RATONES OBESOS.....	125
3.6. DETERMINACIÓN DEL ÁREA DE INFARTO EN RATONES OBESOS .....	130
3.7. DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS, ADIPOQUINAS E INSULINA EN RATONES OBESOS .....	131
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>135</b>
<b>1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO <i>IN VIVO</i> DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA.....</b>	<b>137</b>
1.1. ISOFLUORANO COMO ANESTÉSICO DE ELECCIÓN .....	138
1.2. FUNCIÓN VENTRICULAR EN RATONES TRAS UN INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO....	139
1.3. EL ÁREA DE INFARTO EN EL MODELO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA EN RATÓN .....	139
<b>2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN .....</b>	<b>142</b>
2.1. LA VÍA DE ACTIVACIÓN CLÁSICA DE LA APOPTOSIS NO INTERVIENE DE FORMA SIGNIFICATIVA EN LA MUERTE CELULAR TRAS UN EPISODIO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA .....	142
<b>3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN.....</b>	<b>145</b>
3.1. EL RATÓN BDF1 DESARROLLA UNA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA ALTA EN GRASAS EN AUSENCIA DE COMORBILIDADES ASOCIADAS .....	145
3.2. LA OBESIDAD INDUCIDA POR DIETA ALTA EN GRASAS DISMINUYE EL TAMAÑO DEL INFARTO: SE CUMPLE LA PARADOJA DE LA OBESIDAD.....	148
3.3. POSIBLES MECANISMOS CARDIOPROTECTORES EN LA OBESIDAD.....	150
<b>RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>155</b>
RESUMEN DE RESULTADOS .....	157
CONCLUSIONES .....	159
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>162</b>
<b>APÉNDICE .....</b>	<b>189</b>



## ABREVIATURAS

<b>ACh</b>	Acetilcolina
<b>ADA</b>	Arteria coronaria descendente anterior izquierda
<b>AI</b>	Area de infarto
<b>ATP</b>	Adenosín 5'-trifosfato
<b>AR</b>	Área en riesgo
<b>Casp3/7</b>	Ratón con doble deleción cardioespecífica para las caspasas efectoras 3 y 7
<b>CEEA</b>	Comité ético de experimentación animal
<b>CHO<sub>total</sub></b>	Colesterol total
<b>DM-2</b>	Diabetes mellitus tipo 2
<b>DVI<sub>d</sub></b>	Diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo
<b>DVI<sub>s</sub></b>	Diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo
<b>ECG</b>	Electrocardiograma
<b>ESV</b>	Volumen al final de la sístole
<b>FA</b>	Fracción de acortamiento
<b>FC</b>	Frecuencia cardíaca
<b>FE</b>	Fracción de eyección
<b>FELASA</b>	Federation of European Laboratory Animal Science Associations
<b>FiO<sub>2</sub></b>	Concentración de oxígeno en el aire inspirado
<b>FR</b>	Frecuencia respiratoria
<b>HDL</b>	Colesterol HDL
<b>HE</b>	Hematoxilina-eosina
<b>HFD</b>	Dieta alta en grasa
<b>HOMA</b>	Homeostasis model assessment
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IMC</b>	Índice de masa corporal
<b>IP</b>	Intraperitoneal
<b>IR</b>	Isquemia y reperfusión
<b>MAP</b>	Presión arterial media
<b>MCP-1</b>	Proteína quimioatrayente de monocitos 1

<b>MEC</b>	Matriz extracelular
<b>MMPs</b>	Metaloproteinasas de la matriz extracelular
<b>mPTP</b>	Poros de transición mitocondrial
<b>MSC</b>	Muerte súbita cardíaca
<b>NaNP</b>	Nitroprusiato sódico
<b>NCX</b>	Intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$
<b>NE</b>	Norepinefrina
<b>Pa</b>	Presión arterial
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PCR</b>	Proteína C reactiva
<b>Pd</b>	Presión diastólica
<b>PE</b>	Estreptavidina-ficoeritrina
<b>PEEP</b>	Presión positiva al final de la espiración
<b>PPVId</b>	Diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole
<b>Ps</b>	Presión sistólica
<b>PSR</b>	Picrosirius red
<b>RAAS</b>	Sistema renina-angiotensina-aldosterona
<b>RISK</b>	Reperfusion injury salvation kinase
<b>RLO</b>	Radicales libres de oxígeno
<b>RVA</b>	Remodelado ventricular adverso
<b>SC</b>	Subcutáneo
<b>SCA</b>	Síndrome coronario agudo
<b>SVId</b>	Diámetro del septum intraventricular diastólico
<b>TAG</b>	Triacilglicérolos o triglicéridos
<b>TIMPs</b>	Inhibidores tisulares de las metaloproteinasas
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>TTC</b>	Cloruro de trifeniltetrazolio
<b>TUNEL</b>	Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling
<b>VHIR</b>	Institut de Recerca Vall d'Hebron
<b>VI</b>	Ventrículo izquierdo
<b>VMC</b>	Ventilación mecánica controlada
<b>Vt</b>	Volumen tidal
<b>WT</b>	Wild type

# **RESUMEN**



La muerte de células miocárdicas secundaria a una oclusión coronaria aguda es la responsable directa de la mayoría de los eventos clínicos que padecen los pacientes que ingresan en el hospital con un infarto agudo de miocardio (IAM). Una vez que se produce una oclusión coronaria, la rápida reinstauración del flujo coronario o reperfusión es una condición indispensable para que no se produzca la muerte de los cardiomiocitos isquémicos. Sin embargo, las estrategias de revascularización de emergencia tienen una limitada eficacia como consecuencia de la muerte adicional causada por mecanismos desencadenados durante la reperfusión sobre los cardiomiocitos que sobreviven a la isquemia previa. Este fenómeno se conoce como daño letal por reperfusión y se produce principalmente durante los primeros minutos de la reperfusión en forma de muerte celular por necrosis. El daño miocárdico producido en la fase aguda del IAM puede provocar cambios progresivos en el miocardio no infartado que llevan a la dilatación ventricular propia de la insuficiencia cardíaca, incluso llegando a ocasionar la muerte, y que se conocen como remodelado ventricular adverso (RVA). La traslación del conocimiento sobre el daño letal por reperfusión a la práctica clínica está resultando lenta. Diversos factores podrían hacer que los resultados obtenidos de forma experimental puedan no ser aplicados a pacientes con IAM.

En primer lugar, junto a la muerte celular inmediata, se ha sugerido la existencia de una muerte tardía de los cardiomiocitos desencadenada por una respuesta inflamatoria al daño miocárdico en conjunción con la activación de mecanismos apoptóticos. Esta muerte tardía contribuiría junto con otra serie de respuestas adaptativas al patrón de RVA. Sin embargo, estudios recientes cuestionan la contribución de la apoptosis en la muerte de los cardiomiocitos y en la extensión final del tamaño del infarto.

En segundo lugar, factores como la hipertensión, la diabetes mellitus tipo 2 (DM-2) o la obesidad aparecen en muchos pacientes con IAM y pueden modificar la tolerancia al daño letal por reperfusión y el RVA. Si bien la obesidad es un factor de riesgo principal asociado a la cardiopatía isquémica con una prevalencia en continuo aumento, diferentes estudios sugieren que los individuos con sobrepeso y los obesos presentan una mejor evolución de la enfermedad coronaria establecida. Este fenómeno controvertido y poco caracterizado se conoce como paradoja de la obesidad.

El trabajo experimental de esta tesis aborda algunos de estos factores que limitan la traslación del concepto de daño letal por reperfusión a la práctica clínica y para ello, desarrolla un modelo de isquemia y reperfusión (IR) miocárdica *in vivo* en ratón.

En primer lugar, mediante la oclusión aguda transitoria de la arteria coronaria izquierda, este modelo nos ha permitido reproducir la patología cardíaca con características funcionales y estructurales similares a las presentadas por los pacientes con infarto agudo de miocardio (IAM).

En segundo lugar, se ha investigado el papel de la apoptosis en el daño letal por reperfusión mediante el estudio de los efectos de nuestro modelo de oclusión coronaria transitoria en un ratón con doble delección cardioespecífica de los genes para las caspasas 3 y 7, proteasas clave en el mecanismo apoptótico. Los resultados obtenidos nos han permitido concluir que la apoptosis no contribuye a la muerte celular de los cardiomiocitos, ni durante las primeras fases de la reperfusión, ni más tardíamente en el proceso de RVA, siendo esta muerte principalmente por necrosis y durante las primeras horas de reperfusión.

En tercer lugar se ha analizado el efecto de la obesidad en la tolerancia del miocardio al daño por IR. Para ello, se ha desarrollado y caracterizado un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasas en ratones BDF1, y se ha determinado el efecto de la obesidad en la mortalidad y el RVA tras un episodio de oclusión coronaria transitoria. Este estudio ha permitido obtener un modelo de ratón con obesidad inducida por dieta alta en grasas en ausencia de hipertensión arterial y otras comorbilidades asociadas que presenta una mayor tolerancia al daño por IR y apoya la existencia del fenómeno conocido como paradoja de la obesidad, según el cual, los efectos de una oclusión coronaria transitoria pueden ser menos nocivos en pacientes obesos. Finalmente, nuestros resultados sugieren que el efecto paradójico de la obesidad podría estar asociado a la cardioprotección generada por la sobreproducción de determinadas citoquinas, adipoquinas e insulina.

En conclusión, el presente trabajo demuestra mediante la utilización de un modelo de oclusión coronaria transitoria en el ratón con supervivencia prolongada, que la apoptosis desempeña un papel irrelevante en el daño por IR, mientras que las comorbilidades asociadas a la cardiopatía isquémica, y en



concreto la obesidad, tienen un efecto de gran relevancia en la tolerancia del miocardio al daño por IR.



# **INTRODUCCIÓN**



# **1. CARDIOPATIA ISQUÉMICA Y DAÑO POR REPERFUSIÓN**

La cardiopatía isquémica constituye la principal causa de muerte e incapacidad a nivel global y su prevalencia aumenta continuamente en el conjunto de la población mundial (Forouzanfar et al., 2012). El impacto social de la cardiopatía isquémica es enorme, no sólo por la mortalidad que causa, si no también por la morbilidad, la pérdida de la calidad de vida que provoca y el elevado coste económico de todo ello. El mecanismo fisiopatológico que provoca la muerte de los cardiomiocitos, es el responsable directo de la mayoría de las complicaciones que causan la muerte de los pacientes que ingresan en el hospital con un síndrome coronario agudo (Thompson et al., 1979).

La extensión de la muerte celular (área del infarto, AI) depende principalmente del tamaño del territorio distal a la placa coronaria responsable (área en riesgo, AR), de la presencia y magnitud del flujo residual (en forma de oclusión parcial, irrigación colateral o ambas) y de la duración de la isquemia (Garcia-Dorado et al., 1987). Por tanto, el principal objetivo terapéutico frente a una oclusión coronaria es la rápida restauración del flujo coronario o reperfusión. Cuando la reperfusión tiene lugar muy precozmente (antes de que hayan transcurrido aproximadamente 30 minutos de isquemia severa), se previene la muerte celular. Si se produce más tardíamente, el efecto final es que se salvará una parte del miocardio, tanto menor cuanto más tardíamente comience el período de reperfusión. En la práctica clínica la reperfusión se produce casi siempre demasiado tarde para prevenir completamente la muerte celular, pero dentro de un intervalo en el que sí es efectiva en disminuir el porcentaje de células que sin la restauración del flujo sanguíneo morirían irremediablemente (Garcia-Dorado et al., 2004).

Está sólidamente demostrado que cuando la reperfusión se realiza durante este intervalo, en el que se salva parte del miocardio isquémico, se produce una muerte celular adicional durante los primeros minutos después de la restauración del flujo sanguíneo, en forma de necrosis, por mecanismos desencadenados por la reperfusión y no por la isquemia previa, y que puede

prevenirse mediante intervenciones aplicadas en el momento de la reperfusión. Este fenómeno se conoce como daño letal por reperfusión y es de gran importancia porque ofrece la posibilidad de añadir en el momento de la restauración del flujo tratamientos farmacológicos que aumenten la eficacia de la reperfusión (Piper et al., 1998).

## 2. MECANISMOS CELULARES DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN

El daño letal por reperfusión, definido como la muerte celular que se desencadena de forma secundaria a un proceso de isquemia transitorio y prevenible mediante la aplicación de estrategias en el momento de la reperfusión, es un elemento imprescindible en la fisiopatología de la IR miocárdica (Inserte et al., 2002; Garcia-Dorado et al., 2009). Los mecanismos moleculares y celulares por los que se rige no están claramente definidos. Se ha propuesto que las alteraciones en la homeostasis del calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) celular y la formación de radicales libres del oxígeno (RLO) juegan un papel central como parte de estos mecanismos.

Durante los primeros minutos del periodo isquémico, la falta de oxígeno paraliza la síntesis de adenosín 5'-trifosfato (ATP) provocando un déficit de energía. El metabolismo anaerobio mantiene una síntesis residual de ATP, pero a costa de la sobreproducción de protones ( $\text{H}^+$ ), lo que deriva en una rápida acidosis (Inserte et al., 2002; Inserte et al., 2008). En el inicio de la reperfusión se produce una sobrecarga intracelular de  $\text{Na}^+$  como consecuencia de su aumento durante la isquemia a causa de la activación de los transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  asociada a la normalización del pH intracelular, y por la entrada de  $\text{Na}^+$  procedente de cardiomiocitos adyacentes mediante uniones de tipo gap (Ruiz-Meana et al., 1999; Garcia-Dorado et al., 2004; Inserte et al., 2009). Junto a esta entrada masiva, la salida de  $\text{Na}^+$  se encuentra reducida a causa de la alteración en la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa desencadenada por la activación de las proteasas calpaínas (Inserte et al., 2005). La sobrecarga de  $\text{Na}^+$  intracelular provoca una pérdida del gradiente transarcolema de  $\text{Na}^+$  favoreciendo que el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCX) actúe en modo reverso y se produzca una entrada neta de  $\text{Ca}^{2+}$  al citosol causando un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico. En los cardiomiocitos que reactivan la producción de energía mitocondrial, la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico varía de forma oscilatoria entre el citosol y el retículo sarcoplásmico dando como resultado repeticiones rápidas de picos de concentración citosólica de  $\text{Ca}^{2+}$ . Estas oscilaciones en la concentración de

$\text{Ca}^{2+}$  desencadenan la activación descontrolada de la maquinaria contráctil provocando una hipercontracción irreversible de los cardiomiocitos. El estrés mecánico que padecen los cardiomiocitos como consecuencia del acortamiento celular extremo provoca la rotura de la membrana sarcolemal y la muerte celular. Análisis histológicos han demostrado que los infartos reperfundidos están constituidos por áreas de necrosis en bandas de contracción formadas por cardiomiocitos que han sufrido esta hipercontracción (Barrabes et al., 1996). El patrón histológico de necrosis en bandas de contracción también puede deberse a la contracción asociada con el rigor independiente del  $\text{Ca}^{2+}$ . Este mecanismo de contracción tiene lugar en aquellas situaciones en las que se produce una lenta recuperación de la producción de energía durante la reperfusión (Ladilov et al., 2003).

La reperfusión miocárdica también provoca un fuerte aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial que es incompatible con una producción eficiente de ATP. Este fenómeno se ha explicado como consecuencia de la apertura de un megacanal denominado poro de transición mitocondrial (mPTP) cuya estructura se desconoce todavía. La permeabilidad de la membrana mitocondrial se produciría a causa de la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , la síntesis de RLO y la normalización del pH intracelular (Halestrap et al., 2004; Baines et al., 2005). Los RLO favorecen directamente la apertura del mPTP y agravan las alteraciones de la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  oxidando proteínas implicadas en su regulación como la CaMKII, o la tetrahidrobiopterina, lo que resulta en una menor producción de NO e inhibición de la vía de señalización del GMPc/PKG (Halestrap et al., 2004; Erickson et al., 2011). Esta reducción en la actividad de la PKG acelera la normalización del pH inhibiendo la NHE y favoreciendo las oscilaciones del  $\text{Ca}^{2+}$  (Inserte et al., 2011)

El aumento de la permeabilidad de la membrana mitocondrial y la hipercontractura secundaria a la sobrecarga y a las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  están interrelacionadas. Por un lado, las oscilaciones de  $\text{Ca}^{2+}$  favorecen la apertura del mPTP y por otro, la permeabilización mitocondrial promueve la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  hacia el citosol, favoreciendo ambos procesos el desarrollo de más oscilaciones e hipercontractura (Ruiz-Meana et al., 2007; Abdallah et al., 2011). La hipercontractura parece desempeñar un papel más importante en la génesis de la muerte celular después de episodios de isquemia relativamente breves,



mientras que el mPTP es el principal mecanismo de la muerte celular por reperfusión después de una isquemia prolongada (Ruiz-Meana et al., 2011).

Junto con la hipercontractura, el edema celular que se produce durante la reperfusión es otro de los factores que contribuyen al estrés mecánico causante de la rotura sarcolemal. Este edema es el resultado del rápido lavado de moléculas osmóticamente activas acumuladas en el espacio intersticial durante la isquemia como consecuencia del metabolismo anaerobio (Piper et al., 1998).

Finalmente, la tolerancia de la membrana sarcolemal a la tensión mecánica causada por la hipercontractura y el edema celular está reducida de forma crítica por el aumento de la fragilidad del citoesqueleto. Esta mayor fragilidad está causada por la hidrólisis de proteínas estructurales llevada a cabo principalmente por las proteasas dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$  denominadas calpaínas (Inserte et al., 2004).

### **3. MUERTE CELULAR DURANTE LA REPERFUSIÓN**

Como consecuencia del daño por reperfusión, los miocitos mueren principalmente por necrosis durante los primeros minutos de la reinstauración del flujo sanguíneo mediante los mecanismos explicados con anterioridad. En 1994 se describe por primera vez la muerte por apoptosis en el miocardio sometido a IR (Gottlieb et al., 1994). Posteriormente, numerosos estudios han sugerido que la apoptosis contribuye, en mayor o menor medida, a la muerte de los cardiomiocitos en el miocardio reperfundido. Se ha propuesto que la muerte por apoptosis puede ser un importante componente etiológico de la insuficiencia cardíaca, en particular en la transición del remodelado ventricular compensatorio a la insuficiencia cardíaca (Garg et al., 2005). Sin embargo, estudios más recientes ponen en entredicho la capacidad de los cardiomiocitos para activar la maquinaria apoptótica (Sanchis et al., 2008).

#### **3.1. Necrosis frente a apoptosis**

La necrosis se define como la muerte celular causada por una alteración grave en la homeostasis celular. Este proceso se caracteriza por una rotura de la membrana plasmática y de la membrana de las organelas intracelulares, incluyendo la mitocondria, que provoca la liberación del contenido extracelular, la fragmentación del ADN sin un patrón definido, y una respuesta inflamatoria. Este tipo de muerte celular está caracterizado por el caos y el desorden, y no sigue un patrón definido de procesos de deterioro celular (Amenta and Baccino, 1989).

De forma contraria, la apoptosis o muerte celular programada desarrolla un patrón típico de eventos morfológicos que sigue un orden establecido y que se caracteriza por la degradación internucleosomal del ADN (Condorelli et al., 2001). En la fase inicial de la apoptosis se produce una condensación de la cromatina, posterior fragmentación y formación de cuerpos apoptóticos (material celular resultante de la fragmentación rodeado de membrana plasmática), desanclaje del resto del tejido y una rápida fagocitosis por células vecinas como macrófagos o células del parénquima, todo ello en ausencia de inflamación. A diferencia de la necrosis que es un proceso caótico, la apoptosis

es un proceso ordenado que consume energía en forma de ATP. La ejecución del proceso apoptótico refleja vías moleculares características que activan mecanismos de degradación proteolítica en los que intervienen de manera crucial proteasas como las caspasas (Saraste and Pulkki, 2000).

A pesar de las diferencias observadas entre la necrosis y la apoptosis, existe un cierto grado de solapamiento durante las primeras fases de ambos procesos. La liberación del citocromo c mitocondrial se considera un nexo de unión entre los dos mecanismos. Entre otras cosas, su liberación al citosol desencadena la activación de la cascada de las proteasas caspasas y reduce la síntesis de ATP (Palmer et al., 2000). Se ha observado que las calpaínas, proteasas implicadas principalmente en la muerte por necrosis, tienen también como sustrato a las caspasas que pasarían a ser activas mediante su acción (Nakagawa and Yuan, 2000). De la misma manera, proteínas que contribuyen a la integridad de la membrana como la fodrina y que son degradadas por las calpaínas, también son sustrato de determinadas caspasas (Han et al., 2013).

### **3.2. Apoptosis durante la reperusión miocárdica**

Desde que en 1994 se describiera por primera vez la muerte por apoptosis en el miocardio sometido a isquemia y reperusión, diversos estudios realizados con muestras obtenidas de pacientes que han sufrido un IAM, han sugerido que la apoptosis podría contribuir de forma significativa a la muerte celular durante la reperusión e intervenir en el RVA (Gottlieb et al., 1994; Olivetti et al., 1996). La presencia de muerte por apoptosis en el miocardio reperfundido se ha demostrado a nivel experimental mediante el uso de animales modificados genéticamente en proteínas que intervienen en las vías apoptóticas, inhibidores de proteínas que actúan durante la apoptosis, y técnicas de detección de la muerte celular como los ensayos tipo TUNEL (*terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling*) (Brocheriou et al., 2000; Lee et al., 2003; Stangherlin et al., 2011). Tomando como ejemplo proteínas como las caspasas que intervienen en la cascada apoptótica de forma directa, algunos trabajos en los que se han utilizado animales con sobreexpresión de la caspasa 3 han descrito un aumento del tamaño del infarto, mientras que en otros estudios, el uso de inhibidores inespecíficos de

estas proteínas ha reducido el tamaño del infarto, sugiriendo estos datos un papel relevante de la apoptosis en la muerte celular tras la IR (Yaoita et al., 1998; Holly et al., 1999; Yaoita et al., 2000; Condorelli et al., 2001).

Sin embargo, en contra de la importancia de la apoptosis en el daño por reperfusión, numerosos estudios demuestran mediante el uso de estrategias dirigidas a prevenir el estrés mecánico que sufren los cardiomiocitos durante el inicio de la reperfusión, que la muerte celular tras la IR se produce mayoritariamente por necrosis (Inserte et al., 2002; Garcia-Dorado et al., 2004; Baines et al., 2005; Nakagawa et al., 2005; Garcia-Dorado et al., 2009).

Actualmente existe gran controversia a la hora de definir cual es la contribución relativa de la apoptosis y la necrosis a la muerte celular durante la reperfusión. Diversos factores como el uso de inhibidores inespecíficos que pueden actuar sobre otras proteasas diferentes a las caspasas, el desconocimiento de algunos de los mecanismos que intervienen en la transición a las diferentes fases de la apoptosis tras la fragmentación del DNA, el solapamiento con procesos necróticos, la inespecificidad de las técnicas de detección de apoptosis tipo TUNEL que pueden dar positivo para necrosis, o el uso de animales modificados genéticamente sin especificidad por el tipo celular, no hacen más que aumentar las discrepancias en torno al papel de la apoptosis en la muerte celular tras la IR (Rodriguez et al., 2002). Además, aunque la apoptosis es un mecanismo esencial en los procesos de diferenciación celular, su relevancia en células diferenciadas terminalmente, como en el caso de los cardiomiocitos, no está aclarada. De hecho, recientemente se ha propuesto que la vía de la proteasa caspasa 3 no es operativa en cardiomiocitos adultos sugiriendo que la apoptosis no contribuiría a la muerte de los cardiomiocitos durante la reperfusión (Sanchis et al., 2008).

### **3.3. Las proteasas caspasas**

Las caspasas son una familia de proteasas implicadas en el inicio, el desarrollo y la ejecución de la apoptosis. Su forma fisiológica es la de precursores procaspasas y son activadas por lisis proteica integrándose en cascadas de señalización. Caspasas como la 8 y la 9 son responsables de transmitir el estímulo apoptótico a caspasas efectoras, como la 3 y la 7, que

mediante su actividad proteolítica degradan proteínas estructurales críticas para la célula.

La apoptosis puede ser activada mediante dos vías de señalización clásicas en las que intervienen las caspasas: la vía de señalización extrínseca o mediada por receptores de muerte celular, y la vía de señalización intrínseca o mitocondrial (Das, 2007).

La vía de señalización extrínseca es activada por ligandos de muerte celular como el TNF- $\alpha$  o el ligando Fas. Seguidamente se activa la caspasa 8 en la superficie celular y desencadena la cascada de señalización apoptótica provocando la activación secuencial de las caspasas efectoras 3 y 7 (Orogo and Gustafsson, 2013). Varios estudios han demostrado que los ligandos de los receptores de muerte y su posterior activación están implicados en el desarrollo de la insuficiencia cardíaca. Por ejemplo, el TNF- $\alpha$ , además de ser sintetizado y liberado por los cardiomiocitos puede ser secretado por los macrófagos en respuesta a la isquemia miocárdica (Dorge et al., 2002; Gilles et al., 2003; Sanchis et al., 2008).

La mitocondria juega un papel esencial en la vía de señalización intrínseca de la apoptosis, la cual es iniciada por diversas señales apoptóticas, incluyendo pérdida de factores de crecimiento, hipoxia derivada de isquemia, estrés oxidativo o daño en el ADN. Estos factores desencadenan la apertura del mPTP que provoca la liberación al citosol de factores proapoptóticos como el citocromo c y la activación mediante estos de la caspasa 9 (Li et al., 1997). La caspasa 9 seguidamente activa las caspasas efectoras 3 y 7. Esta vía está regulada por miembros de la familia de proteínas Bcl-2.

Aunque las vías extrínseca e intrínseca responden a distintas señales y tienen diferentes caspasas iniciadoras, ambas vías convergen en las caspasas efectoras 3 y 7. La caspasa 3 actúa como un efector terminal de la apoptosis mediante la degradación de varias proteínas y la amplificación de la señal de muerte desde la membrana plasmática a través de la activación de otras caspasas (Degterev et al., 2003). Junto con la caspasa 3, la caspasa 7 proteoliza proteínas estructurales vitales, enzimas e importantes moléculas de señalización (Porter and Janicke, 1999; Lamkanfi and Kanneganti, 2010). Se ha propuesto que la degradación de proteínas miofibrilares por acción de las caspasas, podría conducir a la disfunción contráctil antes que a la muerte

celular y contribuir a la insuficiencia cardíaca después de un IAM (Communal et al., 2002).

Mediante la utilización de inhibidores de las caspasas, se ha visto que la muerte celular apoptótica dependiente de estas proteasas se produce en regiones cardíacas sometidas a importantes cambios morfológicos durante el desarrollo embrionario del corazón (Ya et al., 1998; Schaefer et al., 2004). Por lo tanto, la activación de las caspasas probablemente asegura la formación adecuada de las cavidades cardíacas y la conexión correcta de las arterias a los ventrículos durante el desarrollo. Se ha propuesto que los genes que controlan la expresión de las caspasas reducirían progresivamente su expresión, quedando completamente silenciados al finalizar la diferenciación de los cardiomiocitos (Madden et al., 2007; Sanchis et al., 2008).

Sin embargo, el uso de ratones modificados genéticamente para caspasas o proteínas implicadas en las vías de señalización apoptótica se ha limitado a la utilización de animales transgénicos que poseen la alteración del gen a nivel global (Varfolomeev et al., 1998; Chen et al., 2001), y además, la falta de animales transgénicos cardioespecíficos para caspasas no permite conocer con exactitud el papel que juegan en la mortalidad celular tras una situación de estrés, como es el caso de un IAM.

## **4. REMODELADO VENTRICULAR ADVERSO**

A pesar del aumento en la supervivencia de aquellos pacientes que sufren un IAM gracias a las terapias de reperfusión, como consecuencia de la muerte miocárdica se desencadenan una serie de respuestas adaptativas al cambio hemodinámico que supone el intento de mantener la función cardíaca con menos miocardio viable, dando lugar a un patrón de remodelado que engloba tanto tejido infartado como no infartado. Este remodelado no fisiológico denominado remodelado ventricular adverso (RVA) es un proceso activo que continúa durante semanas, o incluso meses tras el episodio isquémico. El RVA es el resultado de la activación de una cascada de vías de señalización intracelulares que inician y modulan una serie de cambios caracterizados por una progresiva dilatación del ventrículo izquierdo (VI) con estrechamiento de la pared ventricular y el reemplazo de cardiomiocitos por tejido fibroso. El remodelado que sufre el miocardio acaba causando un progresivo deterioro en la función ventricular aumentando la mortalidad a largo plazo en aquellos pacientes que sobreviven a la fase aguda del IAM.

El proceso de RVA tras el IAM implica una respuesta inflamatoria aguda dirigida en gran parte por la expresión coordinada de múltiples factores, entre los que se encuentran las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), los inhibidores de las MMPs (TIMPs), los RLO, la angiotensina II producida de forma local, las citoquinas proinflamatorias y las células del sistema inmunitario (Thakker et al., 2006). Las células inflamatorias (neutrófilos y monocitos/macrófagos principalmente) llegan a la zona del infarto de manera temprana e intervienen en la digestión proteolítica y en la fagocitosis del tejido infartado. Estas células son guiadas hasta la zona de actuación gracias a la acción de citoquinas y moléculas de adhesión liberadas por las células endoteliales de la vasculatura que bordea la zona infartada. Esta migración hacia la zona infartada también es facilitada por la actividad proteolítica de las MMPs. La respuesta inflamatoria tiene un pico de actividad tras 1 o 2 semanas postinfarto de miocardio y seguidamente va disminuyendo a medida que las células inflamatorias van desapareciendo como consecuencia de la muerte por apoptosis, sucediendo esto tras 3 ó 4 semanas después del IAM. Se ha

descrito que el RVA puede continuar durante meses hasta que las fuerzas de distensión son contrarrestadas por la resistencia a la tracción de la cicatriz de colágeno formada. Este equilibrio se determina por el tamaño, la ubicación y la transmuralidad del infarto, por la extensión del aturdimiento miocárdico, por la permeabilidad de la arteria relacionada con el infarto y por factores trópicos locales (Warren et al., 1988).

El RVA se puede dividir en dos fases. En una primera fase o fase temprana del RVA, que se correspondería con las primeras 72 horas después del IAM, se produce el reclutamiento de los leucocitos que contribuyen a la eliminación de los cardiomiocitos necróticos y tiene como principal característica la expansión de la zona infartada. Esta expansión provoca una dilatación aguda de la zona dañada y una alteración dramática de la geometría y el volumen del VI (Swynghedauw, 1999). Durante esta fase se desencadena la degradación del colágeno que forma parte de la matriz extracelular (MEC) normal junto con la inducción de péptidos bioactivos y citoquinas (Cleutjens et al., 1995). La degradación de la MEC se considera un mecanismo esencial que permite el acceso de las células inflamatorias a la zona dañada así como la proliferación y maduración de macrófagos y fibroblastos. Sumado a esto, se activa una respuesta inflamatoria aguda dirigida en gran parte por la expresión coordinada de citoquinas, quimiocinas, moléculas de adhesión celular, factores de crecimiento y MMPs liberadas por los neutrófilos. Los leucocitos inflamatorios reclutados a la zona infartada contribuyen a la limpieza de los cardiomiocitos necróticos para permitir la formación del tejido granular, constituido principalmente por macrófagos, miofibroblastos y vasos sanguíneos de nueva formación, que será la base para la posterior formación del tejido cicatrizal en la fase tardía del RVA (Christia et al., 2013). Debido a que el daño por IAM progresa en los siguientes días, se desarrolla un flujo de células inflamatorias dentro de la zona afectada que desencadena más proteólisis, tanto celular como de la MEC, extendiendo el daño por el VI. La expansión del infarto ocurre en ausencia de alteraciones en las condiciones de carga del VI y clínicamente tiene una gran relevancia debido a que puede derivar en una disfunción ventricular, desencadenar el fallo cardíaco por rotura ventricular y finalmente la muerte del paciente (Sutton and Sharpe, 2000).



En la segunda fase del RVA, también denominada fase tardía o fase final de maduración, que tiene lugar pasadas 72 horas tras el IAM y en la que los miofibroblastos forman una matriz extracelular con base de colágeno tipo I y tipo III, se produce la formación y consolidación de la cicatriz miocárdica (Yang et al., 2002). Durante la fase tardía se favorece la dilatación del VI dependiente del tiempo, la distorsión de la forma ventricular y la hipertrofia ventricular, procesos desencadenados como consecuencia de la formación de la nueva MEC de colágeno que servirá para desarrollar el tejido cicatrizal (Yang et al., 2002). Los cambios en la MEC afectan a todas las regiones del VI: la región infartada, el miocardio viable dentro de la zona que bordea el tejido miocárdico infartado y la región alejada o remota del tejido infartado. Dentro de la región infartada, las estructuras de colágeno tipo I y Tipo III que se crean sirven de soporte para los cardiomiocitos salvados y esto posibilita una mejor resistencia a las deformaciones ocasionadas en el VI como consecuencia del ciclo cardíaco. Cuando se produce un fallo en la estructuración de la MEC, supone un adelgazamiento de la pared del VI (Anversa et al., 1991). Con respecto a la región remota, el aumento en los depósitos de MEC ocurre entre los cardiomiocitos hipertrofiados, los miocitos cardíacos viables y los fascículos celulares.

#### **4.1. Citoquinas en el remodelado ventricular adverso**

Las citoquinas son un conjunto de proteínas de pequeño peso molecular sintetizadas por multitud de células entre las que se encuentran los adipocitos y las células del sistema inmune. Su función es inmunorreguladora siendo fundamentales en la comunicación y en las interacciones que establecen las células del sistema inmune entre sí y con otras células. Las citoquinas dirigen la respuesta inmune innata y la respuesta inmune específica e intervienen en la respuesta inflamatoria. Para ello, activan a macrófagos, eosinófilos, células NK y neutrófilos e inducen la producción de RLO por parte de los macrófagos.

Las citoquinas junto con los neutrófilos juegan un importante papel en el RVA. Estas moléculas pueden provocar daños tisulares mediante al menos 4 mecanismos: 1) liberación de RLO, 2) liberación de elastasa y proteasas (como las caspasas), 3) liberación de metabolitos del ácido araquidónico unida a la

activación de factores plaquetarios y 4), apoptosis progresiva de los miocitos (Jordan et al., 1999; Palojoki et al., 2001). Además, por otro lado actúan en el proceso de formación de la cicatriz durante el RVA a través de la activación de la fagocitosis y la reabsorción del tejido necrótico, en el mantenimiento y la hipertrofia de los miocitos supervivientes, en la degradación y la síntesis de la MEC, y en la proliferación de los miofibroblastos.

Determinadas citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) o la interleucina 6 (IL-6) de las que hablaremos en detalle más adelante, son sintetizadas en la fase temprana del RVA después de un IAM y pueden tener un efecto dual potenciando la supervivencia de los miocitos, o por el contrario acelerando la necrosis y la apoptosis en el miocardio afectado. De forma crónica, las citoquinas también pueden actuar en el RVA tardío a través de la activación de MMPs, la regulación de las integrinas, el control de la angiogénesis y la regulación de la movilización de células progenitoras (Min Nian et al., 2004).

En modelos de IAM en roedores, durante la fase temprana del RVA, entre la primera hora y las 24 horas después de un proceso isquémico, se ha observado tanto en el área infartada como en la zona de miocardio no isquémico una marcada expresión y producción de citoquinas, incluyendo TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-1 $\beta$ . Esta sobreexpresión puede volver a los niveles normales si el infarto es pequeño. Sin embargo, si el tamaño del infarto es considerable, o si la respuesta inflamatoria del individuo es elevada, puede mantenerse esta sobreproducción de citoquinas en el tiempo o producirse una segunda ola de sobreexpresión de las mismas, correspondiendo con la fase tardía del RVA (Deten et al., 2002).

Determinadas citoquinas son capaces de auto amplificar su respuesta a través de un bucle de retroalimentación positiva controlado mediante el factor de transcripción NF- $\kappa$ B (Neels et al., 2006). En este sentido, se ha visto que la sobreexpresión de las citoquinas como el TNF- $\alpha$  en un área localizada del miocardio como es la región isquémica, puede inducir la sobreexpresión de más citoquinas en regiones vecinas dentro del miocardio no isquémico, provocando una amplificación de la respuesta inflamatoria. Esto sugiere que citoquinas como el TNF- $\alpha$  pueden activar una red de amplificación a distancia que media un potente efecto de remodelado ventricular no sólo en la zona

infartada, si no también en regiones remotas actuando en la reparación global y el RVA del miocardio (Min Nian et al., 2004).

## **5. INFLUENCIA DE LAS COMORBILIDADES EN EL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

Existen una serie de factores que se asocian con una mayor probabilidad de padecer una enfermedad cardiovascular. Estos factores de riesgo cardiovascular se pueden clasificar en dos grandes grupos: factores de riesgo no modificables, entre los que se incluyen la edad, el sexo, la raza y los factores de tipo genético o hereditario; y los factores de riesgo modificables, como por ejemplo la hipertensión, la diabetes o la obesidad (Bello and Mosca, 2004; Vivo et al., 2009).

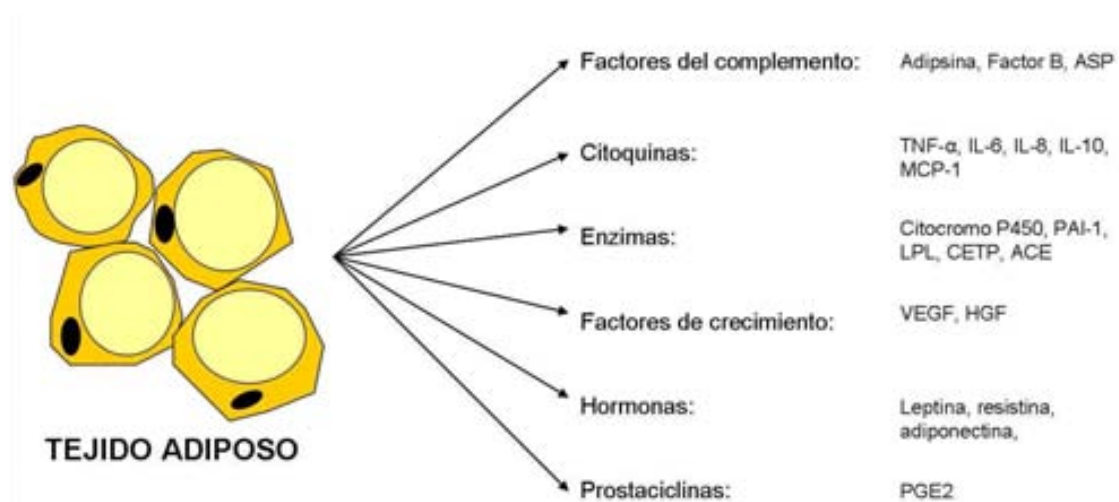
### **5.1. Obesidad**

El dramático aumento en su prevalencia y su fuerte asociación con la enfermedad cardiovascular han convertido a la obesidad en una gran amenaza para la salud en todo el mundo (Lepor et al., 2013). Diferentes estudios epidemiológicos demuestran de manera sólida que la obesidad provoca un aumento en la susceptibilidad de desarrollar una enfermedad cardiovascular, y más concretamente IAM e insuficiencia cardíaca (Nguyen and Lau, 2012; Roos et al., 2012; Scarpellini and Tack, 2012). Sin embargo, numerosos estudios sugieren que los individuos obesos con una enfermedad cardiovascular establecida presentan un mejor pronóstico que aquellos individuos con un peso normal que padecen la misma enfermedad (Curtis et al., 2005; Oreopoulos et al., 2008; Srikanthan and Horwich, 2012). Este fenómeno conocido como paradoja de la obesidad continua siendo controvertido y hasta el momento, la evidencia experimental es escasa y se desconocen los mecanismos que la determinan.

#### **5.1.1. Fisiopatología de la obesidad**

El adipocito actúa como un órgano endocrino y a través de la secreción de un gran número de proteínas juega un papel principal en la patogénesis y las complicaciones cardiovasculares de la obesidad (Figura 1). Por ejemplo, se ha visto que el aumento en los niveles de leptina, una hormona liberada por los adipocitos que interviene en el control de la ingesta, podría estar relacionado

con las enfermedades cardiovasculares (Martin et al., 2008). Los adipocitos también intervienen en la síntesis y liberación de citoquinas proinflamatorias como la IL-6 y el TNF- $\alpha$ , por lo que se ha propuesto que la obesidad provoca un estado inflamatorio crónico leve (Lowe, 2001). El aumento directo de la inflamación sistémica causado por la obesidad actúa en múltiples mecanismos patogénicos que intervienen en la asociación entre obesidad, patología cardiovascular, y comorbilidades como la dislipemia, la DM-2, la hipertensión o el síndrome metabólico. Se ha visto que en ratones alimentados con una dieta alta en grasa la ganancia de peso se asocia con la inducción de un gran número de vías inflamatorias del tejido adiposo: concretamente, el 59% del total de los transcritos de ARNm inducidos en el adipocito durante la ganancia de peso debida a la dieta alta en grasa provienen de genes relacionados con la inflamación (Xu et al., 2003). Se ha observado también que la obesidad altera la cantidad de células inflamatorias presentes en el tejido adiposo. Mientras que de forma normal, la población de macrófagos en la grasa no excede del 10% del total de células halladas, cuando se lleva a cabo una dieta que favorece la obesidad, se produce una infiltración de macrófagos significativa que puede llegar a alcanzar el 60% del total de células encontradas en el tejido adiposo (Weisberg et al., 2003).



**FIGURA 1: Proteínas secretadas por el tejido adiposo.** ASP, proteína estimuladora de la acilación; TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral alfa; IL, interleucina; MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos tipo 1; PAI-1, activador del inhibidor del plasminógeno 1; LPL, lipoproteína lipasa; CETP, proteína transferasa de ésteres de colesterol; ACE, enzima convertidora de angiotensina; VEGF, Factor de crecimiento endotelial vascular; HGF, factor de crecimiento hepático; PGE2, prostaglandina E2.

Además, de la misma forma que ocurre con los macrófagos en el proceso inflamatorio, recientemente se ha visto que los adipocitos muestran propiedades inflamatorias intrínsecas. De forma similar a los macrófagos, el adipocito es muy sensible a los agentes infecciosos y las señales inflamatorias mediadas por citoquinas mediante la expresión de una gran cantidad de receptores. En la estimulación de estos receptores, se activan cascadas de señalización y se secretan citoquinas proinflamatorias que son capaces de actuar como verdaderas hormonas responsables de controlar la ingesta y el gasto energético (Mora and Pessin, 2002). Muchas de estas sustancias, entre las que se incluyen el TNF- $\alpha$ , la IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8, IL-10, IL-15, MCP-1, la prostaglandina E2, el angiotensinógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), o potenciales moduladores de la inflamación como la leptina, la resistina o la adiponectina, que en conjunto se denominan adipoquinas, pueden actuar como factores proinflamatorios e intervenir en procesos como la arterioesclerosis.

Por otro lado, la obesidad es responsable de la activación de un grupo de desórdenes metabólicos con implicaciones vasculares denominados en su conjunto síndrome metabólico, cuya característica principal es la resistencia a la insulina (Eckel et al., 2005; Cornier et al., 2008). La resistencia a la insulina se define como la reducción en la capacidad de un individuo para estimular la utilización de la glucosa, bien por una deficiencia en la secreción de insulina, o bien por una alteración en la propia hormona (Okere et al., 2006). Aunque la obesidad es la causa más común de resistencia a la insulina, no todos los individuos obesos desarrollan esta alteración. Según diversos estudios, lo que determina la aparición de esta disfunción metabólica es la acumulación de grasa visceral, el sexo y una baja actividad física (Manson et al., 2004; Silva et al., 2008). El consumo de una dieta alta en grasas desencadena alteraciones en los mecanismos de captación de la glucosa en determinados tejidos como el hígado y el tejido muscular, que conllevan una reducción en la utilización de la glucosa. Una de las hipótesis que puede explicar la reducción en la utilización de glucosa en estos tejidos como resultado de la resistencia a la insulina es asegurar la disponibilidad de la glucosa para las células del sistema nervioso central (Schwartz et al., 1999; Nogueiras et al., 2009).

Con respecto al tejido cardíaco, hay relativamente pocos estudios que hayan comparado la composición bioquímica y estructural del corazón en individuos obesos frente a individuos normales. El resultado de un aumento en la grasa epicárdica y una mayor infiltración de grasa en el miocardio es el aumento en la masa cardíaca que podría formar parte del proceso de hipertrofia cardíaca. Una característica común descrita en la mayoría de los modelos animales de obesidad es el incremento en la cantidad de triglicéridos intracelulares en el corazón (Zhou et al., 2000; Christoffersen et al., 2003; Buchanan et al., 2005). Las dietas que son altas en grasas saturadas están asociadas con un aumento en la concentración de triglicéridos y ceramida, relacionándose esto con un incremento en la apoptosis (Okere et al., 2006). Por este motivo, el aumento en los triglicéridos podría representar un marcador en la lipotoxicidad cardíaca.

### **5.1.2. Factores proinflamatorios y adipoquinas asociados a la obesidad**

En los individuos obesos, el estado inflamatorio crónico leve que les provoca la obesidad viene mediado por la secreción a cargo de los adipocitos de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1 y adipoquinas como la leptina, la resistina o la adiponectina. El tejido adiposo puede ser la principal fuente de estos factores proinflamatorios y adipoquinas, o bien ejercer un control directo sobre la expresión de estos factores en otros tejidos.

#### **5.1.2.1. Factor de necrosis tumoral- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

El factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), es una proteína transmembrana perteneciente a la superfamilia de los factores de crecimiento tumoral que tiene como principal función intervenir en los mecanismos de diferenciación y desarrollo. La obesidad modifica los niveles de expresión de TNF- $\alpha$  en el tejido adiposo y el muscular. Cuando se compara con el tejido adiposo subcutáneo, la grasa visceral de pacientes obesos muestra un fenotipo de tejido adiposo proinflamatorio caracterizado por una elevada expresión del TNF- $\alpha$  y una mayor infiltración de macrófagos. Sin embargo, no todos los estudios han encontrado que los niveles de esta citoquina estén elevados en

obesidad. Esto puede deberse a que los niveles circulantes normales en suero de este factor se encuentran en el límite de detección, por lo que resulta complicado su análisis cuantitativo.

El TNF- $\alpha$  ejerce diversos efectos en la función del adipocito, entre los que se incluyen mecanismos de inhibición de la lipogénesis y aumento de la lipólisis. Además, la señalización mediante esta citoquina disminuye determinados efectos de la insulina, principalmente por la fosforilación de la serina del IRS-1 (*Insulin receptor substrate 1*) y mediante la reducción en la expresión de GLUT-4 (*Glucose transporter type 4*), lo que apoya su actuación como un posible mediador en la resistencia a la insulina (Hotamisligil et al., 1995; Hotamisligil, 1999).

#### 5.1.2.2. Interleucina 6 (IL-6)

La interleucina 6 (IL-6) es una citoquina perteneciente a una familia de proteínas cuyos rasgos comunes son su estructura proteica helicoidal y una subunidad receptora común denominada glicoproteína 130 (Hibi et al., 1996). Aunque la IL-6 tiene como principales fuentes secretoras los monocitos/macrófagos, los fibroblastos y las células endoteliales vasculares, se estima que los adipocitos producen un 25% de la IL-6 sistémica *in vivo* (Mohamed-Ali et al., 1997). De forma similar a lo que ocurre con el TNF- $\alpha$ , los datos de los que disponemos sobre el significado del aumento de los niveles sistémicos de IL-6 en estados de obesidad son controvertidos. La inducción de la secreción de IL-6 relacionada con la obesidad favorece la liberación de proteína C reactiva (PCR) y hay evidencias que sugieren que la IL-6 disminuye la actividad lipoproteín lipasa (LPL), lo que resulta en un aumento de la captación de lípidos por parte de los macrófagos. También diversos estudios han demostrado que la pérdida de peso se asocia con un descenso en los niveles circulantes de IL-6 (Esposito et al., 2003; Kopp et al., 2003).

Con respecto al proceso de resistencia a la insulina, hay estudios que defienden un papel de la IL-6 en el desarrollo de la resistencia, mientras que otros autores sostienen que esta citoquina previene la aparición del síndrome metabólico y la resistencia a la insulina (Yudkin et al., 2000; Febbraio and Pedersen, 2002).



#### 5.1.2.3. Proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1)

La proteína quimioatrayente de monocitos 1 (MCP-1), también conocida como CCL2, y expresada por los adipocitos, es una adipoquina que tiene un papel central en el reclutamiento de monocitos y linfocitos T a los lugares donde se lleva a cabo el proceso inflamatorio. La sobreexpresión de MCP-1 por los adipocitos interviene en la infiltración de macrófagos que se produce en el tejido adiposo en la obesidad (Kim et al., 2006). Además puede jugar un importante papel en el desarrollo y mantenimiento del estado proinflamatorio que predispone al desarrollo de la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico. Diversos estudios han demostrado un aumento significativo de los niveles de MCP-1 circulantes en individuos con obesidad o en pacientes con DM-2, mientras que de forma inversa, la pérdida de peso contribuye a disminuir estos niveles (Nomura et al., 2000). Por otra parte, esta adipoquina es producida por muchos otros tipos celulares, como por ejemplo células del músculo liso endotelial, fibroblastos y linfocitos. Por lo tanto, estas condiciones no detectables podrían influir en los niveles circulantes de MCP-1, haciendo improbable que esta molécula pueda reflejar por si misma estados de enfermedad relacionados con la obesidad.

#### 5.1.2.4. Leptina

La primera adipoquina en ser caracterizada fue la leptina (Zhang et al., 1994). Se trata de una hormona específica del tejido adiposo que actúa de forma directa en el hipotálamo reduciendo la ingesta de alimento y aumentando el gasto energético, estando sus niveles directamente relacionados con la cantidad de tejido adiposo. En los individuos obesos aparecen altas concentraciones de leptina tanto mayores cuanto mayor cantidad de grasa esté presente. Esta elevación paradójica de la hormona que interviene en la saciedad en obesidad podría explicarse en parte por la aparición de una resistencia a la leptina mediada por alguno de sus propios receptores (Enriori et al., 2006). Además, los niveles elevados de leptina en obesos están relacionados con la resistencia a la insulina y el síndrome metabólico.

La leptina ejerce sus funciones a través de diversas vías de señalización, entre las que se encuentran JAK/STAT, AMPK, PI3-AKT y MAPK.

Estas vías están implicadas en la señalización por RISK (*reperfusion injury salvation kinase*), la cual se ha sugerido que podría intervenir en la protección del corazón frente al daño por IR (Hausenloy et al., 2011).

#### 5.1.2.5. Resistina

En el año 2001 se identificó la proteína resistina, también conocida como factor secretado por adipocitos (ADSF), como una nueva adipoquina (Steppan et al., 2001). La resistina es sintetizada por los adipocitos adultos aumentando sus niveles en obesidad e interviniendo en procesos relacionados con el control de la insulina (Steppan et al., 2001).

Existe un cierto grado de interacción entre la resistina y otras adipoquinas. Tanto la adiponectina como la leptina muestran una unión funcional con la resistina que se refleja de diversas maneras. Por un lado, la adiponectina puede inhibir los efectos de la resistina en la resistencia a la insulina y en la inflamación, mientras que por otro lado, en modelos de ratón ob/ob (ratón nulo para el gen de la leptina) se ha visto que se favorece la eliminación de la expresión de ARNm para resistina cuando se administra leptina. Además, se ha observado que determinadas funciones de la resistina en el metabolismo de la glucosa y la regulación de la energía son dependientes de la presencia o ausencia de leptina (Qi et al., 2006). Otras moléculas que pueden aumentar sus niveles por mediación de la resistina son MCP-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y PCR, que junto con la inducción de otras sustancias en el endotelio vascular, apoyarían el papel pro-inflamatorio de la resistina (Shetty et al., 2004; Silswal et al., 2005).

A pesar de estos estudios que relacionan a la resistina con el proceso inflamatorio, existen otros trabajos que han relacionado de forma inversa los niveles de resistina circulantes en individuos obesos con el sistema TNF y desvinculan esta adipoquina de los procesos inflamatorios (Beltowski, 2003). En este sentido, se ha observado que el TNF- $\alpha$  disminuye la expresión de la resistina en los adipocitos, lo cual, combinado con la baja expresión de esta proteína en el tejido adiposo humano, estaría en contra de la intervención de la resistina en los procesos inflamatorios crónicos relacionados con la obesidad.

#### 5.1.2.6. Adiponectina

De forma general, la cantidad de tejido adiposo está relacionada con un aumento en la producción y niveles plasmáticos de las adipoquinas. La única excepción conocida a esta regla es la adiponectina. Cuanta mayor es la cantidad de tejido adiposo, menores son los niveles de esta proteína en plasma. Se ha visto que los adipocitos son capaces de codificar la proteína y secretarla, aunque también se ha descrito más recientemente que puede ser secretada en niveles muy por debajo de los del tejido adiposo por los cardiomiocitos humanos y murinos (Pineiro et al., 2005). La adiponectina ejerce su acción mediante receptores de membrana, de los cuáles se han podido clonar dos tipos: AdipoR1, más abundante en músculo esquelético y AdipoR2, más común en hígado (Nanayakkara et al., 2012).

La adiponectina es uno de los factores más abundantes liberados por el tejido adiposo y se cree que mejora la sensibilidad a la insulina e inhibe la inflamación vascular (Lyon et al., 2003). La hipoadiponectinemia puede contribuir al proceso de resistencia a la insulina y acelerar el mecanismo aterogénico asociado con la obesidad. Además, la insulina es capaz de inhibir la secreción de adiponectina y existe una relación inversa entre los niveles circulantes de insulina y adiponectina.

Por otro lado, se considera que la adiponectina puede tener efectos antiinflamatorios y estos pueden estar influidos, en parte, por una disminución en la expresión de TNF- $\alpha$  mediada por la inhibición de la resistina. En estudios con tejidos humanos se ha visto que en individuos con unos niveles elevados de expresión de ARNm para adiponectina se secretan bajas cantidades de TNF- $\alpha$  desde el tejido adiposo (Kern et al., 2003).

#### **5.1.3. Obesidad y síndrome coronario agudo**

Existen diversos estudios clínicos que relacionan la obesidad con el síndrome coronario agudo (SCA) (Mahaffey et al., 2010; Angeras et al., 2013; Jahangir et al., 2014). Esta asociación entre obesidad y enfermedad coronaria está mediada en parte por factores de riesgo asociados a la obesidad, como son la hipertensión, la dislipemia y la DM-2 (Jahangir et al., 2014). Se ha propuesto que otra serie de factores potenciados por la obesidad, como el

aumento en la circulación de ácidos grasos libres, la inflamación y cambios en la naturaleza de las lipoproteínas que las hacen más aterogénicas, contribuirían a desarrollar o acelerar la enfermedad coronaria (Lopez-Jimenez and Cortes-Bergoderi, 2011).

Diferentes estudios demuestran que la obesidad está relacionada con cambios estructurales y funcionales en el miocardio relacionados con la enfermedad coronaria (Lavie et al., 2003; Poirier et al., 2006; Abel et al., 2008). Se ha observado que los individuos obesos presentan un incremento en el volumen total de sangre y un aumento del gasto cardíaco que en parte, es requerido por un aumento en la demanda metabólica a causa del exceso de peso (Alpert, 2001). Por lo tanto, para cualquier actividad el trabajo cardíaco es mayor en los sujetos obesos. El aumento del gasto cardíaco se produce principalmente por un mayor volumen sistólico ya que la FC aumenta muy poco o permanece invariable. Este factor también contribuye a una dilatación ventricular que puede provocar un mayor estrés en la pared ventricular y generar hipertrofia del VI (Poirier et al., 2006)

Además de la hipertrofia del VI, en individuos obesos normotensos puede producirse el aumento de tamaño de la aurícula izquierda relacionándose con una adaptación fisiológica al aumento de la volemia. Como consecuencia de esto, la dilatación de la aurícula izquierda puede mediar en el aumento del riesgo de padecer fibrilación auricular (Wang et al., 2004). Un estudio reciente de Wanahita et al., demostró que los pacientes obesos tienen un 50% más de riesgo de desarrollar fibrilación auricular, intensificándose este riesgo con el aumento del índice de masa corporal (IMC) (Wanahita et al., 2008). Por último, algunos estudios sugieren que la obesidad aumenta la inestabilidad eléctrica y la aparición de arritmias ventriculares, incluso en ausencia de disfunción ventricular (Messerli et al., 1987; Poirier et al., 2006).

En los pacientes obesos que sufren un IAM, el aumento de peso del corazón, probablemente a causa de la acumulación de grasa epicárdica, y la hipertrofia cardíaca, acentúan los cambios estructurales que forman parte del RVA (Trayhurn and Wood, 2004; Abel et al., 2008; Aurigemma et al., 2013) Además, de forma contraria a lo que podría esperarse, la fracción de eyección (FE) se mantiene normal, aun produciéndose un aumento del volumen de

carga, una disminución de la deformación (*strain*) ventricular y una disminución de la frecuencia de llenado (Abel et al., 2008).

A pesar de la existencia de los trabajos que relacionan la obesidad con un aumento en el riesgo de padecer una enfermedad cardiovascular, no está todavía claro cuáles son los mecanismos que relacionan la obesidad con el SCA y es necesario llevar a cabo nuevas investigaciones para comprender, de forma más exacta, la relación entre obesidad y SCA.

#### **5.1.4. Paradoja de la obesidad**

Si bien la obesidad aumenta el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares, diversos estudios epidemiológicos han mostrado que los pacientes obesos con una enfermedad cardiovascular establecida presentan, de manera paradójica, un mejor pronóstico que los individuos normales que desarrollan la misma enfermedad (Gruberg et al., 2002; Lopez-Jimenez et al., 2004; Kennedy et al., 2005; Sierra-Johnson et al., 2005; Romero-Corral et al., 2006; Thomas et al., 2013). Este fenómeno se conoce como la “*paradoja de la obesidad*”.

Se ha observado que en pacientes con patología coronaria establecida se produce un descenso de la mortalidad en los individuos obesos con respecto a los individuos con un peso normal, a pesar de que la obesidad puede ser un potente factor de riesgo para la hipertensión y la hipertrofia ventricular izquierda (Stamler et al., 1991; Wassertheil-Smoller et al., 2000). Se ha sugerido que este hecho podría deberse a que los pacientes obesos poseen una menor resistencia vascular sistémica y una menor actividad del sistema renina-angiotensina a nivel plasmático comparados con los pacientes de peso normal con hipertensión (Lavie et al., 2007).

Por otro lado, se cree que el patrón neuroendocrino y de citoquinas en los individuos obesos podría tener efectos cardioprotectores que ayudarían a explicar en parte la paradoja de la obesidad. En este sentido, se ha sugerido que el aumento de lipoproteínas en la sangre de los pacientes obesos disminuiría la cantidad de lipopolisacáridos circulantes disminuyendo la activación del proceso inflamatorio mediado por las citoquinas, y aminorando los efectos perjudiciales del estado inflamatorio crónico de la obesidad (Rauchhaus et al., 2000).

Del mismo modo que sucede con la hipertensión y la insuficiencia cardíaca, algunos estudios sugieren que se produce la paradoja de la obesidad en el contexto del IAM (Romero-Corral et al., 2006; Lopez-Jimenez and Cortes-Bergoderi, 2011). Sin embargo, las evidencias que demuestran que la obesidad puede modificar el tamaño del infarto son escasas. Apoyando la paradoja de la obesidad, existen dos trabajos experimentales en los que se ha observado en pacientes con IAM un menor tamaño del infarto en individuos obesos comparados con individuos de peso normal (Pingitore et al., 2007; Bucholz et al., 2012)

A pesar de que disponemos de datos compatibles con la existencia de un efecto protector de la obesidad, diversos estudios han puesto en duda la existencia de la paradoja de la obesidad (Gurm et al., 2002; Rana et al., 2004; Diercks et al., 2006; Domanski et al., 2006; Habbu et al., 2006; Aronson et al., 2010; Benderly et al., 2010; Guglin et al., 2013). Estos trabajos han relacionado de forma positiva el IMC con la mortalidad tras un IAM y han sugerido que los pacientes obesos con SCA reciben un tratamiento más agresivo obteniendo resultados menos negativos que en los pacientes de peso normal. También argumentan que la paradoja de la obesidad es simplemente el resultado de una mala selección de los índices que determinan la obesidad, o que la inclusión en los análisis de pacientes con bajo peso corporal en los que se sabe que tienen un peor pronóstico podría causar un impacto negativo en el análisis estadístico global.

El hecho contradictorio de que la obesidad pueda favorecer el desarrollo de la enfermedad cardíaca y a la vez mejorar su pronóstico requiere una confirmación sólida. Uno de los posibles pasos a seguir sería la utilización de modelos experimentales en los que se eliminaran los efectos de otras comorbilidades, consiguiendo individuos sólo obesos en los que no interfirieran las alteraciones producidas por otros factores como la DM-2 o la hipertensión.

#### 5.1.4.1. La paradoja de la obesidad en modelos animales

Se han desarrollado un gran número de modelos animales en un intento de aclarar los mecanismos que contribuyen a la lesión cardíaca y la disfunción provocada por la obesidad. En la evaluación de los resultados obtenidos en estudios con animales, es importante tener en cuenta que, de la misma forma

que sucede con los humanos, la obesidad está asociada con morbilidades tales como la intolerancia a la glucosa, la DM-2 y la hipertensión. Estas comorbilidades pueden alterar de alguna manera la susceptibilidad del miocardio al daño por IR, o modificar los procesos de RVA favoreciendo o disminuyendo el desarrollo de insuficiencia cardíaca. Por este motivo, es interesante disponer de modelos de obesidad en ausencia de otras patologías asociadas.

Los modelos animales en rata y ratón con obesidad generalizada pueden ser de dos tipos: mutaciones genéticas que dan lugar a la obesidad y modelos de obesidad inducida por dieta alcanzada mediante la alimentación de los animales con dietas hipercalóricas, bien sean ricas en carbohidratos, o bien con un excedente en grasas (dieta alta en grasa, HFD). Para ambos casos, existen estudios que ofrecen tanto resultados positivos como negativos en el contexto de la paradoja de la obesidad.

#### *5.1.4.1.1. Modelos genéticos de obesidad*

El modelo de rata con obesidad inducida mediante alteraciones genéticas más común es el de Zucker o rata *fa/fa*. Estos animales poseen una mutación en el receptor de la leptina. Las ratas obesas tipo Zucker se utilizan como modelos de obesidad, resistencia a la insulina, intolerancia a la glucosa y una hiperglicemia de nivel medio con el tiempo. Las ratas obesas y diabéticas tipo Zucker (ZDF), que derivan de las anteriores tienen un defecto adicional en las células pancreáticas beta que acelera su disfunción provocando un inicio más temprano de la DM-2 (Russell and Proctor, 2006).

Uno de los modelos genéticos de obesidad más común en ratones es el originado mediante mutaciones en el gen de la leptina o su receptor. Los ratones *ob/ob* son nulos para el gen de la leptina y desarrollan obesidad, hiperinsulinemia, empeoramiento de la tolerancia a la glucosa poco después del destete y diabetes entre las 10 y 15 semanas de edad (Mazumder et al., 2004). Los ratones con mutaciones en el receptor de la leptina (*db/db*) desarrollan la diabetes de forma más temprana, a las cinco semanas de edad aproximadamente (Buchanan et al., 2005). Estos modelos son muy utilizados para llevar a cabo estudios farmacológicos y genéticos, sin embargo, ambos modelos tienen limitaciones en la patogénesis de la obesidad ya que son

modelos monogénicos y en su obesidad no intervienen factores medioambientales. Otra limitación importante de los modelos genéticos que implican a la leptina o su receptor son las alteraciones que sufren estos animales en el sistema inmune, ya que estas pueden modificar los procesos de inflamación e influenciar el remodelado después de un IAM (Thakker et al., 2006).

En la literatura existen dos trabajos que han utilizado modelos genéticos de obesidad para el estudio de la paradoja de la obesidad, y en ellos, llevados a cabo en ratones *db/db* y ratones *ob/ob*, se ha descrito un aumento del tamaño del infarto en animales obesos con respecto a los controles, ofreciendo resultados en contra del efecto paradójico (Bouhidel et al., 2008; Zhu et al., 2012).

#### 5.1.4.1.2. Modelos de obesidad inducida por dieta

La dieta es uno de los principales factores medioambientales que contribuyen al desarrollo de la obesidad. Los modelos con roedores son herramientas útiles para el estudio de la obesidad ya que ganan peso fácilmente cuando se alimentan con dietas hipercalóricas y poseen características similares a los obesos humanos (Buettner et al., 2007).

Los modelos de rata tipo Sprague-Dawley y algunas cepas de ratas Wistar son los más utilizados para el estudio de la obesidad. En particular, las ratas Sprague-Dawley han sido estudiadas por su capacidad de mostrar una respuesta variable a una dieta HFD (32 ó 45% de kcal procedentes de la grasa) obteniéndose diferentes grados de obesidad reflejados en la aparición de diversas patologías.

Para el caso de los ratones, la mayoría de estos animales tienden a desarrollar obesidad alimentados con dieta HFD, pero puede haber respuestas variables en el aumento de peso, la tolerancia a la glucosa, la resistencia a la insulina, los triglicéridos y otros parámetros dependiendo de la cepa. Algunas cepas puras son más sensibles a padecer obesidad cuando se alimentan con dieta HFD como es el caso de los ratones C57BL/6 o AKR. Sin embargo, los ratones son bastante resistentes a la arterioesclerosis o a las consecuencias de la obesidad (desarrollo de hiperglicemia, resistencia a la insulina y DM-2), por



lo que las dietas HFD deben contener un porcentaje elevado de grasas (un mínimo del 20%). La alimentación con dietas semisintéticas bajas en grasa y ricas en carbohidratos no produce una ganancia de peso excesiva o la aparición de resistencia a la insulina en modelos de ratón.

En la mayor parte de los estudios realizados con modelos de obesidad inducida por dieta HFD no se confirma la existencia de la paradoja de la obesidad. En ratas con obesidad inducida por dieta hipercalórica se ha observado un aumento del tamaño del infarto, un empeoramiento en la recuperación de la función cardíaca tras la IR, y un aumento en los niveles de TNF- $\alpha$ , angiotensina II y presión sanguínea relacionado con el empeoramiento en la función mecánica del miocardio tras la isquemia (du Toit et al., 2005; Clark et al., 2010; Liu and Lloyd, 2013; Wensley et al., 2013). En ratones con obesidad inducida por dieta HFD se ha descrito un aumento del RVA y una tendencia a una mayor cicatriz tras el IAM, factores que van en contra de la paradoja de la obesidad (Thakker et al., 2008)

Sin embargo, existen diversos trabajos en ratas alimentadas con dietas hipercalóricas en los que las ratas insensibles a la insulina, o ratas a las que se les administran dietas suplementadas con sucrosa y leche condensada mejoran la tolerancia a la IR o reducen el tamaño del infarto, apoyando esto el efecto paradójico de la obesidad (Huisamen et al., 2012; Donner et al., 2013). No obstante, estos trabajos se basan en dietas ricas en carbohidratos diferentes de las dietas con alto contenido en grasa que se consumen más comúnmente en la población, y que son las principales causantes de la obesidad.

#### *5.1.4.1.3. Modelo de ratón obeso BDF1*

Para nuestro trabajo experimental necesitábamos un modelo de obesidad en el que pudiéramos estudiar los posibles mecanismos implicados en la paradoja de la obesidad y con el menor número de patologías asociadas que pudieran enmascarar el efecto atribuible exclusivamente a la obesidad. Con este fin, se seleccionó la cepa BDF1 como ratón con obesidad inducida por dieta HFD. La cepa BDF1 proviene de la F1 de un cruce entre hembras de la cepa C57BL/6, la cual puede desarrollar una obesidad inducida relacionada con resistencia a la insulina; y machos de la cepa DBA/2, en la que aparece

una disfunción de la célula beta pancreática con la consiguiente disminución en la secreción de insulina (Schmid et al., 2004; Karasawa et al., 2009). Los ratones BDF1 no presentan alteraciones patológicas importantes con la edad. Se ha descrito previamente que cuando son alimentados con una dieta normal adquieren peso de forma progresiva hasta la semana 52, a partir de la cual se estabiliza su peso corporal. La prevalencia de patologías cardíacas o en órganos de interés en la obesidad (como por ejemplo, el hígado) a lo largo de su vida es baja y presentan una probabilidad de desarrollar neoplasias dentro de lo normal, por lo que parecen un buen modelo para llevar a cabo un estudio de patología cardíaca relacionada con obesidad (Yamate et al., 1990).

### **5.1.5. Posibles mecanismos implicados en la paradoja de la obesidad**

Las alteraciones en los niveles de citoquinas y adipoquinas que producen los adipocitos en los individuos obesos junto con las modificaciones en la respuesta a la insulina, pueden desempeñar mecanismos relacionados con la tolerancia del miocardio a la IR y estar relacionadas con la paradoja de la obesidad.

#### **5.1.5.1. Las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1**

Determinados estudios han visto que las citoquinas TNF- $\alpha$  e IL-6 pueden tener un doble papel en el corazón: por un lado, concentraciones bajas de estas citoquinas pueden tener efectos beneficiosos, mientras que por el otro, dosis elevadas han mostrado efectos perjudiciales (Schulz, 2008). El TNF- $\alpha$  puede activar los receptores 1 y 2 para TNF, los cuales se cree que tienen efectos opuestos en el corazón (Schulz and Heusch, 2009). Concretamente, en un modelo de ratón se ha visto que bajas concentraciones de TNF- $\alpha$  activan una cascada de señalización cardioprotectora mediante la activación del receptor 2 para TNF (Lacerda et al., 2009; Schulz and Heusch, 2009). El efecto cardioprotector del TNF- $\alpha$  inicia una cascada de señalización denominada SAFE (*survivor activating factor enhancement*) en la que actúan diferentes quinasas y en la que interviene el factor de transcripción STAT-3 evitando la apertura del mPTP, elemento clave en el daño miocárdico provocado por el IAM (Boengler et al., 2010). Los datos revelan una doble acción contraria del

TNF- $\alpha$  y la IL-6 sobre el miocardio y sus efectos globales sobre la IR en la obesidad no están aclarados.

Por otro lado, mediante el uso de modelos animales, se ha constatado que la citoquina MCP-1 es el principal factor responsable del reclutamiento de células mononucleares dentro del miocardio isquémico (Dewald et al., 2004). Se ha visto que la terapia genética anti-MCP-1 mejora la supervivencia y atenúa la dilatación ventricular en un modelo murino de IAM (Hayashidani et al., 2003). Seguidamente al daño por IR, los corazones de ratones transgénicos con sobreexpresión de MCP-1 han mostrado una disminución en el tamaño del infarto y en la formación de cicatriz cuando han sido comparados con sus controles (Morimoto et al., 2006). Además, la delección específica del receptor CCR2 para MCP-1 también mejora la dilatación ventricular y la disfunción cardíaca después de un IAM. Todos estos estudios sugieren que MCP-1 puede estar relacionado de forma positiva con la paradoja de la obesidad. No obstante, a pesar de todos estos hallazgos, existen datos experimentales con ratones deficientes en MCP-1 en los que se ha visto un menor RVA sin variar significativamente el tamaño del infarto, una disminución en la infiltración de macrófagos, una disminución en la expresión de citoquinas como TNF- $\alpha$  o IL-10, y un descenso de la acumulación de fibroblastos dentro de la zona de cicatrización del infarto (Kaikita et al., 2004). Todo esto sugiere que, al igual que sucedía con TNF- $\alpha$  e IL-6, MCP-1 podría tener un doble efecto contrario en el corazón sometido a un IAM, causando por un lado, RVA, y por otro lado y al mismo tiempo, promoviendo la curación del infarto.

#### 5.1.5.2. Las adipoquinas leptina, resistina y adiponectina

La leptina liberada por los adipocitos de individuos obesos juega un papel importante en las primeras etapas del desarrollo de la aterosclerosis y se ha observado que protege frente al daño letal por reperfusión en corazones aislados de ratón mediante una acción directa en el tejido cardíaco. Además, se ha visto que puede favorecer la expresión de moléculas mediadoras en el proceso inflamatorio como el TNF- $\alpha$  o la IL-6 (Smith et al., 2010; Hausenloy et al., 2011). Este efecto cardioprotector de la leptina se lleva a cabo a través de vías de señalización como P38-MAPK. Por otro lado, el corazón es capaz de producir leptina por si mismo interviniendo en la reducción del gasto cardíaco,

en la regulación de la contractilidad cardíaca y en la producción de sustancias de la MEC de los cardiomiocitos (Nickola et al., 2000; Purdham et al., 2004; Dong et al., 2006; Madani et al., 2006; Palanivel et al., 2006; Smith et al., 2006; Karmazyn et al., 2008). Por lo tanto, el efecto cardioprotector de la leptina frente al daño por IR está a favor de la paradoja de la obesidad.

La resistina se encuentra elevada en el plasma de pacientes con enfermedad coronaria establecida por lo que ha sido propuesta como un marcador diagnóstico del IAM (Lubos et al., 2007). Hay diversos estudios que han demostrado que la resistina puede afectar de forma negativa a la paradoja de la obesidad. Por ejemplo, se ha visto que la resistina contrarresta los efectos cardioprotectores que la insulina ejerce sobre el miocardio y además, en experimentos con ratas que fueron tratadas previamente con resistina, se ha observado un mayor daño tras la IR (Rothwell et al., 2006; Hausenloy and Yellon, 2009). Sin embargo, de forma contraria, Gao et al., utilizando corazones de ratón a los que se les administró la resistina antes de la isquemia, demostraron que esta adipoquina ofrecía protección frente al daño por IR mediante la activación de la vía PI3K/Akt/PKC (Gao et al., 2007). Por el momento, al igual que sucedía con otras citoquinas, tampoco está claro si la resistina puede contribuir al fenómeno de la paradoja de la obesidad.

Por último, la adiponectina ha sido relacionada con patologías cardíacas como la hipertensión, el IAM o la disfunción endotelial (Pischon et al., 2004). Sin embargo, se ha observado que la adiponectina puede tener un efecto protector frente al daño por IR mediante propiedades antiapoptóticas y antiinflamatorias, además de mejorar el remodelado del VI tras un IAM (Ishikawa et al., 2003; Shibata et al., 2005; Debinski et al., 2011). En estudios utilizando corazones aislados de rata, se ha demostrado que la administración de adiponectina al inicio de la isquemia limita el tamaño del infarto mediante un incremento en la activación de la vía AMPK-Akt-eNOS (Gonon et al., 2008). Por último, en experimentos con ratones se ha comprobado que la adiponectina actúa frente al RVA mediante el aumento en la supervivencia del miocardio y la disminución en la fibrosis cardíaca (Shibata et al., 2007). Todo esto podría relacionar a la adiponectina con los mecanismos implicados en los efectos beneficiosos de la obesidad sobre el miocardio.

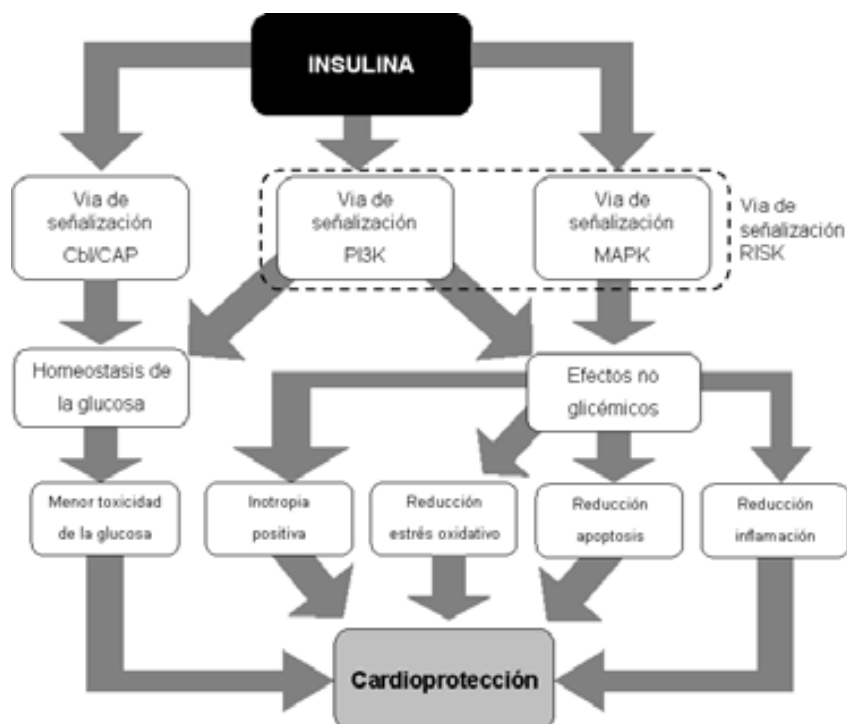
### 5.1.5.3. La insulina

Se sabe que la insulina actúa como un regulador crítico de casi todos los aspectos de la biología de los adipocitos, y estas células son los tipos celulares que mayor número de respuestas desencadenan por la acción de la insulina. Varios de los posibles mecanismos que unen la obesidad y la enfermedad cardiovascular, como por ejemplo el aumento en los niveles de ácidos grasos no esterificados, lipotoxicidad y alteraciones en la secreción de adipocinas y citoquinas, se cree que están íntimamente relacionados con la insulina mediante el mecanismo de resistencia a la insulina.

La hiperinsulinemia es un fuerte modulador de la extensión del daño miocárdico ocurrido durante un proceso de IR (Fuglestad et al., 2008). La aparición de la resistencia a la insulina en animales se ha visto que ocurre tras dos semanas de alimentación con una dieta HFD y representa una adaptación temprana del corazón al exceso de calorías. Las consecuencias de la resistencia adquirida a la insulina no se conocen con exactitud. Sin embargo, hay evidencias de que la reversión de la resistencia a la insulina en el miocardio mediante métodos farmacológicos favorece la utilización de la glucosa miocárdica, reduce las lesiones y mejora la recuperación después de la IR (Reaven, 2011). Por lo tanto, estos estudios sugieren que el impacto de los niveles elevados de insulina circulante que se producen durante la obesidad podría modificar la tolerancia miocárdica al daño por IR.

Diversos estudios han logrado definir las vías de señalización por las que la insulina puede ejercer cardioprotección y se han identificado tres principales: PI3K-Akt-p70S6K-BAD, PI3K-Akt-eNOS y más recientemente, JAK-STAT (Figura 2). Se ha observado que la insulina es cardioprotectora de manera dependiente a la activación de la vía PI3K y tirosina kinasa, y que además limita el tamaño del infarto incluso al inicio de la reperfusión miocárdica, un momento clínicamente clave en el tratamiento del IAM (Baines et al., 1999). La vía de señalización RISK, que incluye las denominadas quinasas de supervivencia de la vía PI3K/Akt reguladas por la insulina, se ha visto que interviene en la disminución del daño por reperfusión (Hausenloy and Yellon, 2004). Además, la activación de la vía de señalización MAPK se ha

observado que inhibe el daño en el ADN y la apoptosis, por lo que la insulina podría ser también un factor antiapoptótico cardíaco (Li et al., 2008).



**FIGURA 2. Vías de señalización de la insulina y formas de cardioprotección.** CAP indica proteína asociada a Cbl; PI3K, fosfatidil inositol 3 quinasa; RISK, quinasa que interviene en evitar daño por reperfusión; MAPK, proteína quinasa activada por mitógeno (Adaptado de Ng et al., 2012).

Con todo esto, la insulina podría participar también en los procesos implicados en una posible paradoja de la obesidad. No obstante, a pesar de estos efectos beneficiosos, en el ámbito clínico el uso de la terapia de insulina como un cardioprotector potencial individual está limitado debido a los riesgos de hipoglucemia que conlleva.

## **6. MODELOS ANIMALES DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

Los modelos animales que imitan las características y la evolución del SCA y del IAM en humanos son indispensables para el estudio de los mecanismos fisiopatológicos causantes de la muerte por IR.

En un modelo animal, la inducción de la patología cardíaca se debe reproducir con características funcionales y estructurales similares al trastorno observado en humanos. En el caso del SCA, lo que se busca reproducir es un estrechamiento crónico u oclusión aguda de las arterias coronarias por la aparición de la placa de ateroma (Libby, 2001). De acuerdo con esto, se han desarrollado diversos métodos aplicados en animales de laboratorio para inducir el estrechamiento u oclusión ateromatosa coronaria (Wilson and Hartroft, 1970; Lee et al., 1971; Bond et al., 1980). Sin embargo, el momento en el que se produce la oclusión coronaria y el lugar exacto mediante el uso de estos métodos experimentales son al azar, lo que supone un factor muy importante no controlado por el investigador. Esta falta de inducibilidad y predicción de la enfermedad también es un problema asociado a algunos modelos de arterioesclerosis o insuficiencia cardíaca basados exclusivamente en la manipulación de determinados genes (Chu et al., 2002). Por contra, la inducción quirúrgica del IAM mediante la oclusión aguda de las arterias coronarias en modelos animales tiene la ventaja de controlar el lugar, el momento y la duración de la oclusión coronaria, así como de la reperfusión según el criterio del investigador, haciendo posible la obtención de una mayor reproducibilidad en las variables estudiadas (Klocke et al., 2007).

La ligadura de la arteria coronaria mediante toracotomía y desecación del vaso sanguíneo se llevó a cabo por primera vez en perros para estudiar el fallo cardíaco (Hood et al., 1967). Sin embargo, la mortalidad de este procedimiento fue de más del 50%, los infartos eran pequeños (20% de infarto con respecto al área del VI), era un modelo caro y además controvertido con respecto a la ética animal. La aplicación de este mismo método en cerdos tuvo una mortalidad tan solo del 20%, principalmente debida a episodios de fibrilación ventricular (Rodríguez-Sinovas et al., 2009). A pesar de esta mejora

en la supervivencia, el modelo en cerdos sigue siendo relativamente caro y requiere una infraestructura y manejo considerables, equiparable a la utilizada en un quirófano de humanos.

La inducción del IAM mediante la oclusión coronaria en rata se estableció por primera vez en 1979 (Pfeffer et al., 1979). La mortalidad obtenida en rata es en torno al 10%, aunque puede variar con las diferentes especies. El tamaño del infarto con respecto al AR suele ser del 35-40% y el grado de deterioro de la función ventricular está directamente relacionado con la extensión del miocardio perdido (Hernando et al., 2010). Los costes de mantenimiento y estabulación de las ratas son mucho menores que para animales grandes lo que permite aumentar el número de animales en cada estudio y mejorar el poder estadístico de los resultados. No obstante, una desventaja del uso de las ratas es la limitada disponibilidad de modelos transgénicos o deficientes para un determinado gen, lo que limita considerablemente su uso en investigación cardiológica.

### **6.1. Modelo de isquemia y perfusión miocárdica en ratón**

El ratón es el mamífero mejor estudiado a nivel genético y embrionario. Esto ha permitido la obtención de animales transgénicos con deficiencia o sobreexpresión de un determinado gen, de manera constitutiva o condicional, y afectando a todos los tipos celulares o dirigidos a un tipo celular concreto. Esta característica hace del ratón una herramienta de gran valor en el estudio de la fisiopatología cardíaca y en la identificación de nuevas dianas terapéuticas. Además, los ratones tienen beneficios añadidos como son un coste de estabulación menor que el de las ratas, el desarrollo de técnicas avanzadas para el estudio de la fisiología cardíaca como la tecnología de la conductancia mediante micromanómetros, muy utilizada en los estudios de presión-volumen ventricular, y una menor sensibilidad neurovegetativa comparada con otras especies, incluida la rata (Pacher et al., 2008). Con todo esto, los ratones permiten realizar estudios de IR *in vivo* en un corazón *in situ*, evitando así alejarse de lo que ocurre en humanos como sucede en otros modelos ampliamente utilizados como son el corazón aislado y perfundido en un sistema Langendorff o los cultivos celulares.



A pesar de las ventajas anteriores, los ratones poseen un tamaño muy reducido siendo su corazón aproximadamente 10 veces menor que el de la rata, lo que complica enormemente los procesos quirúrgicos aplicados a la investigación cardíaca. Para el desarrollo de un protocolo de IR miocárdica *in vivo* en ratón es necesario un material quirúrgico específico, un personal experimental con gran habilidad para la microcirugía (la técnica para la correcta visualización de la coronaria y la oclusión temporal de la misma es de gran dificultad) y un quirófano adaptado a la microcirugía, que muchas veces no están disponibles en los laboratorios experimentales.

El primer modelo de IAM en ratón fue descrito por Zolotareva y Kogan en 1978 (Zolotareva and Kogan, 1978). Más adelante, Lloyd H. Michael et al. fueron los primeros en describir un modelo de ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ADA) para inducir un IAM en ratón (Michael et al., 1995). Este grupo identificó que la anatomía de ADA en los ratones es altamente variable dificultando el proceso de oclusión (ver Figura 8, en sección Materiales y Métodos, página 74).

La mortalidad asociada a la inducción del IAM en ratón es muy variable y depende de diversos factores como la edad, el peso del animal y el tipo de cepa transgénica. Muchos de los casos de mortalidad registrados se producen dentro de la hora siguiente a la oclusión coronaria, debido a fibrilaciones ventriculares o a fallo cardíaco severo (Michael et al., 1995). También existe la probabilidad de muerte entre las 24 horas y los 7 días posteriores al IAM a consecuencia de la rotura ventricular, fallo respiratorio como consecuencia del IAM o en raras ocasiones infecciones secundarias al proceso quirúrgico (Yang et al., 2008).

Existen limitaciones inherentes en el estudio de la cardiopatía isquémica y el RVA en modelos de experimentación murinos cuando se comparan con humanos. Estas limitaciones incluyen un contenido de colágeno miocárdico bajo, el pequeño tamaño del VI, lo que resulta en un infarto extenso de la pared libre del VI secundaria a la ligadura de un vaso coronario mayor, y las diferencias en los tipos y contenido de proteínas relacionadas con el RVA, como por ejemplo, las MMPs. Sumado a lo anterior, los potenciales de acción de los cardiomiocitos de ratón se caracterizan por ser breves y carecer de una fase de meseta; la FC en reposo de los roedores es alrededor de 5 veces más

alta que en humanos y la actividad del intercambiador de  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  es menos relevante en roedores que en humanos (Bers, 2002). A pesar de las limitaciones anteriores y gracias a las ventajas que presenta, el ratón es un excelente modelo experimental en cardiología.

# **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**



## **HIPÓTESIS**

La hipótesis de estudio propuesta fue que la muerte de los cardiomiocitos que tiene lugar durante la reperfusión miocárdica se produce principalmente por necrosis, siendo la aportación de la apoptosis no relevante y quedando definido el tamaño del infarto durante las primeras horas de reperfusión, y que un factor de riesgo cardiovascular como es la obesidad puede modificar la susceptibilidad del miocardio al daño por isquemia y reperfusión mediante cambios en la expresión y síntesis de citoquinas y adipoquinas.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo experimental ha sido someter a prueba las hipótesis planteadas en un modelo *in vivo* murino de isquemia y reperfusión miocárdica desarrollado previamente. Los objetivos específicos fueron:

1. Caracterizar la evolución del tamaño del infarto en función del tiempo de reperfusión en ratones sometidos a 45 minutos de isquemia coronaria.
2. Determinar la contribución de la apoptosis a la extensión final del tamaño del infarto tras la isquemia y reperfusión en un modelo de ratón transgénico con delección cardiospecífica de los genes para las caspasas efectoras 3 y 7.
3. Estudiar la función ventricular y el remodelado ventricular adverso en ratones deficientes para los genes de las caspasas 3 y 7 tras someterlos a un protocolo de isquemia y reperfusión miocárdica.
4. Desarrollar y caracterizar un modelo de ratón con obesidad inducida por dieta alta en grasas sin comorbilidades asociadas.
5. Estudiar la función ventricular y el remodelado ventricular adverso en el modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasas tras un protocolo de isquemia y reperfusión miocárdica.
6. Determinar las cinéticas de producción de citoquinas y adipocinas en la inflamación y el remodelado ventricular adverso tras un protocolo de isquemia y reperfusión en el modelo de obesidad desarrollado.

# **MATERIALES Y MÉTODOS**





# 1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO IN VIVO DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

Todos los protocolos experimentales fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal (CEEA, Num. Regis. 18/10) del VHIR. Todo el proceso experimental se ha llevado a cabo en el Estabulario del VHIR (HUVH, España). Estas instalaciones cumplen las normas de factores ambientales y nutrición siguiendo las recomendaciones de la *Federation of European Laboratory Animal Science Associations* (FELASA) y del CEEA.

## 1.1. Animales

Los animales de experimentación utilizados fueron ratones, tanto machos como hembras, de las cepas C57BL/6NCrl y CD1 White (ICR, albinos). En todos los casos los animales tuvieron una edad comprendida entre 8-12 semanas y 25-30 g de peso. Los animales fueron comprados a Harlan Ibérica, España. Antes de someterlos al procedimiento quirúrgico fueron aclimatados durante 1 semana en las salas del estabulario del VHIR controlando la temperatura ( $22 \pm 2$  °C), la humedad ( $55 \pm 10\%$ ) y aplicando un ciclo de luz-oscuridad de 12 horas (encendido de luces a las 08:00 horas AM). Antes y después de la cirugía los animales recibieron una dieta de pellets comerciales y agua *ad libitum*.

## 1.2. Protocolo experimental

Para el desarrollo y puesta en funcionamiento del modelo murino de IR miocárdica *in vivo* los ratones C57BL/6NCrl y CD1 White se dividieron en dos grupos: ratones sometidos al estrés quirúrgico pero sin oclusión transitoria de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (ADA) (ratones *Sham*) y ratones sometidos al protocolo de IR por oclusión transitoria de ADA (ratones IR). Los ratones IR se subdividieron según el periodo de reperusión en 4 grupos: ratones sometidos a una reperusión de 2 horas (IR 2h), de 24 horas (IR 24h), de 7 días (IR 7d) y de 28 días (IR 28d) (Figura 3).



**FIGURA 3. Protocolos experimentales utilizados en el desarrollo del trabajo experimental.** A se corresponde con el período de anestesia y T se corresponde con la fase de apertura de tórax.

### 1.3. Anestesia y ventilación

#### 1.3.1. Anestesia

Tanto en la inducción como en el mantenimiento de la anestesia se utilizó isoflurano (Forane, Abbott Laboratories, Alemania) en una concentración del 5% en la fase de inducción y del 2% durante el proceso quirúrgico. El isoflurano fue vaporizado en una mezcla con O<sub>2</sub> y saturado con 32-36% de O<sub>2</sub> en el aire inspirado (FiO<sub>2</sub>) a un flujo constante de 1L/min (Szczesny et al., 2004). Para ello, se colocó al animal en una cámara de inducción de metacrilato conectada directamente con el tubo comunicado con el vaporizador (Cyprane Tec3, Reino Unido), posibilitando la inducción de la anestesia en 15-30 segundos. Una vez dormido el animal y tras su intubación, se disminuyó la concentración de isoflurano hasta el 2-3% manteniendo así una adecuada profundidad de la anestesia, consistente en: ausencia de movimientos del animal, ausencia de respuesta al estímulo quirúrgico y por último, presión arterial (Pa), frecuencia cardíaca (FC) y frecuencia respiratoria (FR) estables.

Una vez que el animal fue anestesiado, con la finalidad de evitar pérdidas extremas de agua y electrolitos, se aplicó fluidoterapia mediante la administración de NaCl al 0,9% (Meinsol, Fresenius Kabi España) en cantidades ajustadas según su peso corporal. Basándonos en el criterio establecido para la hidratación de prematuros extremos, en condiciones de

ayuno (precirugía) se le suministraron 0,04 mL/10 g/h de NaCl al 0,9% vía subcutánea (SC), mientras que durante la cirugía se le suministraron 0,1 mL/10 g/h (Modi, 2004). A partir del momento en el que se anestesia al animal, se debe controlar la temperatura de forma precisa para que se mantenga a  $37\pm 0,5$  °C ya que se ha demostrado que la baja temperatura es cardioprotectora (Eckle et al., 2006). Para ello, se utilizó una manta eléctrica con sonda rectal acoplada (HB 101/2, Harvard Apparatus, Estados Unidos) sobre la que se colocó el roedor anestesiado y una lámpara de infrarrojos (Beurer, Alemania) colocada a 45 cm de la parte caudal del animal. Además, se mantuvo un control de la temperatura de la sala de cirugía estableciéndose en un valor constante de  $26\pm 1$  °C.

### **1.3.2. Intubación y ventilación**

Cuando el animal ya anestesiado perdió el reflejo de consciencia, se procedió a la intubación mediante el uso de un kit Hallowell de intubación para roedores (Hallowell EMC, USA) y un soporte de madera. La cánula de intubación utilizada fue un catéter radiopaco 20 G (ABBOCATH-T, Hospira, Estados Unidos) con la punta biselada y cortado para conseguir una longitud final de 2,5 cm (Tarnavski et al., 2004). El procedimiento utilizado para el proceso de intubación se basó en el desarrollado por Robert H. Brown y Berul C. I. (Berul et al., 1996; Brown et al., 1999). Se colocó al animal en el soporte inclinado de madera en posición decúbito dorsal fijado a la tabla mediante una goma elástica colocada en los incisivos superiores y se aplicó una luz en la parte central del cuello para visualizar por transiluminación los pliegues de la laringe junto con la entrada de la tráquea. Después de apartar la lengua con una pinza atraumática, se introdujo la cánula 20 G por la boca con la ayuda de una guía de metal incorporada en el kit de intubación. En este paso se debe tener especial cuidado de no tocar la glotis durante el proceso de intubación con el fin de evitar un edema o la excesiva secreción de moco que dificulte la respiración del roedor y la intubación. Una vez introducida la cánula, para comprobar que entró de forma correcta, se tapó la abertura de esta y se observó si se producía un cambio en el patrón respiratorio del roedor. Comprobado esto, se aplicó en los ojos del ratón una solución methocel 2%

(Omnivisión Pharma, Italia) para evitar el desecamiento durante la cirugía y se procedió a la ventilación mecánica controlada (VMC) del animal.

En la VMC de nuestros animales se utilizó un ventilador mecánico para roedores (Inspira asv, Harvard Apparatus, Estados Unidos) con un modo de seguridad interno mediante el cual, una vez que introducimos el peso del animal, se calculan automáticamente los parámetros respiratorios óptimos en base a las siguientes ecuaciones: el volumen tidal ( $V_t$ , en L), que se corresponde con el volumen máximo de aire que entra en los pulmones en cada inspiración, y se determina a partir de la ecuación  $0,0062 \times Mb^{1,01}$ , donde Mb es el peso del individuo en Kg (Tabla 1); Y la frecuencia respiratoria (FR, en  $\text{min}^{-1}$ ), que se calcula en base a la ecuación  $53,5 \times Mb^{-0,26}$ . Se aplicó una presión positiva al final de la expiración (PEEP) de 3 mbar (3 cm de  $\text{H}_2\text{O}$ ) y se suministró  $\text{O}_2$  al 100% con un flujo de 1 L/min durante todo el período en el que el animal permaneció con el tórax abierto (Schwarte et al., 2000). El I/E *ratio*, o tiempo que dura cada ciclo respiratorio fue del 50% (1:1). Como conector entre la cánula de intubación y el ventilador se utilizó una llave en “Y” de 2 vías con un espacio muerto de 2,5 cm aproximadamente. Los tubos de conexión entre el ventilador y la llave en Y pueden ser de tamaño variable. Sin embargo, el espacio muerto (unión de la conexión en Y a la cánula de intubación) debe ser mínimo, ya que en el espacio muerto no se produce intercambio de gases. De forma general, el animal sólo recibe un 70% del  $V_t$  calculado y soporta un espacio muerto no superior al 30%. Si este espacio muerto es mayor, se puede producir una hipoxia que llevaría a una ventilación apnéica pudiendo provocar la muerte por afixia del animal.

**TABLA 1. Parámetros respiratorios aplicados en función del peso del ratón (20-60 g)**

Peso (g)	$V_t$ (mL)	FR (Respiraciones $\times \text{min}^{-1}$ )
20	0,12	148
25	0,15	141
30	0,18	134
35	0,21	128
40	0,24	124
45	0,27	120
50	0,30	117
55	0,33	114
60	0,36	111

$V_t$ , volumen tidal

FR, frecuencia respiratoria.

Cálculos obtenidos automáticamente mediante el ventilador mecánico para roedores (Inspira asv, Harvard Apparatus)

### 1.3.3. Gasometría

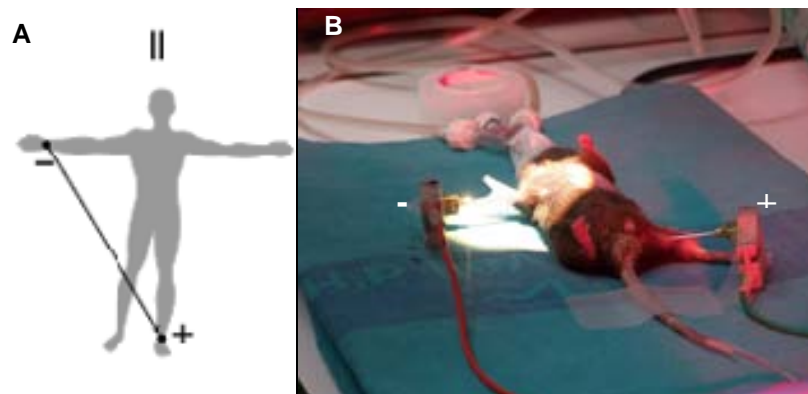
Se realizaron gasometrías de sangre arterial en ratón para controlar los parámetros bioquímicos o gaseosos que pudieran verse afectados por el proceso anestésico y la VMC. Para ello, se utilizaron tubos capilares para recogida de sangre con un volumen aproximado de 140  $\mu\text{L}$  (Multicap Siemens, Estados Unidos), pulgas de mezclado para uso con tubos capilares para gasometría sanguínea (Siemens, Estados Unidos), tapones capilares para tubos capilares de un volumen aproximado de 140  $\mu\text{L}$  (Capillary Caps Siemens, Estados Unidos), hielo y un gasómetro Rapidsystems (Siemens, Estados Unidos) proporcionado por los Laboratorios Clínicos del Hospital Universitario Vall d'Hebron (HUVH, España).

La volemia de un ratón está en torno a 76-80 mL/Kg (Hoff, 2000). La cantidad máxima de sangre que se puede extraer se corresponde con el 10% de la volemia del roedor. Además, en el caso de requerir extracciones repetidas de sangre para varias gasometrías sólo podríamos disponer de 0,5-0,8 mL/Kg de sangre cada 24 horas, reemplazando siempre el volumen extraído por NaCl al 0,9% vía SC. Un ratón de 30 g tiene aproximadamente una volemia de 1,75 mL. Como el volumen de sangre máximo que se puede extraer es del 10% de la volemia, sólo podríamos obtener 0,175 mL de sangre de un ratón con ese peso corporal. En base a estas consideraciones, una vez canulada la arteria carótida del ratón como se explica más adelante en el apartado 1.5, se extrajeron aproximadamente 140  $\mu\text{L}$  de sangre arterial a través de la arteria carótida del roedor depositándolos en el tubo capilar previamente cerrado por un extremo con un tapón capilar. Seguidamente se introdujo una pulga de mezclado en el capilar y se cerró el extremo aun libre. Colocando el capilar en hielo, se mantuvo la agitación de la pulga mediante un imán hasta llegar al gasómetro en el que se realizó la prueba. Cada gasometría nos proporcionó valores de pH,  $\text{pCO}_2$ ,  $\text{pO}_2$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Cl}^-$ .

### 1.4. Monitorización del animal

La monitorización de los animales durante el protocolo quirúrgico tiene como finalidad conseguir mantener unos parámetros fisiológicos estables durante el tiempo de duración del proceso y conseguir la reproducibilidad del

procedimiento experimental. Durante todo el protocolo experimental se llevó a cabo un registro del electrocardiograma (ECG) del animal obteniéndose el ciclo cardíaco y la FC. Para ello se utilizó un sistema de adquisición de datos biológicos Powerlab (ADInstruments, Estados Unidos) constituido por los siguientes elementos: el programa informático LabChart 7 (ADInstruments, Estados Unidos), las unidades externas Powerlab/8SP y Animal Bioamp ML136 junto con tres electrodos de aguja monopolares colocados de forma SC. Los electrodos transportan la señal desde el animal hasta la unidad Animal Bioamp ML136 (amplificador para el ECG) y esta finalmente al ordenador. Los electrodos se colocaron en derivación II utilizando una toma de tierra colocada en la extremidad inferior libre (Figura 4).



**FIGURA 4.** **A**, Esquema de ECG en derivación II, donde se coloca el electrodo positivo en la extremidad inferior y el negativo en la extremidad superior contraria. **B**, ratón durante la cirugía con derivación II.

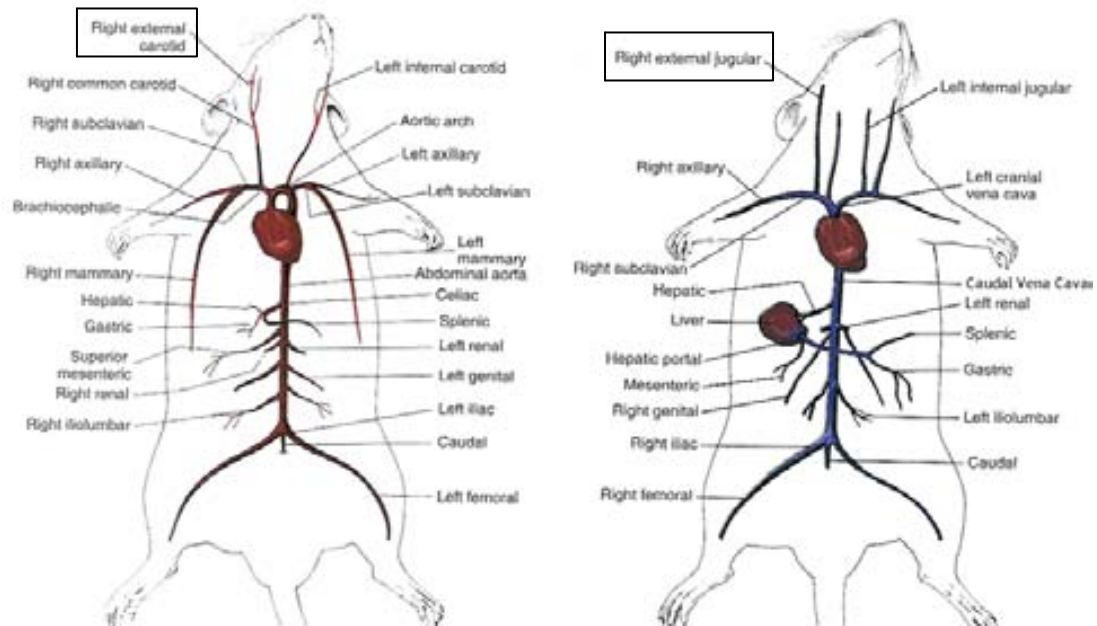
El ECG del ratón muestra una onda P y un complejo QRS similares a los humanos, sin embargo, la fase de repolarización ventricular del ECG de ratón (la onda T en humanos) presenta diferencias con respecto a la humana (Liu et al., 2004) (Figura 5). El software que se ha utilizado se diseñó para el registro del ECG en humanos por lo que se denomina a la onda que sigue inmediatamente el complejo QRS la onda T de acuerdo con este software. Sin embargo, en ratones esta onda T se corresponde con la repolarización ventricular temprana, por lo que debería denominarse onda J (Liu et al., 2004).



**FIGURA 5. Registro electrocardiográfico a través del software Labchart 7 (ADInstruments, Estados Unidos).** P, onda de despolarización que se propaga desde el nódulo seno-auricular a través de las aurículas; complejo QRS, despolarización ventricular; segmento ST, periodo isoeléctrico con ventrículo totalmente despolarizado; T, repolarización ventricular.

## 1.5. Canulación de vasos sanguíneos

Se ha puesto a punto el procedimiento de canulación de la arteria carótida derecha y de la vena yugular derecha (Figura 6). En el primer caso, la finalidad de la canulación es poder realizar medidas de Pa mediante la utilización de un catéter intraventricular de presión-volumen (catéter P-V) (Millar Instruments Inc., Estados Unidos), además de posibilitar la extracción de muestras de sangre arterial para diferentes estudios. En el segundo caso, la canulación permite la infusión de fármacos o fluidos específicos de acuerdo con el protocolo escogido en cada proceso experimental. El procedimiento de canulación fue el mismo para ambos vasos sanguíneos. El ratón, ya anestesiado e intubado, se situó hacia el operador en posición decúbito dorsal. Se utilizó una técnica de disección roma usando unas tijeras quirúrgicas para microdissección. Una vez retirada la piel, se procedió a la separación de las diferentes capas de tejido conectivo y muscular hasta llegar al vaso de interés. Para el caso de la arteria carótida y como ejemplo de canulación, mediante unas pinzas para microcirugía se aisló primero el nervio vago con especial cuidado de no dañarlo, para a continuación limpiar el vaso de tejido conectivo. Se utilizó un hilo de sutura de seda de calibre 5-0 (Syneture, Estados Unidos) para llevar a cabo la oclusión del vaso sanguíneo en el extremo craneal y para sujetar en el extremo torácico el catéter correspondiente (Figura 7).



**FIGURA 6. Arteria carótida y vena yugular derechas en roedores.** (Fuente: [http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat\\_circulatory.html](http://www.biologycorner.com/bio3/anatomy/rat_circulatory.html))

La cánula o catéter PE-10 fue previamente llenado con solución salina heparinizada (Heparina sódica, 200 UI/Kg, Chiesi, Italia). Con unas tijeras iris para microdissección se llevó a cabo una incisión en la zona media del vaso aislado y se introdujo con la ayuda de las pinzas para microdissección la punta biselada de la cánula correspondiente. Una vez que la cánula se insertó 0,7 cm en el vaso sanguíneo, se fijó haciendo un nudo simple con el hilo de sutura.



**FIGURA 7. Canulación de la vena yugular.** **A**, aislamiento del vaso. **B**, corte mediante tijeras iris para microcirugía. **C**, introducción del catéter PE-10 y fijación del mismo.

## 1.6. Procedimiento quirúrgico

Todo el instrumental quirúrgico utilizado en el protocolo se describe en el apéndice final. Los procedimientos quirúrgicos se llevaron a cabo con la ayuda

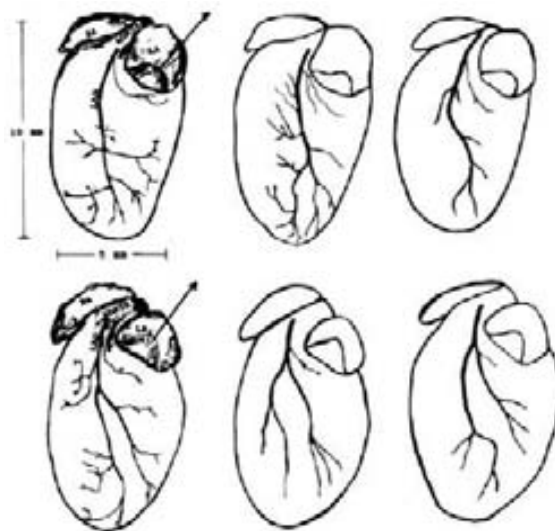


de una lente quirúrgica (estéreo microscopio M651, Leica, Alemania). Una vez que se monitorizó al animal y se comprobó que sus constantes vitales eran estables se comenzó con la cirugía torácica. La finalidad de este proceso fue llevar a cabo una oclusión reversible de ADA y conseguir así el IAM. Previamente a la apertura de tórax se administró vía intraperitoneal (IP) heparina sódica diluida en NaCl al 0,9% (200 UI/Kg). Con esto se minimizó la formación de coágulos en las arterias coronarias y se permitió la completa perfusión miocárdica después de liberar el punto ocluyente.

El procedimiento quirúrgico se ha basado en el modelo de IR miocárdica realizado en rata en nuestro laboratorio y en diferentes modelos descritos en la literatura (Michael et al., 1995; Tarnavski et al., 2004; Eckle et al., 2006; Redel et al., 2008; Hernando et al., 2010). Se colocó al animal en posición supina ligeramente lateralizado, se fijó con cinta micropore (3M, Estados Unidos) a la tala quirúrgica situada sobre la manta eléctrica y se desinfectó la zona expuesta a la cirugía con alcohol de 96°. La apertura de tórax se realizó mediante una técnica de disección roma utilizando unas tijeras quirúrgicas para microdisección y un fórceps. Se llevó a cabo una minitoracotomía izquierda a la altura del cuarto espacio intercostal y una vez abierto el tórax, se separaron las costillas con la ayuda de un retractor para microcirugía. El cuarto espacio intercostal se identifica por un pequeño vaso que nutre el músculo pectoral menor originado en esa zona y por el espacio entre el lóbulo inferior y el lóbulo superior del pulmón izquierdo. En este punto se debe tener especial cuidado de no dañar los pulmones del animal y la parte superior del esternón, donde se encuentra la confluencia de las venas bilaterales largas. Seguidamente se eliminó parte del pericardio con la ayuda de una minitórula quirúrgica y se procedió a localizar ADA.

La identificación de ADA es probablemente el paso más crítico y de mayor dificultad en el abordaje quirúrgico, ya que las arterias coronarias en ratón discurren por la parte interna del miocardio y no a lo largo de la superficie epicárdica. A partir de la aorta se originan la arteria coronaria descendente derecha y ADA (Icardo and Colvee, 2001; Kumar et al., 2005). La ADA sigue principalmente dos patrones anatómicos: un primer patrón en el que la arteria transcurre hacia el ápex cardíaco como un único vaso principal del que nacen ramas de tamaño variable y apareciendo estas, en muchos casos, en posición

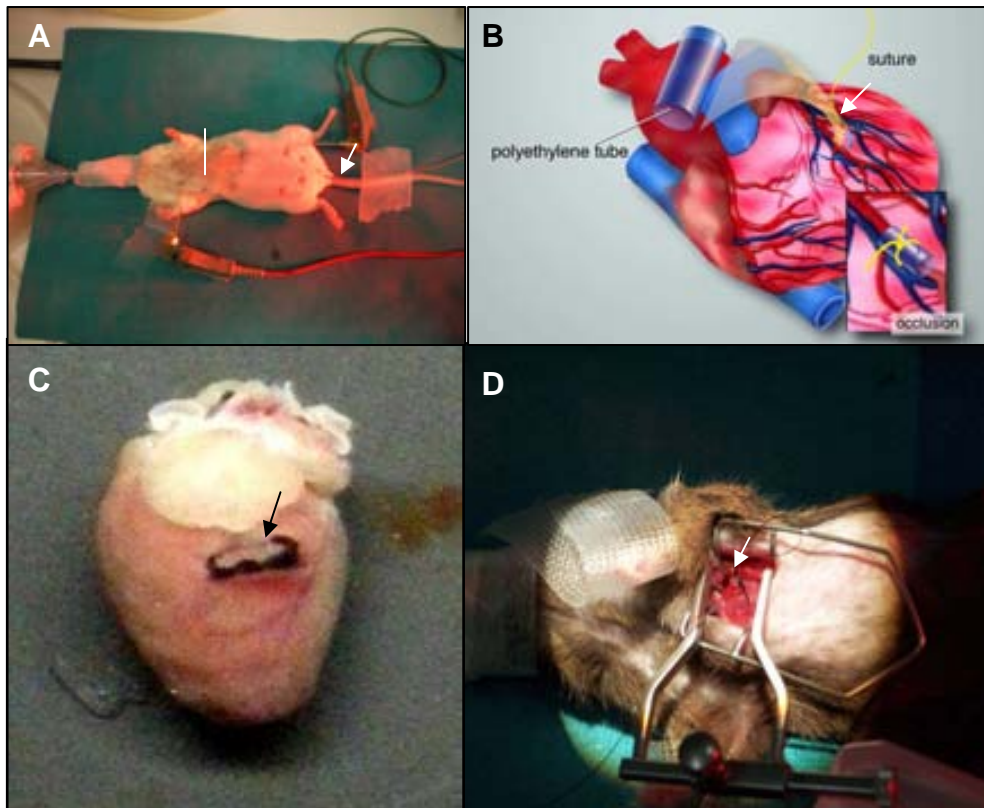
horizontal con respecto a la rama principal; y un segundo patrón en el que ADA se bifurca en dos ramas principales que discurren hacia el ápex (Figura 8): Como el color de las arterias coronarias es similar al color del músculo cardíaco, la identificación de ADA sin manipulación es una etapa del protocolo de gran dificultad. Si no es posible identificar ADA mediante una fuente de luz modificable en intensidad, se puede aplicar una suave presión en el ápex cardíaco utilizando una minitórula. Esta maniobra provoca una palidez del miocardio aumentando el contraste entre el tejido y los vasos sanguíneos, entre ellos ADA (Eckle et al., 2006).



**FIGURA 8. Esquema de la anatomía de las arterias coronarias de ratón.** Los tres corazones superiores muestran un patrón común en el que ADA desciende hacia el apex como un único vaso principal. Los tres corazones inferiores muestran otro patrón en el que ADA se bifurca en dos ramas principales y desciende hacia el apex (Michael et al., 1995).

Una vez que se localizó ADA, se llevó a cabo el proceso de oclusión con el fin de obtener la isquemia transitoria deseada. Mediante el uso de un portaguja para microcirugía e hilo de sutura de seda 6-0 con aguja BV-1 atraumática (Ethicon, Jhonson & Jhonson. Estados Unidos) se pasó un punto de oclusión aproximadamente a 2-3 mm del vértice de la aurícula izquierda cuando esta se encuentra en su posición normal (Tarnavski et al., 2004). Finalizado el paso del punto de oclusión, se llevó a cabo un nudo doble y se acercó lo máximo posible al corazón, para seguidamente introducir un tubo de

polietileno PE-50 de 3-4 mm de longitud a modo de tubo ocluidor y protector del miocardio evitando con esto la rotura del músculo cardíaco (Figura 9, B y C).



**FIGURA 9.** **A**, ratón ventilado antes de comenzar el proceso quirúrgico. La línea muestra aproximadamente la zona anatómica donde se encuentra el 4º espacio intercostal. La flecha señala la sonda rectal de control de temperatura. **B**, oclusión de ADA con la ayuda de un tubo de polietileno PE-50. El punto de oclusión transitoria (marcado por la flecha) se llevó a cabo con hilo de sutura de seda de calibre 6-0 (en color amarillo) (Klocke R et al. 2007). **C**, punto de oclusión (flecha) situado a 2-3 mm de la punta de la aurícula izquierda en su posición normal. **D**, colocación del tubo PE-50 (flecha) y el nudo corredizo que lo fija a la zona donde se ocluye ADA.

Seguidamente, se apretó el nudo con la consiguiente oclusión de ADA y se efectuó un nudo corredizo para, por una parte fijar el nudo doble al tubo ocluidor, y por otra posibilitar que la oclusión fuera transitoria (Figura 9, D). El comienzo de la isquemia se verificó en el ECG donde se observó una elevación del segmento ST a los pocos segundos de la oclusión coronaria (Redel et al., 2008). Durante el tiempo que duró la isquemia se cubrió el tórax abierto del animal con una gasa quirúrgica empapada en NaCl al 0,9% a 37 °C.

Para dar paso al periodo de reperfusión se liberó el nudo corredizo efectuado anteriormente y se extrajo el tubo ocluidor PE-50 restaurándose así el

flujo coronario. En la reperfusión se observó un descenso progresivo del segmento ST corroborando la correcta reanudación del flujo coronario. Al finalizar la oclusión transitoria y comenzar la reperfusión se cerró el tórax del animal con el fin de evitar pérdidas de agua, electrolitos y de restaurar la presión negativa intratorácica. Utilizando un hilo de sutura de seda 6-0 (Aragon, España) se pasó un punto intercostal fijándolo con un nudo triple y se dejó una longitud determinada del hilo de seda utilizado para la oclusión en la cavidad torácica. Al mismo tiempo que se apretaba el nudo triple, se ejerció una ligera presión sobre el tórax y el vientre del animal para eliminar el posible aire residual de la cavidad torácica y evitar un neumotórax. Con la caja torácica ya cerrada se suturaron las capas musculares y la piel mediante una sutura discontinua. El resto del hilo 6-0 de seda usado en la oclusión coronaria se colocó entre la caja torácica y la piel. Al finalizar la sutura se desinfectó la zona con alcohol de 96°.

Ya con el animal suturado se cambió el ventilador a modo de ventilación asistida para agilizar la extubación progresiva. Mediante este modo, el ventilador detecta cuando la FR del animal es mayor que la establecida en base a su peso corporal, lo que indica que está despertándose y por lo tanto se pueden llevar a cabo intentos de desconexión de la VMC. Además, en este momento se mezcló en la ventilación un 50% O<sub>2</sub> con un 50% de aire ambiental. Con todo esto se consiguió que el animal respirase de forma independiente siendo posible la desconexión del ventilador y la extubación. Durante el tiempo transcurrido hasta la extubación del animal se mantuvo un control de la temperatura y del ECG.

## **1.7. Cuidados y tratamientos postquirúrgicos**

En el momento en el que el animal rechazó la cánula de intubación y comenzó a respirar de forma independiente se le colocó aislado en una jaula previamente calentada con una manta eléctrica para evitar contaminación en la zona quirúrgica o daño causado por otros animales. Con el fin de impedir que el animal aspirara de forma accidental la viruta de la jaula se colocó una toalla de papel entre éste y la viruta durante el tiempo de recuperación. Además, se le suministró oxígeno hasta que comenzó a moverse y a respirar con normalidad. Se sometió al animal a tratamiento antibiótico profiláctico

suministrando una única dosis de cefazolina (Tasep, IPS Farma, España) vía SC, a una concentración de 80 mg/Kg. Además, se efectuó un tratamiento analgésico con buprenorfina hidrocloreto (Buprex, Merck & Co. Inc., Estados Unidos) vía SC, a una concentración de 0,01 mg/Kg cada 8 horas y durante las 48 horas siguientes al fin del protocolo quirúrgico (Borst et al., 2011).

### **1.8. Cálculo del edema tisular**

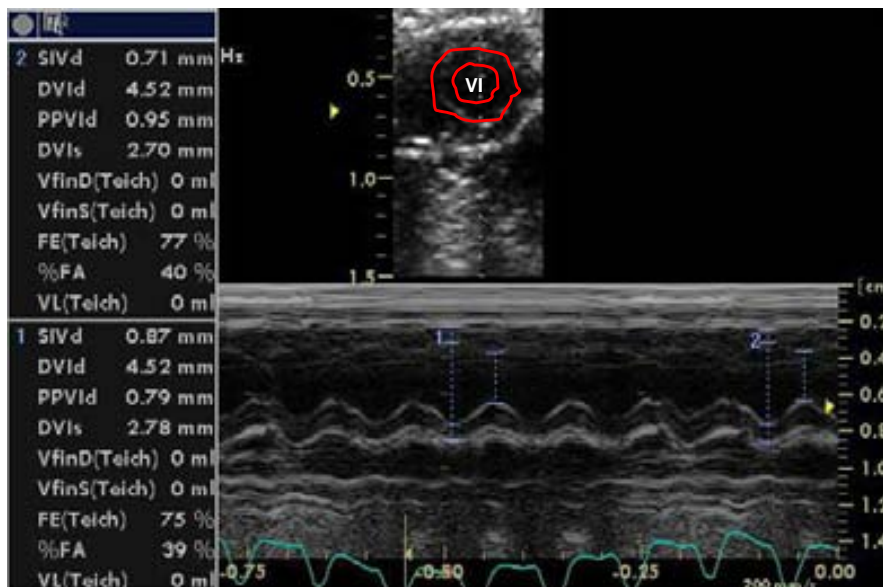
Se calculó el edema en el tejido pulmonar y en el tejido cardíaco. En ambos casos el procedimiento fue el mismo. En el procesado del animal (ver apartado 1.10.1, página 78) se extrajeron tanto los pulmones como el corazón. Un fragmento de pulmón y una de las lonchas de corazón obtenidas se pesaron en balanza de precisión y se colocaron en una estufa (Selecta, España) a 100 °C durante 12 horas. Una vez que se obtuvieron estos datos, el cálculo del edema tisular se llevó a cabo de la siguiente forma:  $(\text{Peso del tejido húmedo} - \text{Peso del tejido seco} / \text{Peso del tejido seco}) \times 100$ , obteniendo como resultado mL de agua por cada 100 mg de tejido seco.

### **1.9. Estudio ecocardiográfico**

La ecocardiografía es una técnica no invasiva muy eficaz para caracterizar la función ventricular en un animal de forma seriada.

Se llevó a cabo un estudio ecocardiográfico con la finalidad de obtener medidas ecocardiográficas basales, de forma periódica cada mes, en precirugía, a los 7 días de reperfusión y a los 28 días de reperfusión, según el protocolo experimental escogido. Se utilizó un aparato para ecocardiografía VIVID Q (General Electric, Estados Unidos) con una sonda lineal i12L-RS de 12 MHz. Se suministró a los animales una dosis anestésica de inducción de isoflurano al 4% y se mantuvieron bajo una ligera dosis de isoflurano (0,5%) durante el protocolo ecocardiográfico con el fin de mantener la respiración espontánea. Se afeitó el pecho del animal y se colocó ligeramente lateralizado hacia la izquierda. Se llevó a cabo la monitorización de la temperatura y el ECG en derivación 2 como ya se ha explicado anteriormente. Se obtuvieron imágenes en dos dimensiones en el eje corto paraexternal a nivel de los músculos papilares (Gao et al., 2000) (Figura 10). Se midieron digitalmente en modo M y haciendo una media de al menos 3 ciclos cardíacos los parámetros

siguientes: el grosor del septum intraventricular diastólico (SVId), el diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo (DVId), el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (PPVId) y el diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo (DVIs). Con estos datos se calcularon la fracción de acortamiento (FA) en porcentaje determinada por la ecuación  $FA = DVId - DVIs / DVId \times 100$ , y la fracción de eyección (FE) en porcentaje dada por la ecuación  $FE = DVId3 - DVIs3 / DVId3 \times 100$ .



**FIGURA 10.** Estudio ecocardiográfico del ventrículo izquierdo (VI) de ratón en modo M en el eje corto paraexternal a nivel medio papilar.

### 1.10. Determinación del tamaño del infarto

En los modelos de IR miocárdica *in vivo*, para conocer la severidad del daño miocárdico tras un IAM es crítico determinar con la mayor exactitud posible el tamaño del infarto. Para ello se debe extraer el corazón del animal y someterlo a un estricto protocolo de procesado que dependerá del tipo de procedimiento experimental escogido: 1) o bien, protocolo experimental de cirugía aguda en el que el tiempo de reperfusión será inferior a 24 horas, 2) o bien protocolo experimental de cirugía crónica con más de 24 horas de reperfusión.

### **1.10.1. Procesado en el procedimiento experimental agudo**

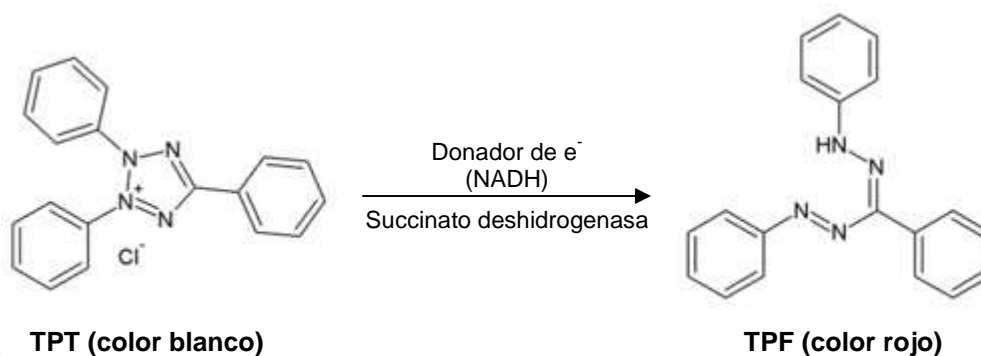
Previamente al anestesiado del animal se prepararon una serie de soluciones necesarias para el protocolo de procesado (Tabla 2). Se preparó una solución de tinción azul de Evans (Sigma-Aldrich, Estados Unidos) al 1% en solución fisiológica con NaCl al 0,9% utilizada para demarcar el área en riesgo (AR) obtenida a causa de la oclusión de ADA. Con este colorante se marca de color azul toda la parte del corazón que no depende de la irrigación de ADA, es decir, la parte no infartada, mientras que la parte correspondiente al AR aparece de color rojo pálido-blanquecino. Se preparó tampón fosfato salino (PBS, Sigma-Aldrich, USA) que se utilizó para la preparación del colorante cloruro de trifeniltetrazolio (TTC, Sigma-Aldrich, Estados Unidos).

El TTC se utilizó para marcar la zona infartada del miocardio. Este compuesto es un indicador redox utilizado para diferenciar entre tejido metabólicamente activo, que aparece coloreado en rojo debido a la reacción de deshidrogenación que sufre el colorante facilitada por la presencia de NADH, y tejido metabólicamente inactivo, que en este caso aparece de color pálido blanquecino debido a la ausencia de coloración a causa de una menor producción de NADH que desemboca en una menor actividad deshidrogenasa (Figura 11). Se preparó una solución de tampón formalina al 10% que se utilizó para remarcar la zona infartada fijando la tinción previa con TTC.

**TABLA 2. Soluciones utilizadas en el procesado del corazón.**

Solución	Procedimiento quirúrgico	Referencia	Composición	Caducidad	Conservación
Azul de Evans	Agudo	Sigma	5% en NaCl al 0,9%	Semanal	4 °C
PBS	Agudo	Sigma	1 pastilla comercial de PBS, 200 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril	Semanal	4 °C
TTC 1%	Agudo	Sigma	1 g TTC, 100 mL PBS	Diaria	4 °C
Formalina tamponada 10%	Agudo		100 mL Formaldehído 40%, 900 mL H <sub>2</sub> O <sub>d</sub> estéril, 4 g NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 6,5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> anhidro	Mensual	Temperatura ambiente
Parafolmaldehído 4%	Agudo y Crónico	y Sigma	25 mL paraformaldehído 16%, 25 mL tampón fosfato 0,4 M, 50 mL, H <sub>2</sub> O <sub>d</sub>	Mensual	4 °C
KHB	Agudo y Crónico	y	En mM: NaCl 140, NaHCO <sub>3</sub> 24, KCl 2,7, KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,4, MgSO <sub>4</sub> 1, CaCl <sub>2</sub> 1,8, glucosa 11	Diaria	4 °C
PSR	Crónico	Sigma	Sirius red F3B, ácido pícrico	3 años	Temperatura ambiente
HE	Crónico	Merck	Hematoxilina de Harris, eosina amarilla	3 años	Temperatura ambiente

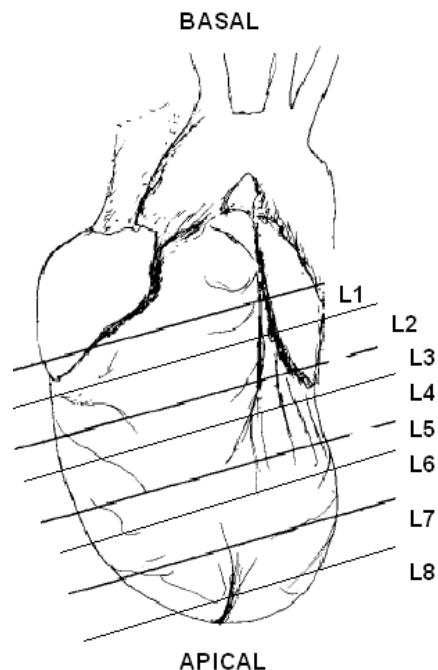
PBS, tampón fosfato salino; TTC, Cloruro de Trifeniltetrazolio; H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>, agua destilada; KHB, tampón de bicarbonato Krebs-Henseleit; PSR, picosirius red; HE, hematoxilina-eosina.



**FIGURA 11. Mecanismo de acción del TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride).** El compuesto de color blanco (TPT, trifeniltetrazolio) es reducido enzimáticamente a TPF (trifenilformazán) de color rojo mediante la acción de varias deshidrogenasas en los tejidos vivos, mientras que se mantiene como TTC blanco en las zonas de necrosis donde estas enzimas se han desnaturalizado, degradado o no disponen de una fuente donadora de e<sup>-</sup> necesaria para la reacción.



Transcurridas 24 horas de reperfusión se anestesió al animal mediante una dosis letal de pentobarbital sódico (100 mg/Kg, Farmacia Carreras, España) vía IP. Con la ayuda de una pinza de disección y unas tijeras de disección, se llevó a cabo una toracotomía, se visualizaron los hilos de sutura utilizados para la oclusión coronaria y se reocluyó ADA. Seguidamente se extrajo el corazón y se retroperfundió en un sistema Langendorff. Brevemente, se trata de un sistema de perfusión de corazón aislado en ratón para limpiar de sangre y fijar el tejido cardíaco. En este modelo, una vez que el corazón es extraído, se conecta al sistema a través de la aorta y se perfunde retrógradamente con un tampón KHB. En nuestro caso, los corazones fueron rápidamente perfundidos con un flujo constante de 2,5 mL/min usando para limpiar el corazón, el tampón KHB equilibrado con 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub> y atemperado a 37 °C, para seguidamente administrar 1 mL del colorante azul de Evans al 5%. En el caso de que la perfusión del colorante sea correcta se observará un área ausente de tinción azul correspondiente a la zona irrigada por ADA y, por lo tanto, considerada AR. Inmediatamente después de administrar el colorante se colocó el corazón en NaCl al 0,9% previamente congelado. Se lavó utilizando una jeringa con aguja 25 G y administrando NaCl al 0,9% a través de los grandes vasos. A continuación, se limpió el corazón eliminando las aurículas y la vena pulmonar, se depositó en un molde de acero (Zivic Labs, Estados Unidos) graduado para realizar cortes de 1 mm de espesor mediante cuchillas de un solo filo. Las lonchas obtenidas se numeraron desde la parte más basal a la parte más apical, de forma que la loncha L1 se correspondería con la parte basal del corazón (Figura 12).



**FIGURA 12. Corte del corazón y distribución de las lonchas obtenidas.** L1 se corresponde con la parte basal del corazón. Cada loncha posee aproximadamente 1 mm de espesor (Ye et al., 1997).

Se introdujeron las lonchas en la solución de TTC al 1% y se incubaron durante 5 minutos en baño con agitación (Grant OLS 200, Reino Unido) a 37 °C en una placa de 6 pocillos. Una vez terminado el período de incubación en TTC se pesaron las lonchas de forma individual en balanza de precisión Precisa 180A (Pacisa, España), se colocaron en PBS y se fotografiaron por ambas caras. Seguidamente se incubaron en tampón formalina al 10% durante 12 horas. Este paso potencia el contraste entre las zonas necróticas y las zonas no necróticas de tejido (Bohl et al., 2009). Finalmente se volvieron a fotografiar como se ha descrito anteriormente y la loncha más representativa del infarto (normalmente la loncha L4 o la L5) se preservó en paraformaldehído al 4% para posteriormente incluirla en parafina y llevar a cabo estudios histológicos.

#### 1.10.1.1. Determinación del Área en Riesgo (AR) y del Área de Infarto (AI)

En los animales sometidos al procedimiento experimental agudo, después de llevar a cabo la coloración con azul de Evans y TTC descrita anteriormente, se identificaron tres zonas claramente delimitadas en las

lonchas: 1) una zona pálida correspondiente al AI, 2) una zona roja correspondiente al AR y 3) una zona azul correspondiente al resto del tejido cardíaco no comprometido por la oclusión. Cada una de las lonchas se midió mediante planimetría utilizando un programa informático (Image-Pro Plus 4.5.0.29, Media Cybernetics, Estados Unidos) y se cuantificaron las áreas de cada loncha por ambas caras. El AI en gramos de cada loncha se calculó de la siguiente manera:  $AI (g) = \text{Área infartada de la loncha} / \text{Área total de la loncha} \times \text{Peso de la loncha (g)}$ . El AR (g) de cada loncha se calculó de la misma manera que el AI (g). El tamaño del infarto o AI del corazón se expresó en porcentaje como tamaño de la necrosis en relación con el AR y se calculó de la siguiente manera:  $AI/AR (\%) = \sum AI \text{ de cada loncha} \times 100 / \sum AR$ .

### **1.10.2. Procesado en el procedimiento experimental crónico**

Para el caso del procesado del corazón en el procedimiento experimental crónico, se utilizó el tampón KHB para lavar los corazones mediante perfusión retrógrada en Langendorff previa a la perfusión de los mismos con paraformaldehído al 4%, esta última con la finalidad de fijar el tejido cardíaco para su posterior inclusión en parafina. Además, se prepararon las tinciones de hematoxilina-eosina (HE) y picrosirius red (PSR) para la cuantificación del tamaño del infarto y del remodelado ventricular.

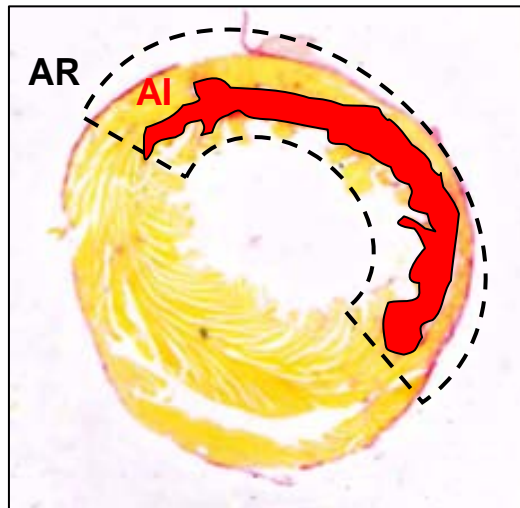
Una vez anestesiado el ratón como se ha descrito anteriormente para el procedimiento agudo, con la ayuda de una pinza de disección y unas tijeras de disección, se llevó a cabo una toracotomía, se extrajo el corazón y se procesó de dos formas diferentes. Un grupo de corazones se introdujo rápidamente en nitrógeno líquido y se preservó a  $- 80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  para futuras determinaciones bioquímicas. El resto de los corazones de animales que completaron el protocolo experimental se depositaron en suero fisiológico (NaCl al 0,9%, Fresenius Kabi, España) previamente enfriado y se sometieron a un sistema Langendorff como se ha descrito anteriormente, salvo que en este caso, para fijar el tejido cardíaco previo a su inclusión en parafina, después de lavar el corazón con KHB, se perfundieron con paraformaldehído al 4%. Al terminar la perfusión, se pesaron y se almacenaron los corazones en tubos con paraformaldehído al 4% durante 24 horas.

#### 1.10.2.1. Preparación del tejido e histología

Los corazones sometidos al protocolo crónico, transcurridas 24 horas en paraformaldehído al 4%, se colocaron en un molde de acero (Zivic Labs, Estados Unidos) graduado para realizar cortes de 1 mm de espesor mediante cuchillas de un solo filo. Las lonchas obtenidas se numeraron desde la parte más basal a la parte más apical como ya se ha descrito. Seguidamente se incluyeron en parafina y se cortaron en el microtomo obteniendo secciones seriadas de 4  $\mu\text{m}$  con un espacio entre cada corte de 200  $\mu\text{m}$ . Una vez que se identificó el área por debajo de la sutura, se desparafinaron las secciones para ser teñidas con hematoxilina-eosina (HE, Merck, Alemania) y picosirus red (PSR, Sigma-Aldrich, Estados Unidos). La HE nos permitió diferenciar los núcleos celulares (en azul-púrpura teñidos por la hematoxilina de carácter catiónico con tinción de estructuras ácidas) del citoplasma celular (en color rosa teñido por la eosina de carácter aniónico con tinción de estructuras con predominio de bases). La tinción con PSR tiñe las fibras de colágeno de color rojo en un fondo amarillo pálido vistas al microscopio de campo claro (Junqueira et al., 1979). Si se examinan las preparaciones a través de un microscopio con polaridad cruzada, las fibras de colágeno grandes aparecen de color amarillo brillante o naranja, y las más delgadas, incluyendo las fibras reticulares, en color verde. De acuerdo con Junqueira et al., el colágeno es altamente birrefringente por lo que debemos rotar las preparaciones para poder detectar todas las fibras.

#### 1.10.2.2. Determinación del Área en Riesgo (AR) y del Área de Infarto (AI)

En los corazones sometidos a 28 días de R (protocolo quirúrgico crónico), el AI en % (parte roja de las secciones correspondiente al colágeno) con respecto al AR en % estimada en base a la transmuralidad del infarto fue calculada como la cantidad de colágeno depositado mediante planimetría utilizando el programa informático Image-Pro Plus (Figura 13) (Lim et al., 2011; Benavides-Vallve et al., 2012). El área ocupada por el infarto se midió en 4 secciones de cada una de las lonchas obtenidas para cada ratón.



**FIGURA 13.** Cálculo del área de infarto en rojo (AI) con respecto al área en riesgo delimitada por la línea discontinua (AR) estimada en base a la transmularidad del infarto.

### 1.11. Eutanasia

El protocolo experimental llegó a su fin una vez que concluyó el período de reperfusión. En ese momento, se extrajo el corazón del animal para procesarlo como se ha descrito anteriormente. En los casos en los que se observaron problemas relacionados con la salud del animal o un sufrimiento intolerable que superara los criterios de punto final establecidos en el modelo experimental presentado ante el CEEA, los animales se sacrificaron con una sobredosis anestésica de pentobarbital sódico vía IP a una concentración de 100 mg/Kg (Farmacia Carreras, España) y una dosis de buprenorfina hidrocloreuro (Buprex, Merck & Co. Inc., Estados Unidos) vía SC, a una concentración de 0,01 mg/Kg.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

Como ya se ha detallado en la introducción de esta tesis, la contribución de la apoptosis al daño por IR es controvertida. Con el objetivo de determinar si la apoptosis participa en la muerte de los cardiomiocitos que tiene lugar tras un episodio de isquemia transitorio, se ha utilizado un nuevo modelo de ratón transgénico con una doble deleción cardioespecífica para los genes de las caspasas efectoras 3 y 7 (Casp3/7), proteasas críticas del proceso apoptótico.

### 2.1. Ratones caspasa3/7<sup>CreNkx2.5/fl</sup>

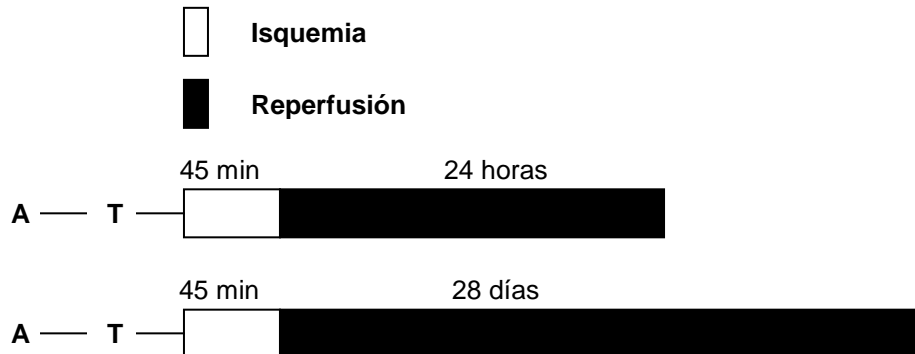
Los ratones caspasa3/7<sup>CreNkx2.5/fl</sup> (Casp3/7) fueron cedidos por el Dr. Daniel Sanchís, perteneciente al Laboratorio de Señalización Celular y Apoptosis del Institut de Recerca Biomèdica de Lleida (España). Todos los animales tuvieron una edad comprendida entre 8-12 semanas y 20-25 g de peso.

Este modelo condicional de ratón proviene del cruce entre una cepa C3C7flox y una cepa Nkx2-5Cre específica de corazón. Los animales C3C7flox se han obtenido del cruce entre una cepa C57BL/6 deficiente para el gen de la caspasa 3 con una cepa C57BL/6 deficiente para el gen de la caspasa 7. El gen Nkx2-5 codifica el *homeobox-containing transcription factor* implicado en el desarrollo del miocardio y se usa como un marcador cardíaco específico en los embriones de vertebrados. Se utilizó como un locus genético para condicionar la expresión del gen de la recombinasa Cre en el miocardio, obteniéndose la cepa Nkx2-5Cre. Los ratones Caspasa3/7<sup>CreNkx2.5/fl</sup> son animales con una doble deleción cardioespecífica para las caspasas 3 y 7, y la eficacia de la doble deleción ha sido comprobada por el grupo experimental del Dr. Daniel Sanchís.

### 2.2. Protocolo experimental

En la figura 14 se detallan los dos protocolos experimentales a los que se sometieron los ratones Casp3/7 y sus respectivos controles (WT). En un primer protocolo (protocolo agudo), tras 45 minutos de oclusión coronaria

transitoria, los animales se reperfundieron durante 24 horas (IR 24h). En un segundo protocolo (protocolo crónico), tras 45 minutos de isquemia coronaria transitoria, los ratones fueron sometidos a 28 días de reperfusión (IR 28d).



**FIGURA 14. Protocolos experimentales utilizados en la caracterización de la muerte celular por IR miocárdica *in vivo* en ratón.** A se corresponde con el período de anestesia y T se corresponde con la fase de apertura de tórax.

### 2.3. Protocolo quirúrgico agudo

A los animales sometidos al protocolo quirúrgico agudo, se les realizó una ecocardiografía tras 24 horas de reperfusión siguiendo los criterios explicados anteriormente en materiales y métodos.

Tras finalizar el período de reperfusión se extrajeron los corazones, se tiñeron con azul de Evans y con TTC, y se determinó el AI con respecto al AR en % como ya se ha explicado anteriormente.

### 2.4. Protocolo quirúrgico crónico

A los animales que siguieron el protocolo quirúrgico crónico, se les realizó un estudio ecocardiográfico basal (antes de cirugía) y tras 28 días de reperfusión.

Tras finalizar el período de reperfusión, se extrajeron los corazones, se incluyeron en parafina, se cortaron en el microtomo obteniendo secciones seriadas de 4  $\mu\text{m}$  y se tiñeron con PSR como se ha explicado anteriormente. Con las tinciones ya realizadas se determinó el AI en % (parte roja de las secciones correspondiente al colágeno) con respecto al AR en % estimada en base a la transmuralidad del infarto.

### **3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

La obesidad es un factor de riesgo asociado a la cardiopatía isquémica y está estrechamente relacionada con la aparición de los principales factores de riesgo en la arterioesclerosis (hipertensión, hiperlipidemia y DM-2). Esta relación provoca que la obesidad se encuentre siempre asociada a comorbilidades que pueden enmascarar sus verdaderos efectos sobre el IAM.

Como ya se ha explicado anteriormente, se ha sugerido un efecto paradójico de la obesidad por el que los individuos obesos presentan una mejor prognosis tras un IAM que los individuos de peso normal. Este fenómeno es muy controvertido y no se conocen los factores que lo determinan. La obesidad desencadena un estado inflamatorio crónico leve con la alteración en la producción de factores proinflamatorios como la IL-6, el TNF- $\alpha$  o MCP-1, o la modificación en la expresión de adipoquinas como la leptina, resistina o adiponectina. Estas alteraciones podrían modificar la resistencia del miocardio al insulto isquémico.

Con el objetivo de determinar si la obesidad modifica la tolerancia del miocardio al daño por IR, se ha utilizado un modelo de ratón BDF1 con obesidad inducida por dieta HFD y sin el efecto de otras comorbilidades, sometido a un protocolo de 45 minutos de oclusión coronaria seguidos de 28 días de reperfusión. Los resultados obtenidos se han correlacionado con los niveles de citoquinas y adipoquinas.

#### **3.1. Animales, dieta y seguimiento en el tiempo**

##### **3.1.1. Animales**

Los animales de experimentación utilizados fueron ratones pertenecientes a la cepa BDF1. Esta cepa proviene de la F1 de un cruce entre la cepa C57BL/6, la cual puede desarrollar una obesidad inducida relacionada con resistencia a la insulina; y la cepa DBA-2, en la que aparece una disfunción de la célula beta pancreática con la consiguiente disminución en la secreción de insulina (Karasawa et al., 2009). Los ratones BDF1 desarrollan obesidad



relacionada con resistencia a la insulina mediante una dieta alta en grasas (Karasawa et al., 2009).

Los animales fueron adquiridos a Charles River, España, con 18-20 g de peso y aclimatados en las salas del estabulario como ya se ha descrito anteriormente.

### 3.1.2. Dieta

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron dos tipos de dieta. Por un lado, la dieta 2018 (Harlan, Estados Unidos) que fue usada como dieta estándar (CONTROL) con un promedio de calorías procedentes de proteínas, grasas y carbohidratos de 24:18:58 respectivamente y un contenido calórico de 3,27 Kcal/g. Por otro lado, la dieta D12492 (Research Diets, Estados Unidos), una dieta alta en grasas (HFD) utilizada para desarrollar la obesidad con un promedio de calorías procedentes de proteínas, grasas y carbohidratos de 20:60:20 respectivamente y un contenido calórico de 5,24 Kcal/g (Tabla 3).

Una vez que los animales se aclimataron durante una semana a las instalaciones del estabulario dio comienzo la alimentación. Los ratones se dividieron en dos grupos, ratones control y ratones HFD. El desarrollo de obesidad fue seguido cada mes mediante el control del peso y la determinación de la glucosa circulante. A los 6 meses de alimentación se realizó el protocolo quirúrgico.

**TABLA 3. Composición y características energéticas de las dieta estándar (CONTROL) y la dieta de alto contenido en grasas (HFD)**

	CONTROL	HFD
<i>Proteínas totales (g%)</i>	18,9	26,2
<i>Carbohidratos totales (g%)</i>	53,33	26,3
<i>Grasas totales (g%)</i>	5,70	34,9
<i>Características energéticas</i>		
<i>Energía total (Kcal/g)</i>	3,27	5,24

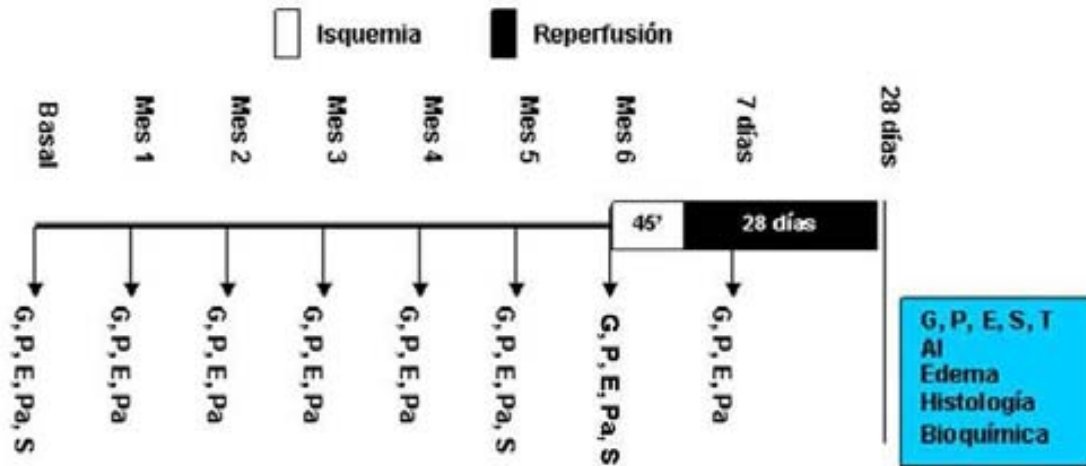
### 3.1.3. Protocolo experimental y seguimiento en el tiempo

Se utilizaron un total de 54 ratones y cada uno de ellos fue asignado a uno de los siguientes grupos experimentales:

- a) ratones alimentados con una dieta estándar y sometidos a todo el proceso quirúrgico pero sin oclusión de ADA (CONTROL *Sham*, n=12),
- b) ratones alimentados con una dieta estándar y oclusión de ADA durante 45 minutos seguida de 28 días de reperfusión (CONTROL IR, n=14),
- c) ratones alimentados con una dieta HFD y sometidos a todo el proceso quirúrgico pero sin oclusión de ADA (HFD *Sham*, n=14),
- d) ratones alimentados con una dieta HFD y sometidos a oclusión de ADA durante 45 minutos seguida de 28 días de reperfusión (HFD IR, n=14).

Durante cada mes, a los 7 días de reperfusión y a los 28 días de reperfusión se determinó la glucosa plasmática (G), se pesaron los animales (P), se llevó a cabo una ecocardiografía (E) y se determinó la presión arterial (Pa) (Figura 15). Por otro lado, a los 2 meses, 3 meses y 6 meses de alimentación con dieta HFD se determinaron los niveles de triglicéridos (TAG) y colesterol total (CHO<sub>total</sub>) en sangre. Se llevaron a cabo extracciones de sangre (S) a través de la vena facial para la determinación de los niveles de insulina, TNF- $\alpha$ , leptina, resistina, MCP-1 e IL-6 de forma basal (tiempo cero), a los 6 meses y en el momento del sacrificio del animal.

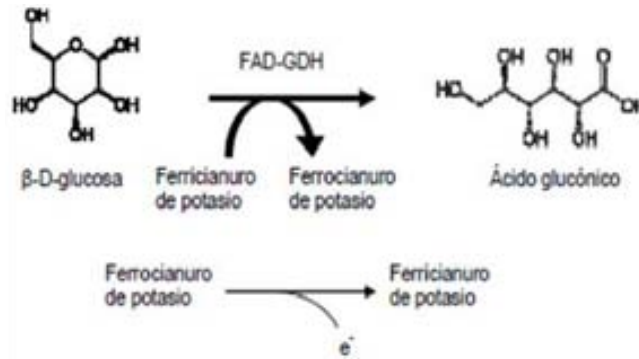
A los 6 meses de alimentación se llevó a cabo la cirugía de IR prolongando el período de reperfusión durante 28 días. Esto permitió la formación de una estructura cicatrizal en la zona infartada y el estudio del RVA. Finalizado el periodo de reperfusión se sacrificó el animal y se extrajo el corazón, se cuantificó el edema pulmonar, y se llevaron a cabo estudios histológicos para determinar el AI.



**FIGURA 15. Fase experimental y seguimiento en el tiempo de los animales.** Con periodicidad mensual, a los 7 días de reperusión y a los 28 días de reperusión se determinaron la glucemia (G), el peso (P), la presión arterial (Pa) y se llevó a cabo una ecocardiografía (E). De forma basal, a los 6 meses de alimentación y en el sacrificio del animal se realizaron extracciones de sangre (S). Al finalizar el periodo de alimentación, los ratones se sometieron a una cirugía de 45 minutos de isquemia seguida de 28 días de reperusión. Tras el periodo de reperusión se sacrificaron los animales para determinar el área de corazón infartada y realizar estudios bioquímicos e histológicos.

### 3.2. Determinación de la glucemia

La glucemia (niveles de glucosa en sangre total) se cuantificó utilizando un kit de diagnóstico comercial (Glucocard G<sup>+</sup> meter, Arkray, Japón). La determinación se basa en la reacción de la glucosa plasmática con la enzima glucosa deshidrogenasa y el ferricianuro potásico (Figura 16). De esta reacción se obtiene ferrocianuro de potasio en cantidad proporcional a la concentración de glucosa de la muestra de sangre, que finalmente se oxida y produce una corriente eléctrica que el medidor convierte en concentración de glucosa. La medida de la glucemia se llevó a cabo entre las 8:00 horas y las 10:00 horas AM. Para ello, evitando lo máximo posible el estrés del roedor, se extrajo de la cola una gota de sangre (entre 5 y 10  $\mu$ L) y se depositó en la tira reactiva del kit comercial, obteniéndose al cabo de 15 segundos la concentración de glucosa plasmática (mg/dL).



**FIGURA 16. Reacción de la glucosa deshidrogenasa (FAD-GDH).**

La glucosa de la muestra de sangre reacciona con la FAD-GDH y con el ferricianuro de potasio presentes en la tira reactiva, produciendo ferrocianuro potásico en cantidad proporcional a la concentración de glucosa de la muestra. La oxidación del ferrocianuro potásico produce corriente eléctrica (e<sup>-</sup>), que el aparato medidor convierte en concentración de glucosa (A. Menarini Diagnostics, España).

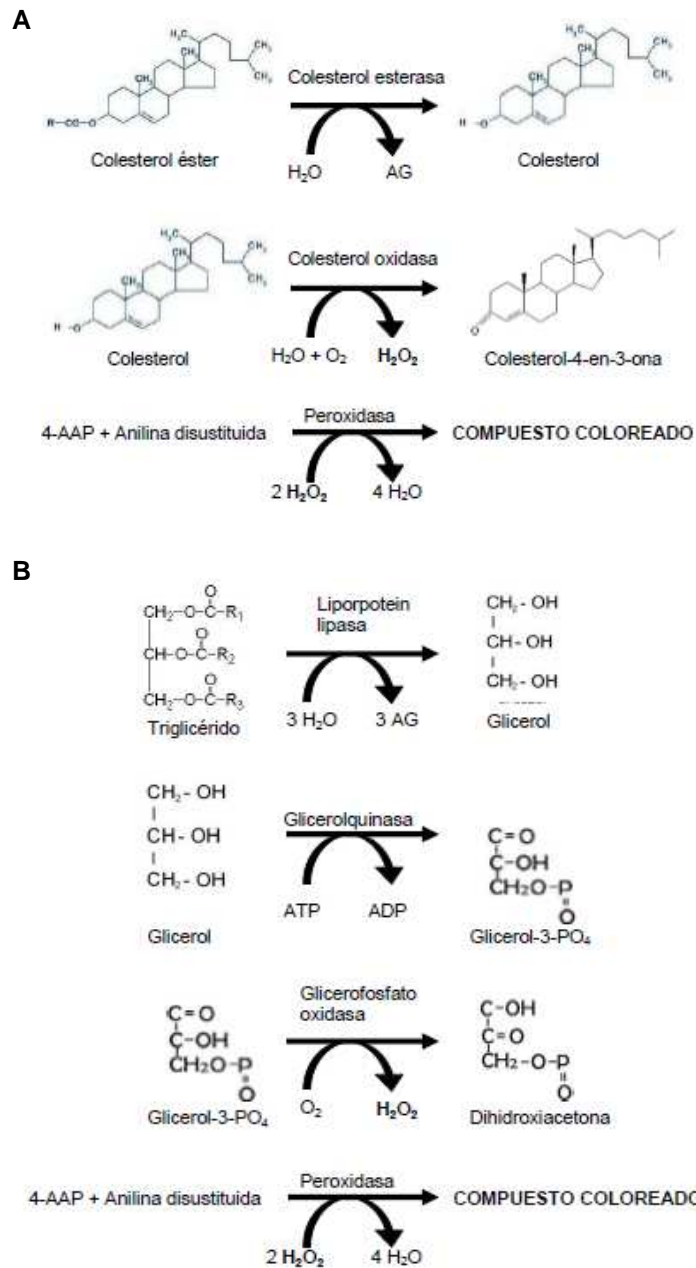
### 3.3. Determinación de la resistencia a la insulina

Para poder determinar el grado de resistencia a la insulina se utilizó el índice HOMA (*homeostasis model assessment*) (Tresaco et al., 2005). Se usaron los niveles de glucosa e insulina en suero tras seis meses de alimentación con dieta HFD para determinar dicho parámetro mediante la siguiente fórmula estándar: [glucosa (mg/dL) x insulina (mIU/mL)]/405.

### 3.4. Determinación de colesterol y triglicéridos

Los TAG y los niveles de CHO<sub>total</sub> en sangre se determinaron mediante un kit comercial CardioChek PA (Polymer Technology Systems, Estados Unidos) basado en un método colorimétrico en el que interviene la peroxidasa de rábano. La cuantificación del CHO<sub>total</sub> y el colesterol HDL (HDL) se basa en la reacción de los ésteres de colesterol con las enzimas colesterol esterasa y colesterol oxidasa. Para el caso de los TAG intervienen las enzimas lipoprotein lipasa, glicerolquinasa y glicerofosfato oxidasa. Para ambos casos en la última reacción interviene la enzima peroxidasa dando lugar a un compuesto coloreado en cantidad proporcional a la del parámetro a medir (Figura 17). Las medidas se llevaron a cabo entre las 8:00 horas y las 10:00 horas AM. Para lo cual, evitando lo máximo posible el estrés del roedor, se extrajeron de la cola entre 35 y 40 µL de sangre total y se depositaron en la tira reactiva del kit comercial, obteniéndose al cabo de 2 minutos la concentración de CHO<sub>total</sub>,

HDL y TAG en mg/dL. Por otro lado, se calculó de forma indirecta la cantidad de colesterol LDL en sangre mediante la siguiente ecuación:  $LDL \text{ (mg/dL)} = CHO_{\text{total}} - HDL - (TAG / 5)$ .

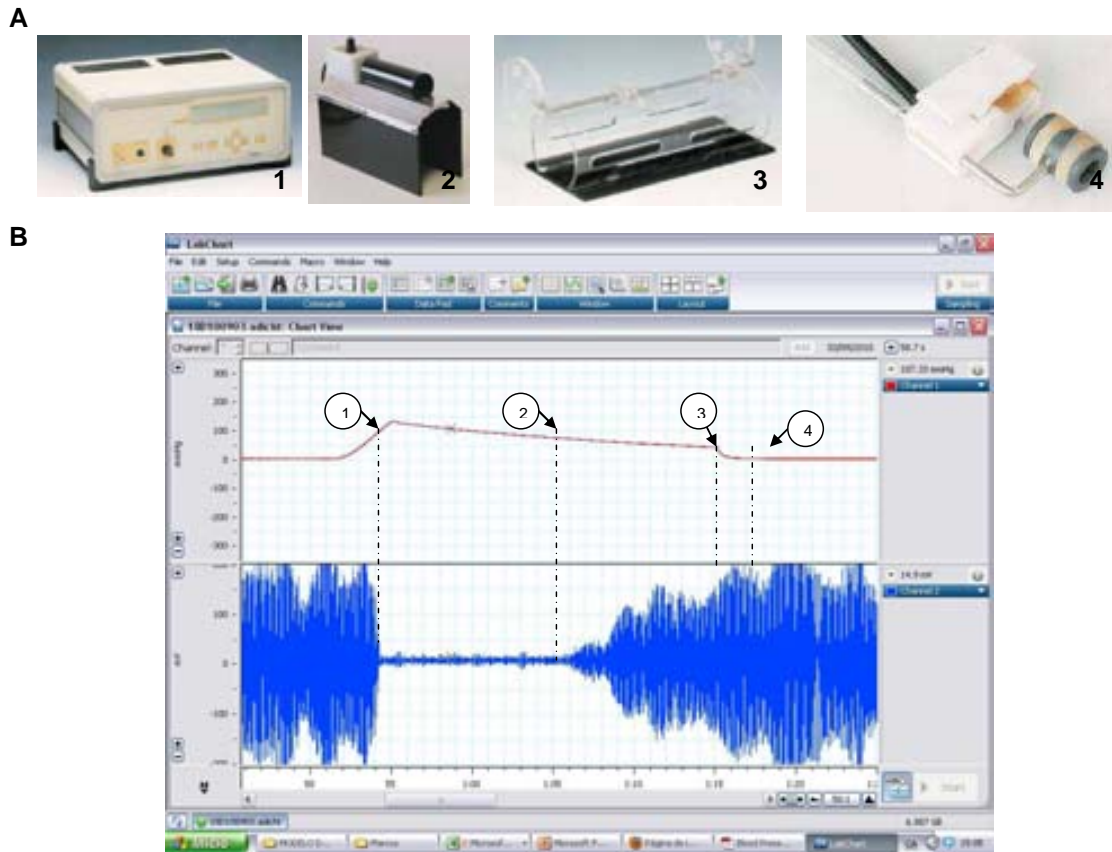


**FIGURA 17. A**, reacciones enzimáticas utilizadas en la determinación de CHO y HDL en sangre. **B**, reacciones enzimáticas utilizadas en la determinación de TAG en sangre. En ambos casos, la cantidad de compuesto coloreado es directamente proporcional a la cantidad de colesterol en la muestra y es detectado mediante fotometría de reflectancia. AG, ácidos grasos; 4-AAP, 4-aminoantipirina.

### **3.5. Medida de la presión arterial**

El método para la medida de Pa se basa en el mismo fundamento utilizado en humanos. De forma resumida, se aplica una presión externa conocida al mismo tiempo que se detecta el pulso sanguíneo. La detección de la señal de pulso se lleva a cabo mediante un transductor basado en un semiconductor de silicio montado en la base de una pinza que se coloca en la zona de paso arterial (la cola del animal). La presión sanguínea media (MAP) se calcula de la siguiente manera:  $MAP = Pd + 0,33 (Ps - Pd)$ , donde Ps y Pd se corresponden con la presión sistólica y diastólica respectivamente (Zhao et al., 2011) (Figura 18, B).

En nuestro caso se midió la Ps, la Pd y MAP a través de la cola del animal mediante pletismografía. Para ello, se utilizó un medidor de presión Letica LE 5007 (Harvard Apparatus, Estados Unidos), una cámara térmica, un manguito transductor de pulso y presión, un cepo para ratones y el software LabChart 7.0 (AdInstruments, Estados Unidos) (Figura 18, A). Con el fin de minimizar en extremo el estrés del animal para evitar alteraciones en la Pa, las medidas se obtuvieron en oscuridad, dentro de la cámara térmica a una temperatura de 27 °C aproximadamente, con el máximo silencio posible, impregnando el cepo con la viruta de la jaula antes de introducir al ratón, realizando las medidas el mismo investigador, sin métodos de sedación y entre las 8:00 horas y las 12:00 horas AM. Cada animal permaneció retenido un máximo de 30 minutos en el cepo para obtener al menos 5 medidas válidas de Pa. El valor de la Ps no debe llegar a 300 mmHg ya que repetidas mediciones sometiendo la cola del animal a esa presión pueden causar daño en el tejido y rotura de vasos sanguíneos.



**FIGURA 18. A**, herramientas utilizadas en la medida de la Pa en ratón. **1**, medidor de presión Letica LE 5007 (Harvard Apparatus, Estados Unidos); **2**, cámara térmica; **3**, cepo para ratón; **4**, manguito transductor de pulso y presión. **B**, método para la medida de Pa. **1**, Cuando se presiona el botón de inicio, la bomba de aire aumenta y con ello aumenta la presión en la cola hasta que se ocluye la arteria; **2**, la Pa aumenta en un 10% y luego comienza a disminuir. Cuando la señal de pulso reaparece, la presión del manguito (*cuff pressure*) es interpretada como la Ps; **3**, en este momento se refleja la presión del manguito cuando la presión de pulso recupera su nivel inicial y este valor se interpreta como la Pd; **4**, el aire del manguito es liberado hasta que la presión alcanza cero y el aparato queda listo para realizar una nueva medida.

### 3.6. Cálculo de la reactividad arterial

Se llevó a cabo el estudio de la reactividad arterial con el fin de verificar si la obesidad modifica la estructura arterial aórtica en base a alteraciones de la contractilidad. Se utilizaron 30 ratones divididos en los siguientes grupos: CONTROL *Sham* (n=4), CONTROL IR (n=9), HFD *Sham* (n=9) y HFD IR (n=8). Tras llevar a cabo el anestesiado con pentobarbital sódico (1,5 g/Kg), se realizó una toracotomía y se extrajo el corazón. Seguidamente se obtuvo cuidadosamente la aorta descendente a nivel torácico y se introdujo, durante 5-10 minutos, en una solución de Krebs oxigenada (95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>) a 4 °C conteniendo en mM, NaCl 118,07, KCl 4,70, CaCl<sub>2</sub> 2 x H<sub>2</sub>O 1,77, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,17,

MgSO<sub>4</sub> 7 x H<sub>2</sub>O 1,17, NaHCO<sub>3</sub> 24,04 y glucosa 12,2 a pH 7,4. Se limpió de tejido conectivo, se eliminó la sangre y se cortó en anillos de 3 a 4 mm de longitud. Los anillos aórticos fueron colocados en 10 mL de baño de órganos conteniendo solución de Krebs oxigenada a 37 °C y fueron conectados a un transductor isométrico horizontal de fuerza (FSG-01, Experimetria, Reino Unido). Los cambios en la presión fueron amplificados (SG-M DC bridge amplifier module; Experimetria, Hungría) y almacenados para su posterior análisis. Todos los anillos fueron equilibrados a una tensión basal de 30 mN durante 1 hora. Los tejidos fueron expuestos después de la estabilización (pH 7,4), de 3 a 5 veces a KCl 50 mM hasta que la amplitud de la respuesta contráctil fue similar en magnitud. Para verificar el estado funcional del endotelio, los anillos aórticos se sometieron a relajación con el vasodilatador acetilcolina (ACh, 1µM) después de una precontracción con norepinefrina (NE, 2x10<sup>-7</sup> M). Los anillos aórticos que se relajaron menos del 50% en la precontracción previa fueron descartados.

### **3.6.1. Curvas acumulativas de concentración respuesta a los agonistas.**

Las curvas acumulativas de concentración respuesta a ACh (desde 10<sup>-9</sup> a 10<sup>-5</sup> M) y nitroprusiato sódico (NaNP, desde 10<sup>-10</sup> a 10<sup>-6</sup> M) fueron realizadas en los anillos aórticos sumergidos en una solución de Krebs oxigenada a 37 °C. La respuesta a ACh y NaNP fue evaluada después de una preconcentración con NE a 2 x 10<sup>-7</sup> M.

### **3.7. Variaciones respecto al protocolo quirúrgico y tratamiento postquirúrgico establecido**

Tras la cirugía, los animales fueron supervisados cada 8 horas durante las primeras 48 horas postcirugía y se pesaron a las 24 horas, a los 7 días y a los 28 días de reperfusión. Transcurridos los 28 días correspondientes al período de reperfusión, los animales fueron sacrificados y los corazones se preservaron en nitrógeno líquido, o bien se sometieron al sistema de retroperfusión en Langendorff. Al terminar la perfusión, se pesaron y se almacenaron en tubos con paraformaldehído al 4% durante 24 horas. Al cabo de ese periodo de tiempo, se realizaron los cortes del corazón, se tiñeron las



secciones con HE y PSR, y finalmente se calculó el AI (%) con respecto al AR (%) estimada en base a la transmuralidad del infarto como hemos visto previamente.

### **3.8. Determinación de IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , insulina, leptina y resistina**

Para la determinación de los analitos IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$ , insulina, leptina y resistina, se utilizó un kit comercial multiensayo Milliplex MAP (Millipore Ibérica, España). En la obesidad se produce un estado inflamatorio leve que se debe en parte a una falta de regulación en la producción de factores anti y pro-inflamatorios por parte de los adipocitos (Vendrell et al., 2004). Este kit permite determinar hormonas metabólicas específicas, citoquinas u otros compuestos relacionados con la inflamación, la obesidad o el síndrome metabólico. La prueba se basa en un ensayo luminométrico múltiple que permite la detección de hasta 100 anticuerpos diferentes que reconocen el mismo número de antígenos en una sola determinación y con un volumen pequeño de muestra (aproximadamente 10  $\mu$ L). Se fundamenta en la detección de anticuerpos que reaccionan contra los analitos anteriores. Estos anticuerpos recubren esferas que contienen diferentes proporciones de un fluoróforo (combinaciones de un fluoruro rojo y otro infrarrojo). La determinación de la cantidad de anticuerpo unido al antígeno se revela por la interacción de un anticuerpo anti-inmunoglobulina humana conjugado con biotina. Posteriormente, se adiciona un conjugado estreptavidina-ficoeritrina (PE). El ensayo se lee en un luminómetro Luminex 100/200 (Luminex, Estados Unidos). De manera breve, cuando se hacen pasar por un detector de fluorescencia, las microesferas que contienen los complejos antígeno-anticuerpo-estreptavidina-PE, el colorante de las microesferas y la PE se excitan por haces de luz de longitudes de onda de 635 y 488 nm respectivamente. La luz del láser que pasa por el filtro de longitud de onda de 635 nm excita al fluoróforo de la microesfera, lo que permite la identificación de los antígenos y el láser que pasa por el filtro de 488 nm excita a la PE conjugada con estreptavidina, permitiendo la detección de la cantidad de anticuerpo específico presente en la muestra (Binder, 2006). La determinación de insulina, leptina, IL-6, MCP-1, TNF- $\alpha$  y resistina se llevó a cabo en muestras sanguíneas obtenidas de forma

basal, a los 6 meses de alimentación con dieta alta en grasas y a los 28 días de reperusión. Brevemente, se extrajeron entre 600 y 700  $\mu\text{L}$  de sangre a partir de la vena facial del ratón y se depositaron en hielo durante 30 minutos. Seguidamente, usando una centrífuga Hermle Z326 K (Hermle-Labortechnik, Alemania) se centrifugaron las muestras a 12.000 RPM durante 10 minutos a 4 °C para obtener el suero sanguíneo y preservarlo a -80 °C hasta el momento de utilizar el kit comercial de análisis.

### **3.9. Determinación de adiponectina**

En la determinación de la adiponectina en suero sanguíneo se utilizó un kit comercial ELISA (Millipore Ibérica, España). La adiponectina es uno de los principales factores específicos producidos por el tejido adiposo por lo que es de gran interés su estudio en individuos obesos. Los niveles en suero de esta hormona son menores en sujetos obesos y aumentan cuando se produce una pérdida de peso (Lyon et al., 2003).

La determinación se basa en un ELISA tipo sándwich en el que se llevan a cabo los siguientes pasos: 1) unión de las moléculas de adiponectina murina presentes en la muestra a anticuerpos monoclonales de ratón anti-adiponectina unidos a los pocillos de la placa del kit, 2) unión de un anticuerpo secundario policlonal anti-ratón conjugado con biotina, 3) seguidamente, unión de la peroxidasa de rábano a los anticuerpos biotinilados, 4) y por último, cuantificación de los conjugados enzima-anticuerpo mediante la reacción de la peroxidasa con el sustrato tetrametilbenzidina. La actividad enzimática se mide espectrofotométricamente por el aumento de absorbancia a 450 nm. El aumento de absorbancia es directamente proporcional a la cantidad de adiponectina de ratón capturada en la muestra.

La adiponectina se determinó en muestras sanguíneas obtenidas de forma basal, a los 6 meses de alimentación con dieta HFD y a los 28 días de reperusión. Las muestras de sangre se procesaron como se ha descrito en párrafos anteriores hasta la utilización del kit de ELISA.

### 3.10. Análisis estadístico

El análisis estadístico fue el mismo para todas las partes en las que se ha dividido esta tesis doctoral. Las diferencias entre los grupos se analizaron utilizando una prueba t-student en el caso de la comparación entre dos grupos experimentales, o bien una prueba ANOVA de una vía para el caso de más de dos grupos experimentales. Los cambios a lo largo del tiempo se analizaron con ANOVA de medidas repetidas. Los casos en los que se obtuvieron diferencias significativas por ANOVA fueron sometidos a un análisis *post hoc* con el test de Bonferroni. El análisis univariante no paramétrico de la supervivencia se llevó a cabo mediante el método de Kaplan-Meier utilizando el software GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, Inc., Estados Unidos) (Kaplan and Meier, 1954). La significación se fijó en un P-valor de 0,05. Los resultados están expresados como media  $\pm$  SEM (error estándar de la media).



# **RESULTADOS**



# 1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

## 1.1. Estudio de la mortalidad

Durante el desarrollo del modelo murino *in vivo* de IR miocárdica se han utilizado un total de 119 ratones de las cepas C57BL/6NCrl y CD1 White (ICR). Este tamaño muestral incluye los animales utilizados para establecer las pautas de anestesia, el proceso de intubación, los métodos quirúrgicos, el protocolo postoperatorio y el procesado del corazón infartado. En la tabla 4 se detallan los procesos clave junto con los problemas y las soluciones encontradas durante el desarrollo del protocolo experimental. De forma general y salvo en los casos en los que se especifique lo contrario, los datos obtenidos se refieren a las dos cepas de ratones sin especificar diferencias entre ambas.

Inicialmente la mortalidad fue elevada y causada por el proceso de intubación, por la mala oclusión de ADA, la deshidratación o hemorragias internas por mala praxis. Al final del desarrollo del protocolo experimental se consiguió una mortalidad en torno al 15%, porcentaje que se encuentra por debajo de la mortalidad descrita por otros autores (Bayat et al., 2002; Klocke et al., 2007).

TABLA 4. Resolución de problemas

<i>Proceso</i>	<i>Dificultad encontrada</i>	<i>Solución</i>
Intubación endotraqueal.	No visualización de la glotis.	Asegurarse de que hay suficiente iluminación transtraqueal. Asegurarse de que la lengua está bien apartada y limpiar el exceso de mucosidad.
Canulación de arteria carótida.	Después de la disección y la ligadura, el vaso está colapsado y sin sangre. El catéter PE-10 se introduce en el vaso pero no avanza.	Apretar primero el nudo de la ligadura distal, a continuación, tensar el lazo de la ligadura proximal. Retroceder y avanzar el catéter con cuidado hasta que se introduzca en el vaso.
Control de temperatura e hidratación.	Quemaduras, rabdomiólisis, hipercalemia y muerte por deshidratación.	Administración de NaCl 0,9% vía subcutánea. Sustitución de manta eléctrica por lámpara infrarroja. Cierre de tórax en reperfusión.
Toracotomía.	Daño en el pulmón al realizar la toracotomía.	Utilizar instrumental romo. Lateralizar al animal hacia la izquierda y una vez abierto el tórax, apartar el pulmón cuidadosamente hacia la izquierda mediante una minitórula, de forma que quede protegido por las costillas.
Ligadura de ADA.	No es posible la identificación de ADA.  Hemorragia después de la ligadura.  Infarto masivo por ligadura de ADA demasiado alta.	Uso de fuentes adicionales de luz dirigidas tangencialmente al corazón. Identificar la vena que se origina en el margen caudal de la aurícula izquierda. ADA con frecuencia transcurre paralela a esta. Aplicar una breve y suave presión en el ápex cardíaco utilizando una minitórula. Esta maniobra provoca una palidez del miocardio resaltando el color rojo de ADA. Asegurarse de no penetrar en exceso en el miocardio durante el avance de la aguja. Asegurarse de realizar la ligadura 1-2 mm por debajo de la aurícula izquierda en su posición normal.
Oclusión.	Arritmias de oclusión potencialmente letales.	Masajear ligeramente el tórax o el corazón para revertir.
Cierre de tórax.	Neumotórax.	Asegurarse de expulsar el aire de la cavidad torácica antes de cerrar.
Reperfusión.	No descenso de ST.  Arritmias de reperfusión potencialmente letales.	Asegurarse de que el tubo PE-50 no ha dañado ADA. Administración de heparina previa a la oclusión. Masajear ligeramente el tórax o el corazón para revertir.
Anestesia postreperfusión.	Muerte por sobredosis anestésica.	Administrar un 50% de la dosis anestésica utilizada en la inducción.



## 1.2. Anestesia y ventilación

Se efectuaron estudios de control de profundidad anestésica adecuando el tipo de anestésico, la dosis inductora y la dosis de mantenimiento al tiempo de cirugía necesario en cada protocolo experimental. Los primeros agentes anestésicos utilizados fueron una combinación de ketamina (Ketolar 50, Pfizer, Estados Unidos) y xilacina (Xilagesic 2%, Calier, España) vía IP, por ser estos los utilizados en nuestro laboratorio para llevar a cabo un protocolo similar de IR miocárdica *in vivo* en rata (Hernando et al., 2010). Estos se descartaron por provocar una profunda depresión en la función ventricular y un descenso significativo de la FC de los animales, incluso antes de ser sometidos al proceso quirúrgico (Pacher et al., 2008). A continuación se llevaron a cabo pruebas con el anestésico pentobarbital sódico en una solución específica en PEG 400 también vía IP (Farmacia Carreras, VHIR, España). Al igual que para los anteriores, este fármaco modificó a la baja la función ventricular y la FC, pero además, provocó un exceso de secreción de moco que dificultó el proceso de intubación (Pacher et al., 2008). Finalmente, se escogió como anestésico de elección el isofluorano por varios motivos: 1) con los anestésicos anteriores se necesitan dosis de refuerzo constantes, lo que requiere pinchar al animal cada cierto tiempo siendo esto traumático y añadiendo una dificultad más al protocolo, mientras que el isofluorano es un anestésico volátil de muy fácil administración; 2) Tiene efectos más benévolos sobre la función ventricular y la FC que los otros anestésicos (Pacher et al., 2008); 3) Posee un rápido efecto inductor (15-30 segundos), un tiempo de cirugía estable en torno a 6 horas, y ejerce una pronta reversión de la anestesia (menos de 1 minuto) (Tabla 5) (Szczesny et al., 2004). El escoger como anestésico de referencia un agente volátil, tiene como principal inconveniente un mayor riesgo de exposición para el investigador. Debido a esto, se tomaron medidas protectoras específicas como por ejemplo, el uso de una mascarilla con filtro para gases.

**TABLA 5. Inducción y mantenimiento de la anestesia mediante isofluorano en ratón**

<i>Protocolo experimental</i>	<i>Duración</i>	<i>Isoflurano</i>
Inducción de la anestesia	15-30 s	5%
Protocolo quirúrgico (Ejemplo: oclusión ADA)	40-60 min	2-3%
Mantenimiento anestesia	3-7 h	1,5-2%

Modificado de Szczesny et al., 2004.

La capacidad de intubar con éxito la tráquea de los ratones y controlar su VMC es importante para los estudios que requieren recuperación de la anestesia y necesitan medidas repetidas de la función pulmonar, la función cardíaca u otros procesos, tales como el uso de las imágenes radiológicas (por ejemplo, la tomografía computerizada o la resonancia magnética) o imágenes ecocardiográficas. La intubación mediante traqueotomía se descartó debido a que se somete al animal a un proceso quirúrgico extra, consume tiempo y puede causar complicaciones en el período postcirugía. El método de elección fue la intubación endotraqueal no invasiva y se basó en el método descrito por Tarnavski et al. (Tarnavski et al., 2004). Este método posibilita una intubación rápida y relativamente segura disminuyendo los riesgos del abordaje quirúrgico. En los modelos funcionales murinos tiene especial importancia el control de la ventilación mediante la respiración artificial, lo cual es difícil de conseguir como consecuencia del pequeño tamaño del animal y de un patrón respiratorio técnicamente exigente. En nuestro modelo, se determinó el mínimo espacio muerto posible en torno a 2,5 cm de longitud de cánula y se efectuaron pruebas de ventilación con parámetros como el  $V_t$  o la FR calculados automáticamente por el *modo seguro* del propio ventilador, o calculados mediante las siguientes fórmulas matemáticas:  $V_t$  (mL) =  $6,2 \times M^{1.01}$ , donde M es la masa del animal en Kg, y  $FR$  ( $\text{min}^{-1}$ ) =  $53,5 \times M^{-0.26}$  (Tarnavski et al., 2004). Se determinó un PEEP de entre 2 y 5 cm de  $H_2O$  (2 cm de  $H_2O$  en precirugía y apertura de tórax, y 4-5 cm de  $H_2O$  en cierre de tórax y despertar) y un volumen de *sigh* (“suspiro”) de 0,3 mL programado cada 10 minutos durante el despertar. Con esto se disminuyó la posibilidad de desarrollar un edema pulmonar severo debido al colapso alveolar.

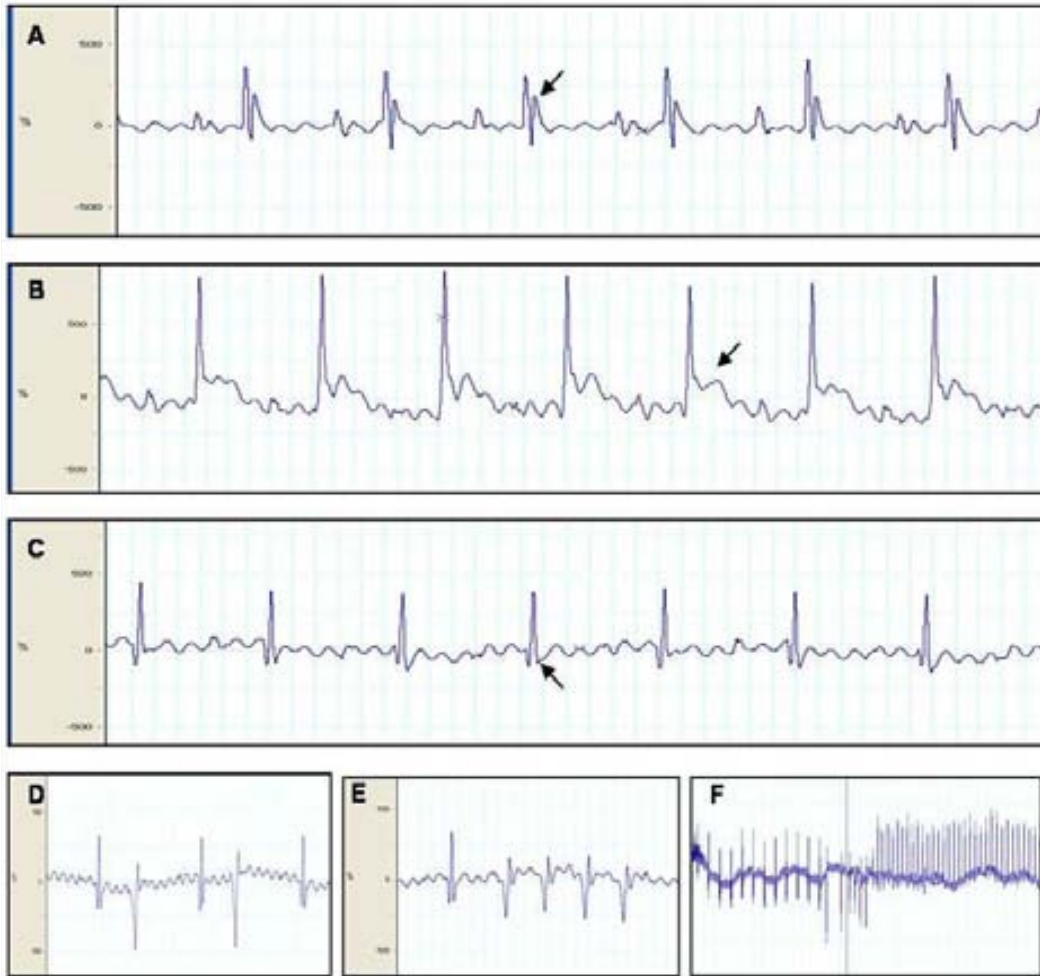
En el caso de que se produjera una extubación endotraqueal durante la cirugía, determinamos que la primera y más importante intervención para

conseguir la supervivencia del animal sería cerrar el tórax mediante sutura, para seguidamente, intentar la intubación. Volver a intubar al ratón con el tórax abierto, por lo general resulta en la pérdida del animal por parada cardiorrespiratoria.

### **1.3. Procedimiento quirúrgico y oclusión transitoria de la arteria coronaria descendente anterior (ADA)**

El pequeño tamaño del miocardio de los ratones (por término medio 10 veces inferior al de la rata) hace que la obtención de un modelo reproducible de isquemia por oclusión transitoria de ADA necesite el desarrollo de una técnica quirúrgica compleja y específica que se adapte a nuestras condiciones. En las primeras fases del desarrollo del protocolo, la oclusión se realizó mediante un sistema de pesos colgantes utilizando un hilo de sutura 7-0 de polipropileno (Eckle et al., 2006). Mediante este método se conseguía una oclusión de ADA reversible, sin embargo, los pesos desplazaban el corazón y causaban daño en el tejido miocárdico. Además, el uso de hilo de sutura de polipropileno dificultaba la oclusión coronaria debido a la memoria que desarrolla este material. Por este motivo se decidió realizar una oclusión transitoria de ADA mediante un nudo doble, hilo de sutura 6-0 de seda y un tubo PE-50 interpuesto entre la coronaria y el hilo de sutura aumentando con ello la supervivencia y mejorando notablemente la reperfusión.

La oclusión transitoria de ADA y la reperfusión se comprobaron de varias formas (Michael et al., 1995). En primer lugar, visualmente, la región isquémica durante la oclusión debe aparecer de color pálido e hipocinética, además de producirse una elevación del segmento ST en el ECG (Figura 19, B); mientras que en la reperfusión se observa el enrojecimiento del VI debido al restablecimiento del flujo sanguíneo y un descenso progresivo del segmento ST (Figura 19, C). En segundo lugar, durante la oclusión el flujo sanguíneo disminuye de forma considerable y se ve reflejado en un descenso de la presión arterial, restableciéndose los parámetros normales en la reperfusión. Además, durante el restablecimiento del flujo coronario se ha visto un descenso significativo de la FC con respecto a la medida en el período basal (tabla 6).



**FIGURA 19. Cambios en el ECG durante el protocolo de IR en ratón.** La flecha señala el segmento ST antes de la isquemia (A), a los 10 minutos de isquemia (B) y a los 10 minutos de reperusión (C). Durante la isquemia se observa claramente una elevación del segmento ST del ECG y durante la reperusión puede producirse una inversión de la onda T. D, muestra un episodio de bigeminismo durante la reperusión. E, muestra una extra sístole ventricular durante la reperusión. F, muestra una taquicardia ventricular durante la reperusión.

Con el desarrollo del protocolo experimental casi terminado se produjo un incremento en la aparición de arritmias cardíacas (bigeminismo, taquicardias ventriculares y extrasístoles que pudieron derivar en fibrilaciones auriculares), pudiéndose producir tanto a los 10 minutos de dar comienzo la oclusión coronaria, como a los 10 minutos de comenzar la reperusión (Figura 19, D, E y F). Esto se debió al perfeccionamiento en la localización de ADA y a una mayor certeza en la colocación del punto de oclusión, consiguiéndose en el 95% de los casos una oclusión con elevación del segmento ST reflejada en el ECG.

Durante las fases iniciales del desarrollo del protocolo quirúrgico, el 90% de los ratones morían antes de alcanzar los 60 minutos de reperusión y después de la aparición de respiraciones agónicas premortem (*gaspings*) sin un

motivo aparente. Se llevaron a cabo gasometrías arteriales durante la reperfusión y tras someter al ratón a 2 horas de VMC. Las gasometrías mostraron una elevación de los niveles plasmáticos de potasio ( $K^+$ ) o hipercalemia ( $7,845 \pm 0,58$  mmol/L, siendo valores normales de  $K^+$  plasmático en ratón adulto entre 3,5 y 5 mmol/L). Esto, junto con el excesivo calentamiento de la manta eléctrica nos hizo concluir que la muerte de los animales podía deberse a la deshidratación y rhabdomiólisis por sobrecalentamiento muscular. Este problema se solucionó cambiando la manta eléctrica por una lámpara de infrarrojos, aumentando la temperatura de la sala de cirugía y aplicando el protocolo de hidratación descrito con anterioridad en materiales y métodos.

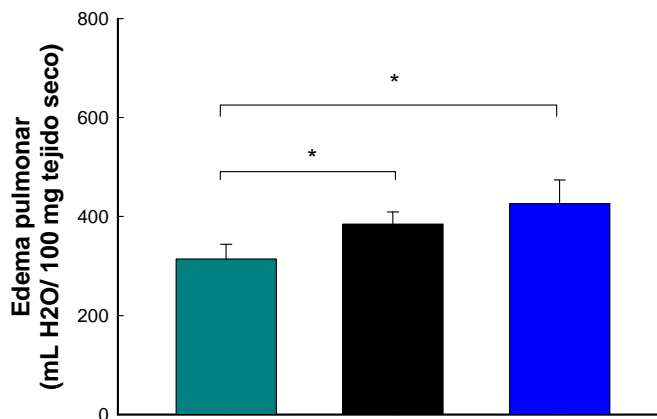
**TABLA 6. Temperatura rectal y frecuencia cardíaca en ratones C57BL/6NCrl y CD1 (ICR)**

	Basal	Apertura Tórax	Isquemia	Reperfusión
	<i>Temperatura (°C)</i>			
C57BL/6NCrl (n=10)	35,9 ± 0,3	36,4 ± 0,2	37 ± 0,1	36,9 ± 0,1
CD1 (ICR) (n=19)	36,1 ± 0,1	36,3 ± 0,1	36,3 ± 0,1	36,1 ± 0,1
	<i>FC (BPM)</i>			
C57BL/6NCrl (n=9)	363,8 ± 10,2	381 ± 10,3	385,9 ± 21,0	329,1 ± 17,6*
CD1 (ICR) (n=16)	388,1 ± 12,2	379,2 ± 9,4	378,3 ± 14,1	341,1 ± 13,6

Los datos corresponden a la media ± SEM. \*  $p < 0,05$  respecto a Basal.

#### 1.4. Complicaciones; edema pulmonar

La cuantificación del edema pulmonar se ha llevado a cabo tanto en ratones *sham* como en ratones sometidos a los protocolos de IR consistentes en 45 min de isquemia seguidos de 24 horas de reperfusión (IR 24h, n=5) ó 7 días de reperfusión (IR 7d, n=5) (Figura 20). Se ha podido observar un aumento significativo del edema pulmonar en los ratones sometidos a una oclusión transitoria seguida de reperfusión, siendo en mayor grado en los animales sujetos a un período de IR 7d.



**FIGURA 20.** Edema pulmonar en ratones control (*Sham*), ratones sometidos a 45 min de isquemia seguidos de 24 horas de perfusión (IR 24h) y ratones sometidos a 45 min de isquemia seguidos de 7 días de perfusión (IR 7d). \* $p < 0,05$  respecto a *Sham*. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM,  $n=5$  por grupo.

## 1.5. Estudio ecocardiográfico

En este trabajo experimental se estableció un protocolo experimental ecocardiográfico para ratones en el que se obtuvieron datos reproducibles y dentro del rango descrito previamente en la literatura. El estudio ecocardiográfico del VI se llevó a cabo en ratones *Sham* ( $n=5$ ), ratones IR 24h ( $n=5$ ) y ratones IR 7d ( $n=5$ ) (tabla 7). En los ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguida de 2 horas de perfusión (IR 2h) no se realizó el estudio ecocardiográfico puesto que la apertura de tórax es muy reciente y la imagen ecocardiográfica aparece con grandes artefactos debido al hilo de sutura y la inflamación postoperatoria. Además, la presión que se ejerce sobre el tórax y el reanestesiado del animal de forma tan temprana aumentan considerablemente la probabilidad de muerte.

En los resultados se observa de manera general un descenso significativo de la FE y de la FA a las 24 horas de perfusión, dato que se corresponde con lo reportado en la bibliografía (Finsen et al., 2005; Elrod et al., 2007; Thibault et al., 2007). Esta disminución persiste en las medidas ecocardiográficas realizadas a los 7 días posteriores al IAM y refleja el éxito de la oclusión de la arteria coronaria del ratón.

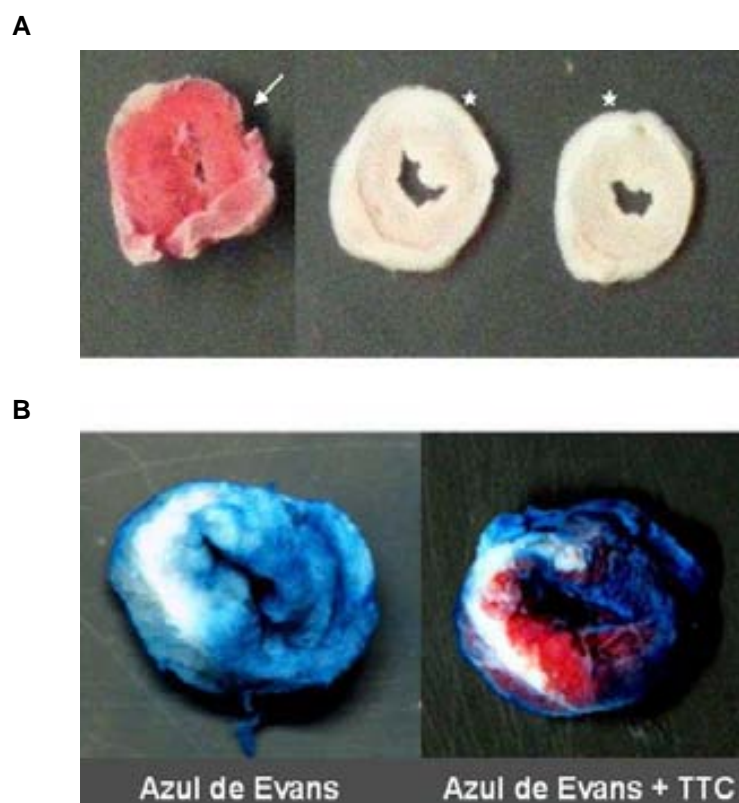
TABLA 7. Datos ecocardiográficos

	<i>Sham</i> (n=5)	IR 24h (n=5)	IR 7d (n=5)
FC (BPM)	463,6 ± 35,3	496 ± 34,5	414,5 ± 33,5
SVId (mm/g)	0,032 ± 0,03	0,019 ± 0,06	0,025 ± 0,04
DVId (mm/g)	0,123 ± 0,018	0,123 ± 0,028	0,129 ± 0,08
PPVId (mm/g)	0,025 ± 0,03	0,023 ± 0,06	0,020 ± 0,012
DVIs (mm/g)	0,069 ± 0,014	0,086 ± 0,021	0,089 ± 0,016
FE (%)	68,5 ± 3,3	50,5 ± 3,1*	46,8 ± 3,9*
FA (%)	35,6 ± 3,3	26,5 ± 1,9*	21,4 ± 8,5*

*Sham*, ratones sin oclusión de ADA. IR 24h, ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguida de 24 horas de reperfusión. IR 7d, ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguida de 7 días de reperfusión. FC, frecuencia cardíaca. SVId, diámetro del septum intraventricular diastólico. DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo. PPVId, diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole. DVIs, diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo. FE, fracción de eyección. FA, fracción de acortamiento. Los datos corresponden a la media ± SEM. \* p < 0,05, diferencias respecto a *Sham*.

## 1.6. Procesado de los corazones

Durante la fase de procesado del corazón se probaron los colorantes y sus concentraciones para la tinción del AR y de la zona isquémica o necrótica correspondiente al AI (Elrod et al., 2007; Bohl et al., 2009). También se desarrolló el método de corte del corazón en lonchas para la posterior cuantificación del AR y del AI. Experimentos previos demostraron que el enfriado o congelado del corazón como se describe en varios artículos puede provocar la aparición de zonas TTC negativas de forma que podría verse alterada la cuantificación del AI (Eckle et al., 2006; Bohl et al., 2009) (Figura 21, A). También la inclusión del corazón en gelatina o agarosa para mejorar el corte de las lonchas puede desencadenar estas áreas TTC negativas además de alterar el tejido miocárdico, ya que estas sustancias se añaden al corazón relativamente calientes. Por todo ello se optó por utilizar PBS frío y TTC a 37 °C como se explica en el apartado Materiales y Métodos. En la figura 21, B, se pueden ver las lonchas procesadas de un corazón de ratón sometido a 45 min de isquemia seguida de un período de 24 horas de reperfusión. El azul de Evans diferencia de forma clara el miocardio que se encuentra dentro de la zona en riesgo (no teñida de color azul). Dentro del AR, el TTC marca el miocardio viable de color rojo (positivo para TTC) mientras que el miocardio necrótico aparece de color pálido (negativo para TTC).



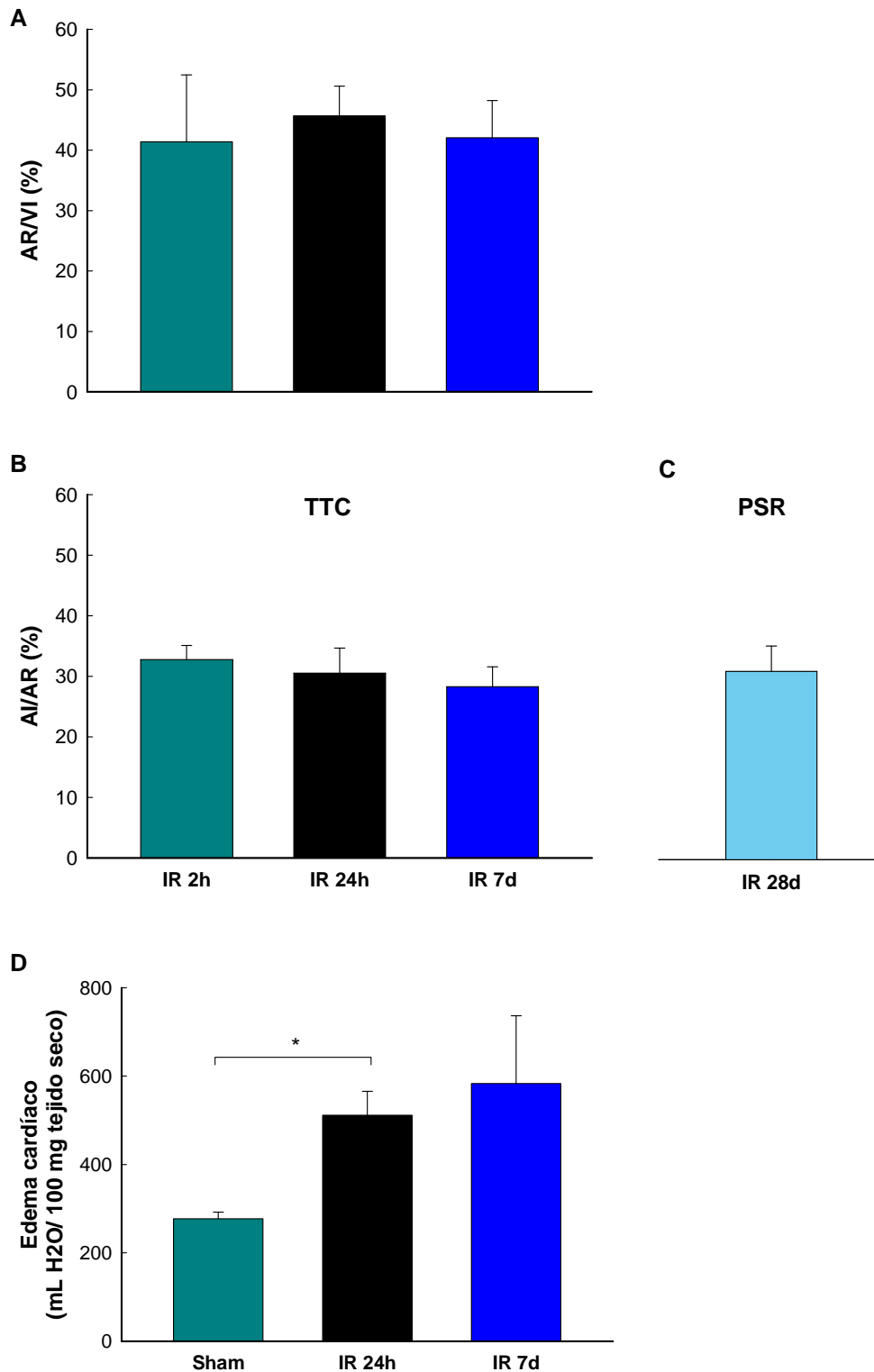
**FIGURA 21. Lonchas de corazón procesadas.** Todos los corazones aquí reflejados han sido sometidos a 45 min de ischemia seguidos de 24 horas de reperfusión. **A**, lonchas blancas en su totalidad debido a la aparición de zonas TTC negativas (estrellas) por congelación del tejido comparadas con una loncha no afectada (flecha). **B** se corresponde con lonchas sin congelar sometidas a la tinción con azul de Evans y TTC. En la loncha teñida con azul de Evans aparece en blanco el AR y en azul el resto del tejido miocárdico. En la loncha teñida con azul de Evans + TTC aparece en blanco la zona necrótica, en rojo el tejido salvado y en azul el resto del miocardio.

### 1.7. Cuantificación del área de infarto y del área en riesgo miocárdicos y evolución durante la reperfusión

En el desarrollo del modelo experimental de IR miocárdica *in vivo* en ratón hemos obtenido los datos de cuantificación del AI para cuatro tipos de protocolos diferentes: 45 minutos de ischemia seguida de 2 horas (IR 2h, n=7), 24 horas (IR 24h; n=7), 7 días (IR 7d, n=11) y 28 días de reperfusión (IR 28d, n=10) respectivamente. Se han obtenido unos valores de AR frente a VI (AR/VI) similares en todos los protocolos de reperfusión (Figura 22, A). Los valores del AI frente al AR (AI/AR) tampoco han mostrado diferencias entre los distintos protocolos (Figura 22, B y C), a diferencia del edema cardíaco que ha



sufrido un aumento significativo en los ratones sometidos a una oclusión transitoria con respecto a los ratones *sham*, siendo en mayor grado en los animales sujetos a un período de IR 7d (Figura 22, D). La ausencia de diferencias significativas en el AI entre los cuatro grupos, demuestra que el tamaño del infarto queda establecido durante las primeras horas de la reperusión.



**FIGURA 22.** **A**, AR/VI (%) y **B**, AI/AR (%) calculada mediante TTC en ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 2 horas (IR 2h), 24 horas (IR 24h) o 7 días de reperusión (IR 7d). **C**, AI/AR (%) calculada mediante PSR en ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 28 días de reperusión (IR 28d). **D**, edema cardíaco en ratones control (*Sham*), ratones sometidos a IR 24h y ratones sometidos a IR 7d. Los datos corresponden a la media±SEM. IR 2h, n=7; IR 24h, n=7; IR 7d, n=11; IR 28d, n=10.

## 2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

### 2.1. Estudio de la mortalidad

Dieciocho animales (10 WT y 8 Casp3/7) fueron sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 24 horas de reperfusión (IR 24h), de los cuales, 14 animales sobrevivieron y fueron incluidos en el análisis final. La mortalidad (22%) se debió a fallo cardíaco durante las primeras horas de reperfusión como consecuencia del IAM (n=2), intubación incorrecta (n=1) y edema pulmonar severo (n=1). No hubo diferencias en la mortalidad entre animales WT y animales Casp3/7. Dos animales fueron excluidos de la cuantificación del AI debido a fallos en la oclusión y posible preconditionamiento isquémico por liberación del tubo ocluser.

Diecinueve ratones (9 WT y 10 Casp3/7) se sometieron a un protocolo de 45 minutos de isquemia seguidos de 28 días de reperfusión (IR 28d), de los cuales, 14 animales sobrevivieron y fueron incluidos en el análisis final. Las causas de la mortalidad (26%) fueron mala intubación (n=2), fallo cardíaco a las pocas horas de reperfusión (n=2) y rotura ventricular tras 3 días de reperfusión (n=1). En este caso tampoco hubo diferencias significativas en la mortalidad entre ambos grupos de animales. Tres animales fueron excluidos de la cuantificación del AI debido a problemas en la oclusión (n=3).

### 2.2. Peso corporal y peso del corazón

Para los ratones IR 24h el peso corporal fue similar entre ambos grupos antes del proceso quirúrgico y tampoco aparecieron diferencias significativas en el peso de los corazones tras el protocolo de IR.

En los ratones sometidos a IR 28d el peso corporal fue similar en ambos grupos tanto a nivel basal, como tras 28 días de reperfusión y tampoco hubo diferencias significativas con respecto al tiempo (Tabla 9). El peso de los corazones tampoco mostró diferencias significativas entre ambos grupos experimentales (WT,  $0,218 \pm 0,021$  g, frente a Casp 3/7,  $0,248 \pm 0,044$  g).

### 2.3. Análisis ecocardiográfico

El estudio ecocardiográfico basal, antes de someter a los animales al proceso de isquemia, no mostró diferencias significativas entre los ratones WT y los ratones Casp3/7 en ninguno de los parámetros ecocardiográficos medidos (Tabla 8).

**TABLA 8. Parámetros ecocardiográficos en ratones WT y Casp3/7. Medidas basales (antes de cirugía)**

	<i>WT (n=9)</i>		<i>Casp3/7 (n=10)</i>		<i>p</i>
PESO (g)	30,0 ±	1,610	31,7 ±	3,170	0,928
SVId	0,9 ±	0,029	0,9 ±	0,037	0,796
PPVId	0,8 ±	0,021	0,7 ±	0,022	0,052
DVId	4,0 ±	0,069	4,2 ±	0,101	0,126
DVIs	2,8 ±	0,066	3,0 ±	0,078	0,264
FE (%)	63,7 ±	3,202	62,8 ±	3,701	0,847
FA (%)	29,9 ±	2,541	29,5 ±	2,216	0,898
FC (bpm)	434,0 ±	22,000	427,0 ±	13,000	0,796

SVId, PPVId, DVId y DVIs en mm. SVId, grosor del septum intraventricular en sístole; PPVId, Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs; diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; FC, frecuencia cardíaca. Los datos corresponden a la media±SEM.

El análisis ecocardiográfico realizado tras 28 días de reperusión (IR 28d) mostró un aumento significativo en DVIs, y una disminución de la FE y la FA respecto a los valores basales tanto en los animales WT como en los animales Casp3/7 (Tabla 9 y Tabla 10). Estos datos confirman el proceso de RVA del VI tras un IAM.

**TABLA 9. Parámetros ecocardiográficos en ratones WT. Medidas basales (antes de cirugía) y tras IR 28d**

	<i>Basal (n=9)</i>		<i>IR 28d (n=7)</i>		<i>p</i>
PESO (g)	30,0 ±	1,610	29,7 ±	1,650	0,894
SVId	0,8 ±	0,050	0,9 ±	0,070	0,122
PPVId	0,8 ±	0,052	0,8 ±	0,056	0,908
DVId	4,1 ±	0,187	4,6 ±	0,185	0,069
DVIs	2,8 ±	0,172	3,7 ±	0,211	0,013 *
FE (%)	63,7 ±	3,202	47,8 ±	3,448	0,007 *
FA (%)	29,9 ±	2,541	20,5 ±	1,886	0,014 *
FC (bpm)	434,0 ±	22,000	448,0 ±	16,000	0,611

SVId, PPVId, DVId y DVIs en mm. SVId, grosor del septum intraventricular en sístole; PPVId, Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs; diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; FC, frecuencia cardíaca. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05 respecto a Basal.

**TABLA 10. Parámetros ecocardiográficos en ratones Casp3/7. Medidas basales (antes de cirugía) y tras IR 28d**

	<i>Basal (n=10)</i>		<i>IR 28d (n=7)</i>		<i>p</i>
PESO (g)	32,7 ±	3,170	30,4 ±	3,3300	0,635
SVId	0,8 ±	0,042	0,9 ±	0,0340	0,522
PPVId	0,9 ±	0,067	1,0 ±	0,0728	0,342
DVId	4,2 ±	0,241	4,6 ±	0,2340	0,244
DVIs	2,9 ±	0,216	3,7 ±	0,2070	0,026 *
FE (%)	62,8 ±	3,701	46,7 ±	2,4620	0,005 *
FA (%)	29,5 ±	2,216	19,9 ±	1,2590	0,004 *
FC (bpm)	427,0 ±	13,000	456,0 ±	14,0000	0,161

SVId, PPVId, DVId y DVIs en mm. SVId, grosor del septum intraventricular en sístole; PPVId, Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs; diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; FC, frecuencia cardíaca. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05 respecto a basal.

Sin embargo, no se observaron diferencias significativas en la función ventricular entre ambos grupos de ratones tras el período de IR (Tabla 11).

**TABLA 11. Parámetros ecocardiográficos en ratones WT y Casp3/7 tras IR 28d**

	<i>WT (n=7)</i>		<i>Casp3/7 (n=7)</i>		<i>p</i>
PESO (g)	29,7 ±	1,649	30,4 ±	3,3271	0,847
SVId	0,9 ±	0,069	0,9 ±	0,0350	0,547
PPVId	0,8 ±	0,056	0,9 ±	0,0700	0,139
DVId	4,6 ±	0,184	4,6 ±	0,2350	0,906
DVIs	3,7 ±	0,211	3,7 ±	0,2080	0,855
FE (%)	47,8 ±	3,448	46,7 ±	2,4631	0,800
FA (%)	20,5 ±	1,887	19,9 ±	1,2597	0,780
FC (bpm)	448,3 ±	16,472	455,8 ±	13,9006	0,730

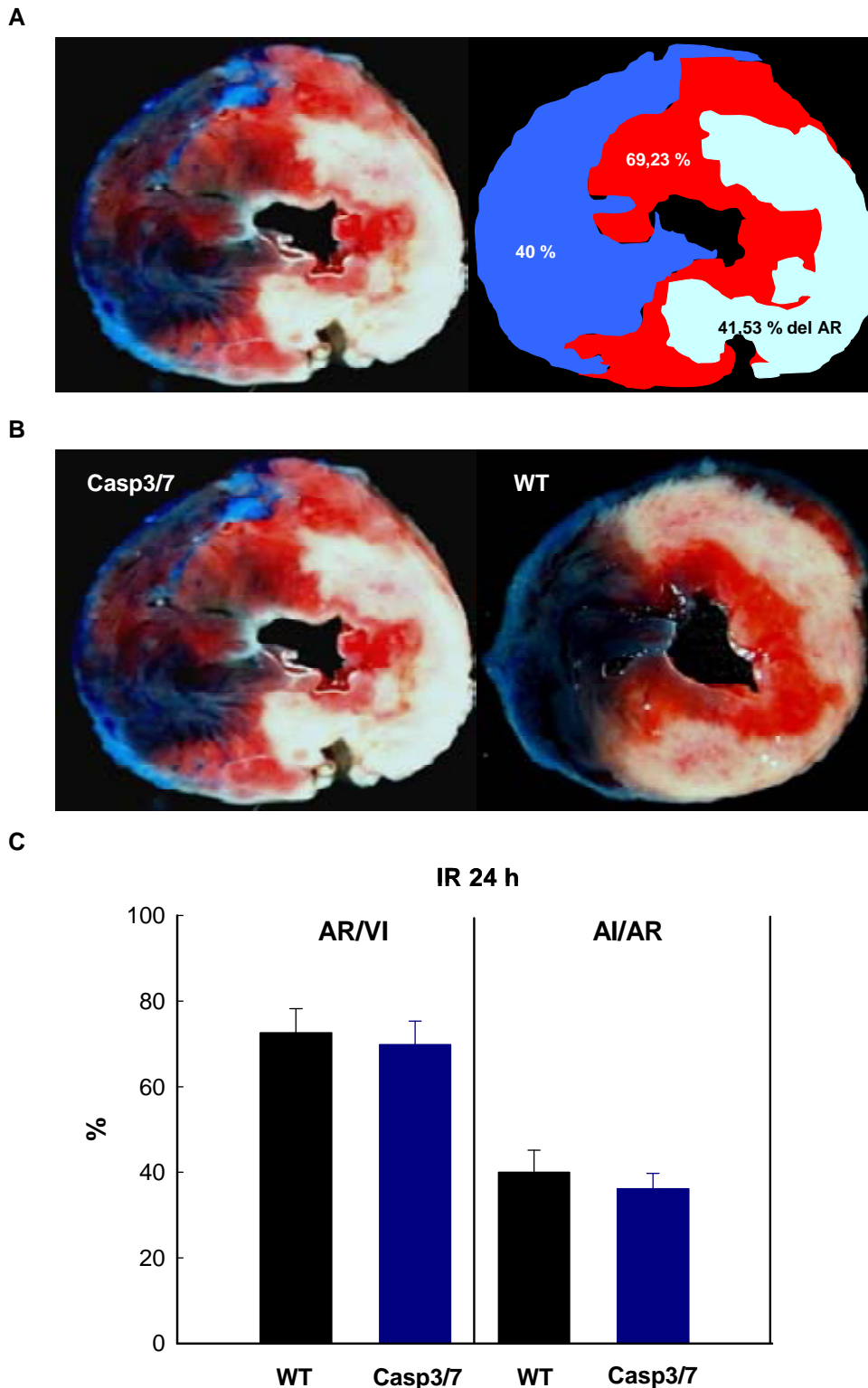
SVId, PPVId, DVId y DVIs en mm. SVId, grosor del septum intraventricular en sístole; PPVId, Grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs; diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento; FC, frecuencia cardíaca. Los datos corresponden a la media±SEM.

## 2.4. Tamaño del infarto en ratones Casp3/7

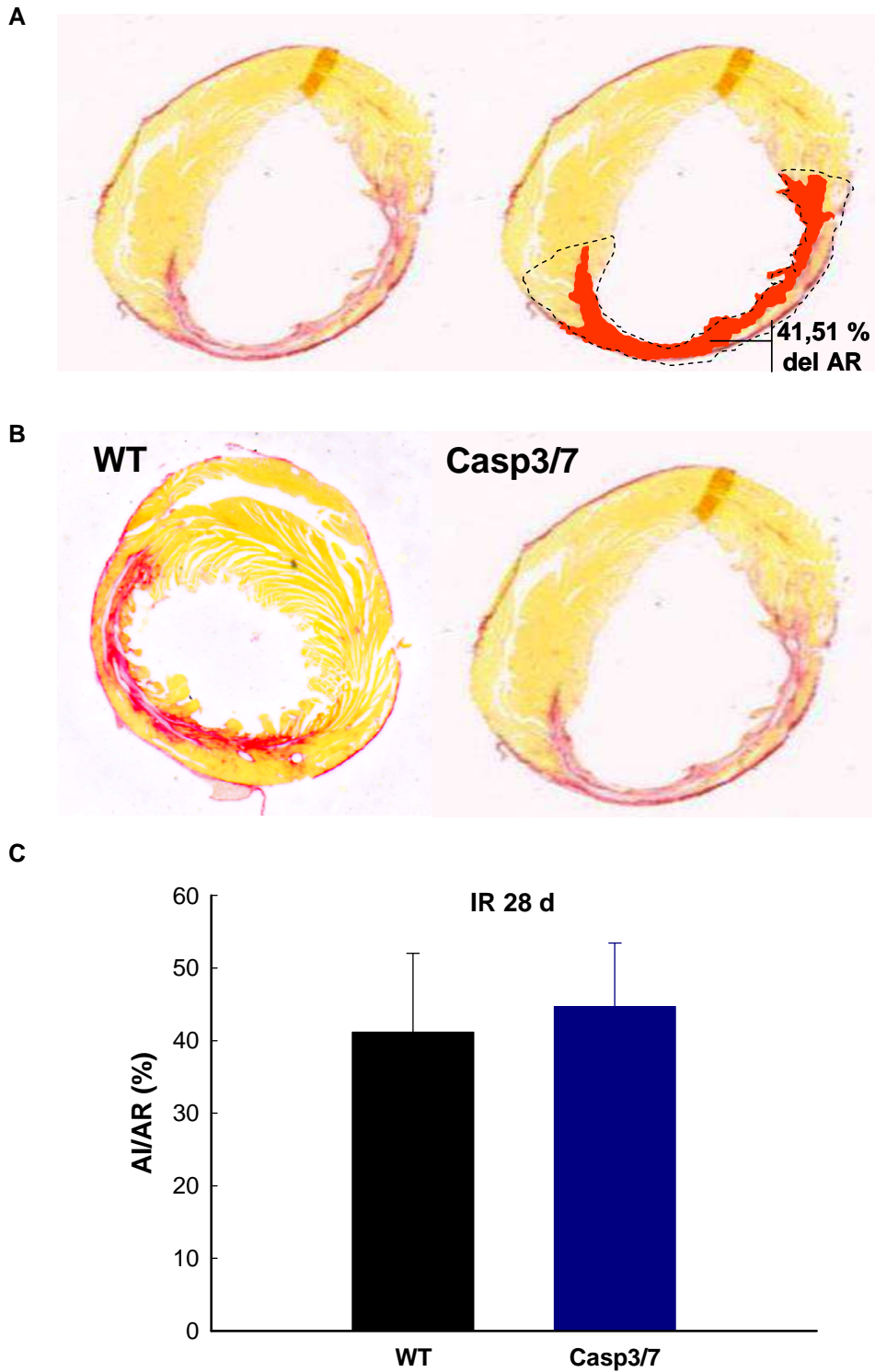
En el estudio del AI tras someter a los ratones a un periodo de 45 minutos de isquemia seguidos de 24 horas de reperusión se obtuvo un AR similar en ambos grupos experimentales, lo que corrobora la reproducibilidad del método de oclusión miocárdico (Figura 23). No se observaron diferencias significativas en el AI frente al AR (AI/AR) entre los dos grupos experimentales

( $40,01 \pm 5,12\%$  en ratones WT, frente a  $36,17 \pm 3,6\%$  en ratones Casp3/7) (Figura 23, B y C).

Los ratones sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 28 días de reperfusión mostraron patrones de acumulación de fibras de colágeno (formación de cicatriz tras el IAM) similares tanto en ratones WT como en ratones Casp3/7 (Figura 24, A y B). Además, en los cortes histológicos teñidos con PSR se observó una zona clara de estrechamiento de la pared del VI y una dilatación ventricular que se corresponde con el proceso de RVA. Entre ambos grupos no aparecieron diferencias significativas en el tamaño del infarto frente al AR ( $41,13 \pm 10,85\%$  en ratones WT, frente a  $44,69 \pm 8,75\%$  en ratones Casp3/7) (Figura 24, C).



**FIGURA 23. Planimetría del tamaño de infarto miocárdico en ratones WT y ratones Casp3/7 tras 24h de reperusión (IR 24h).** **A**, esquema de la planimetría de una loncha medial del corazón de un ratón Casp3/7 tras el IAM. Área en riesgo (AR=área no azul, 69,23% del total de área de la loncha) y área de necrosis o infarto (AI=área pálida, 41,53% del área en riesgo) fueron delimitadas de forma manual. Las zonas de miocardio sin riesgo aparecen representadas de color azul. Se debe tener en cuenta que el ventrículo derecho no se ha eliminado. **B**, microfotografías a nivel medio del VI que representan corazones de ratones WT y Casp3/7. **C**, gráficas que muestran el AR como porcentaje del VI (AR/VI) y AI como porcentaje del AR (AI/AR) tras 24 horas de reperusión. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM. n=6 por grupo.



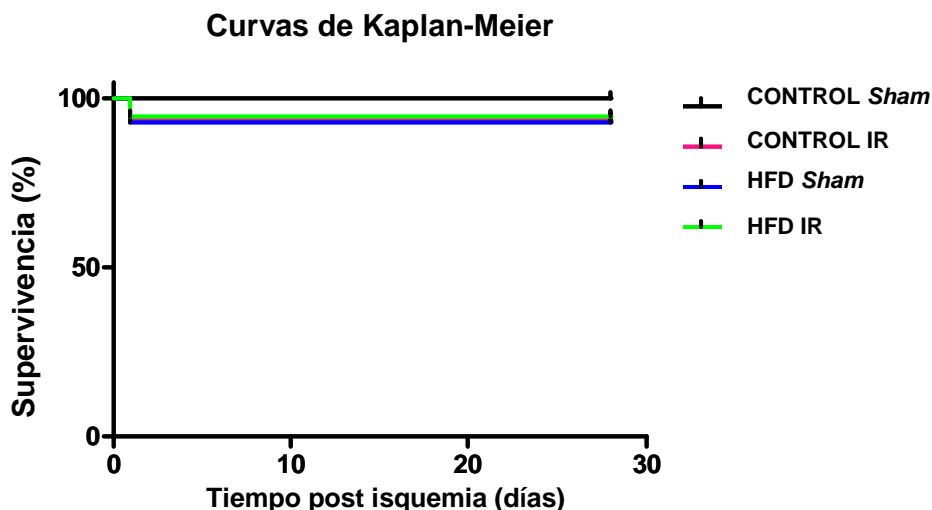
**FIGURA 24. Planimetría del tamaño de infarto miocárdico en ratones WT y ratones Casp3/7 tras 28 días de reperusión (IR 28d).** **A**, esquema de la planimetría de una loncha medial del corazón de un ratón Casp3/7. El área en riesgo (AR= línea de puntos) y el área de necrosis o infarto (AI= zona roja, 41,51% del área en riesgo) fueron delimitadas de forma manual. Se debe tener en cuenta que el ventrículo derecho no se ha eliminado. **B**, microfotografías de secciones histológicas a nivel medio del VI que representan corazones de ratones WT y Casp3/7 tras 28 días de reperusión. En amarillo aparece el tejido miocárdico no afectado por la isquemia. En rojo se observan las fibras de colágeno de la cicatriz miocárdica. **C**, gráficas que muestran el AI como porcentaje del AR (AI/AR) tras 28 días de reperusión. Los datos corresponden a la media±SEM. WT, n=4; Casp3/7, n=6.



### 3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

#### 3.1. Estudio de la mortalidad

De los 54 ratones alimentados con dieta HFD o con dieta control y sometidos a 45 minutos de isquemia seguidos de 28 días de reperfusión, 50 ratones sobrevivieron y fueron incluidos en el protocolo experimental. La mortalidad (7,40%) se debió a edema pulmonar grave tras 20-60 min de reperfusión (n=2), fallo en la intubación (n=1) y causas desconocidas (n=1). No hubo diferencias significativas en la mortalidad postisquemia entre todos los grupos experimentales (Figura 25). Para la cuantificación del AI se utilizaron 34 animales. De los animales restantes (n=20), 10 se preservaron en nitrógeno líquido para futuras determinaciones bioquímicas y/o histológicas, y el resto se descartó por diferentes causas: fallo en la oclusión y ausencia de AI (n=4), preconditionamiento isquémico por liberación del tubo ocluser (n=2), fallo en los cortes histológicos (n=1), o pérdida del corazón por mala reperfusión en el sistema Langendorff (n=3).



**FIGURA 25. Supervivencia entre los cuatro grupos de ratones.** Las curvas de Kaplan-Meier no mostraron diferencias significativas en la supervivencia entre grupos. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM. Control Sham, n=12; Control IR, n=14; HFD Sham, n=14; HFD IR, n=14.

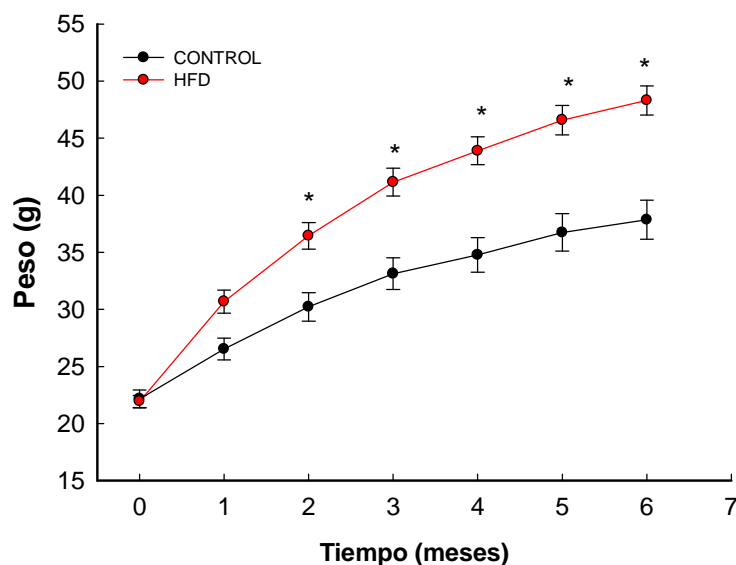
### 3.2. Efectos de la dieta alta en grasas en ratones BDF1

No se han encontrado diferencias estadísticamente significativas en los pesos corporales iniciales entre los grupos control y HFD (Tabla 12). Durante los seis meses de alimentación con dieta HFD los ratones BDF1 desarrollaron una obesidad severa comparada con los ratones con dieta control (Figura 26). La autopsia a los seis meses de alimentación con dieta HFD mostró una mayor cantidad de grasa visceral y abdominal en los ratones BDF1 con dieta HFD con respecto a los ratones control. El CHO<sub>total</sub> en plasma aumentó a las 16 semanas de alimentación con dieta HFD con respecto a los controles, mientras que los TAG en plasma disminuyeron sus niveles de forma significativa (Tabla 12).

**TABLA 12. Peso corporal y parámetros metabólicos de los ratones BDF1 antes y después de ser alimentados durante 24 semanas con una dieta control o una dieta HFD**

	<i>Dieta CONTROL</i>			<i>Dieta HFD</i>		
	0 semanas	16 semanas	24 semanas	0 semanas	16 semanas	24 semanas
Peso (g)	22,1±0,7	34,7±1,5	37,8±1,7	21,9±0,5	43,8±1,2 *	48,3±0,1 *
G (mg/dL)	149,4±4,1	140,5±4	136,3±6,4	154,0±3,4	223,5±7,3 *	153,3±9,9 **
Insulina (pg/mL)	1675±674,5	ND	8935,1±1574,6	1285,8±328,7	ND	27408,8±5136,8 ***
CHO <sub>total</sub> (mg/dL)	128,5±8,4	140±10,6	ND	122,4±9,7	203±7,3 *	ND
TGA (mg/dL)	217,4±21,3	216,1±33,3	ND	204±18,6	170±22,9 *	ND

G, glucemia plasmática; CHO<sub>total</sub>, colesterol total en plasma; TGA, triacilgliceroles en plasma. ND indica no determinado. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05 respecto a dieta CONTROL y tiempo basal (0 semanas). \*\*p<0,05 respecto a 16 semanas. \*\*\*p<0,05 respecto a dieta CONTROL y 24 semanas. Dieta CONTROL, n=26; Dieta HFD, n=28.

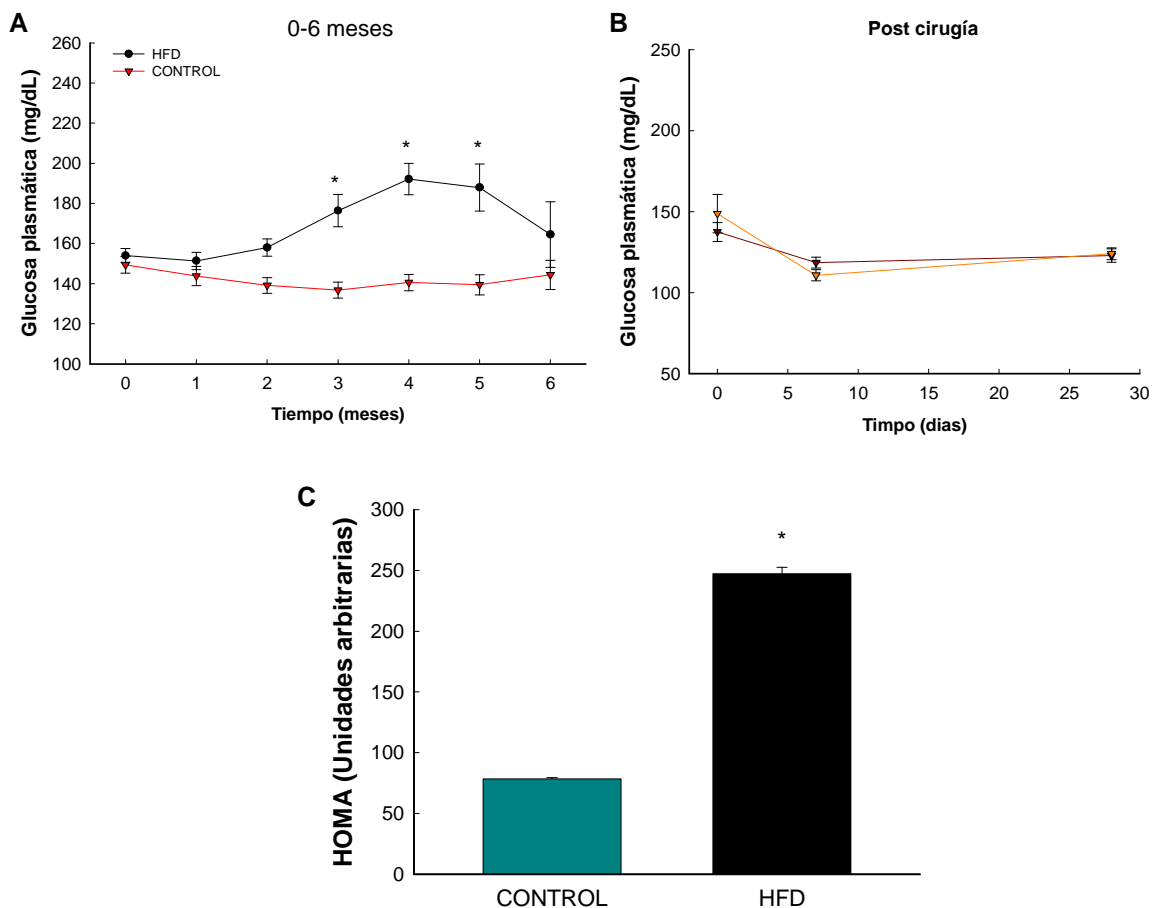


**FIGURA 26. Obesidad inducida por dieta en ratones BDF1.** Cambios en el peso corporal en ratones control y ratones HFD. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05. CONTROL, n= 26. HFD, n=28

Los niveles de insulina en los ratones con dieta HFD fueron significativamente más altos a los seis meses que en los ratones con dieta control (Tabla 12).

Los niveles de glucosa plasmática se mantuvieron estables en los animales control, mientras que los ratones con dieta HFD a las 16 semanas de alimentación mostraron un aumento significativo de la glicemia con respecto a los controles (Figura 27, A). Sin embargo, a partir del quinto mes de alimentación con dieta HFD, los niveles de glucosa plasmática disminuyeron y se mantuvieron sin diferencias con respecto al grupo control en el momento de realizar el protocolo de IR (Figura 27, B).

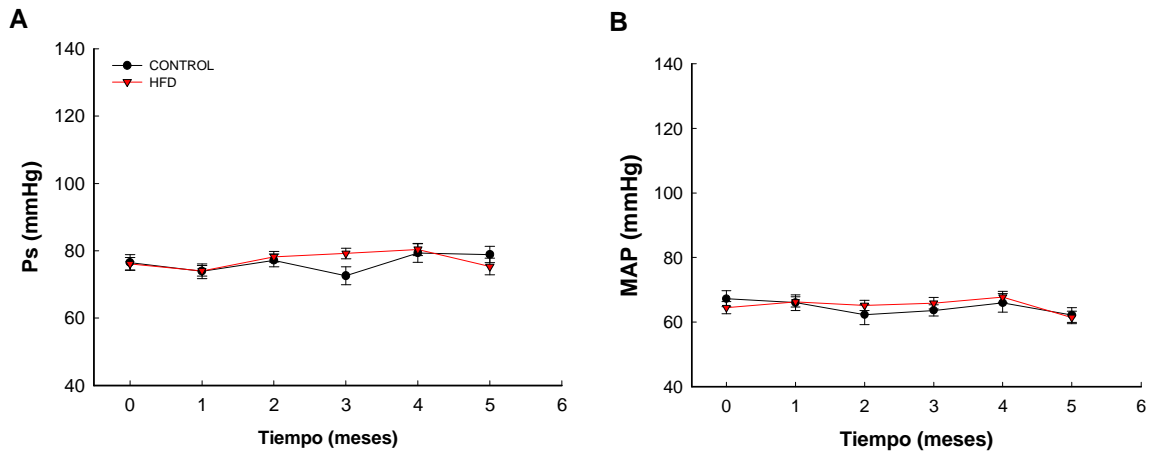
Los valores del índice HOMA fueron significativamente mayores en los animales con dieta HFD con respecto a los animales con dieta control indicando una clara resistencia a la insulina (Figura 27, C).



**FIGURA 27. Niveles plasmáticos de glucosa e índice HOMA en ratones alimentados con dieta HFD frente a ratones alimentados con dieta control.** **A**, glucosa plasmática en ratones BDF1 alimentados con dieta control o dieta HFD. **B**, glucosa plasmática en ratones BDF1 alimentados con dieta control o dieta HFD tras el proceso de isquemia miocárdica. **C**, valores para el índice HOMA tras 6 meses de alimentación con dieta HFD. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM mediante ANOVA. \* $p < 0,05$  respecto a dieta control. Dieta CONTROL,  $n=26$ ; Dieta HFD,  $n=28$ .

### 3.3. Presión arterial en ratones obesos

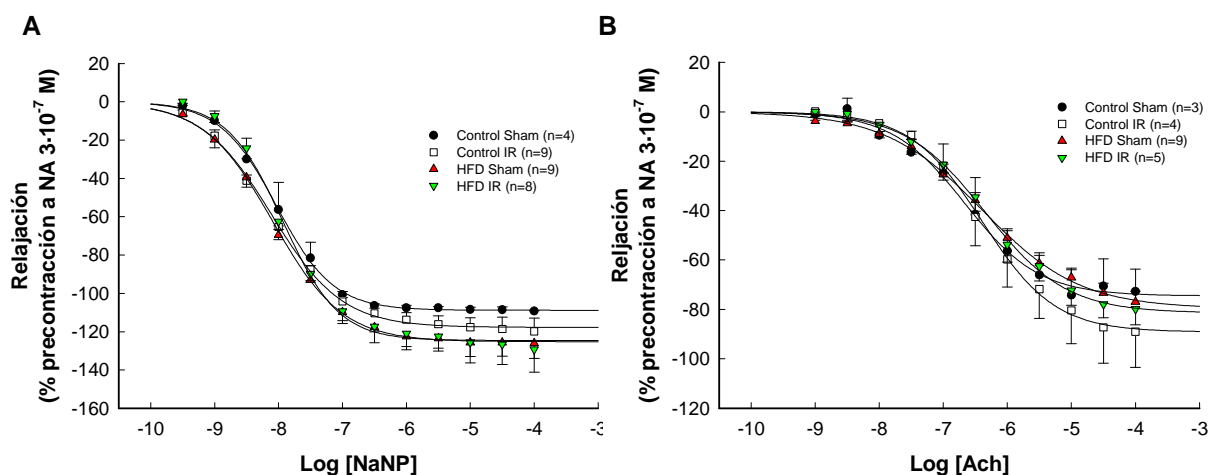
Los ratones con obesidad inducida por dieta HFD mostraron parámetros de presión arterial normales y no aparecieron diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los tiempos en los que se ha estudiado (Figura 28).



**FIGURA 28. Parámetros de presión sanguínea en ratones normales (CONTROL) y obesos (HFD).** La presión arterial sistólica (A, PAS) y la presión arterial media (B, MAP) se determinaron mediante esfigmomanómetro (determinación no invasiva) con periodicidad mensual durante 6 meses. Los datos corresponden a la media±SEM. CONTROL, n=26. HFD, n=28.

### 3.4. Alteraciones en la vasoconstricción aórtica en ratones obesos

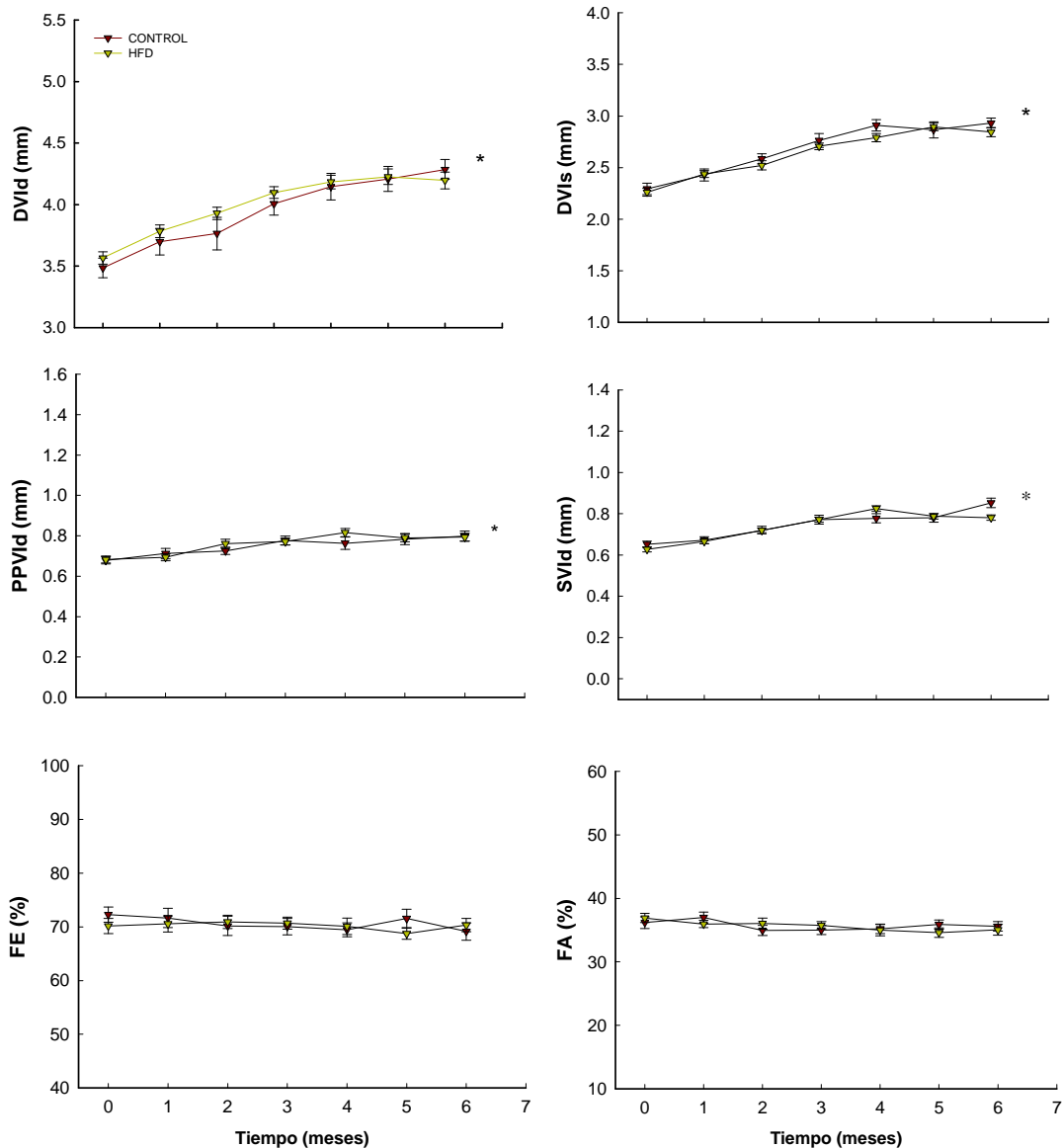
Al sexto mes de alimentación con dieta HFD, no se detectaron diferencias significativas en la reactividad vascular para ninguno de los grupos experimentales (Figura 29). Los valores  $EC_{50}$  para la Ach (CONTROL *Sham*,  $-6,67 \pm 0,23$ ; CONTROL IR,  $-6,37 \pm 0,09$ ; HFD *Sham*,  $-6,41 \pm 0,11$ ; y HFD IR,  $-6,32 \pm 0,08$ ) y para el NaNP (CONTROL *Sham*,  $-8,05 \pm 0,21$ ; CONTROL IR,  $-8,13 \pm 0,12$ ; HFD *Sham*,  $-8,09 \pm 0,11$ ; y HFD IR,  $-7,92 \pm 0,08$ ) no presentaron diferencias significativas.



**FIGURA 29. Reactividad vascular en ratones normales y ratones obesos.** Los anillos aórticos de ratones con dieta normal y ratones con obesidad inducida por dieta HFD fueron expuestos frente a diferentes agentes vasoactivos a los 6 meses de alimentación. **A**, vasodilatación con nitroprusiato sódico (NaNP). **B**, vasodilatación con acetilcolina (ACh). Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. ANOVA.

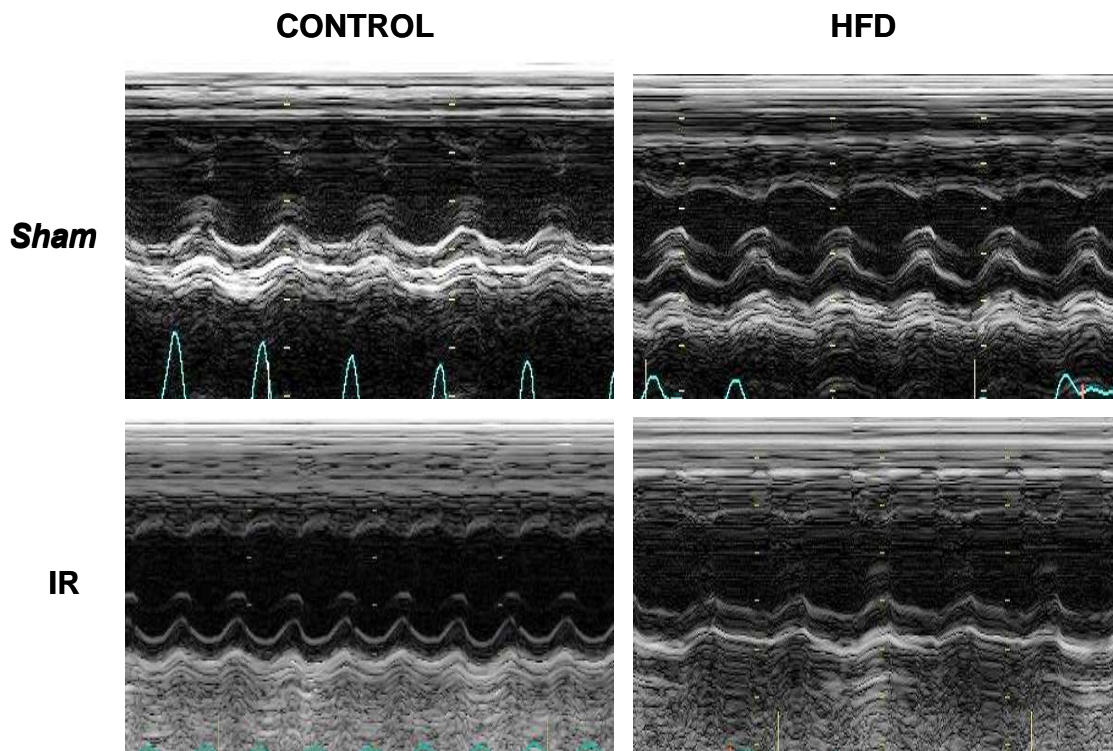
### 3.5. Estudio ecocardiográfico en ratones obesos

El análisis ecocardiográfico realizado durante los seis meses previos al protocolo de IR mostró tanto en los animales control como en los animales alimentados con dieta HFD un aumento a lo largo del tiempo en los diámetros ventriculares (diastólico, DVId, y sistólico, DVIs con  $p < 0,001$ ), en el grosor de la pared intraventricular (SVId con  $p < 0,001$ ) y en el grosor de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole (PPVId con  $p < 0,001$ ). Sin embargo, ninguna de estas variaciones se asoció con el tipo de dieta en ninguno de los parámetros analizados (Figura 30).



**FIGURA 30. Análisis ecocardiográfico mensual durante seis meses de alimentación con dieta HFD.** DVIId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs, diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; PPVId, diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; SVId, grosor del septum intraventricular en sístole; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05 respecto a tiempo 0. CONTROL, n=26. HFD, n=28.

Una vez sometidos los animales al proceso quirúrgico y transcurridos 7 días de reperusión (IR 7d), las imágenes ecocardiográficas mostraron un aumento en la cavidad del VI tanto en los animales con dieta control como en los animales con dieta HFD con respecto a los controles *Sham* (Figura 31).

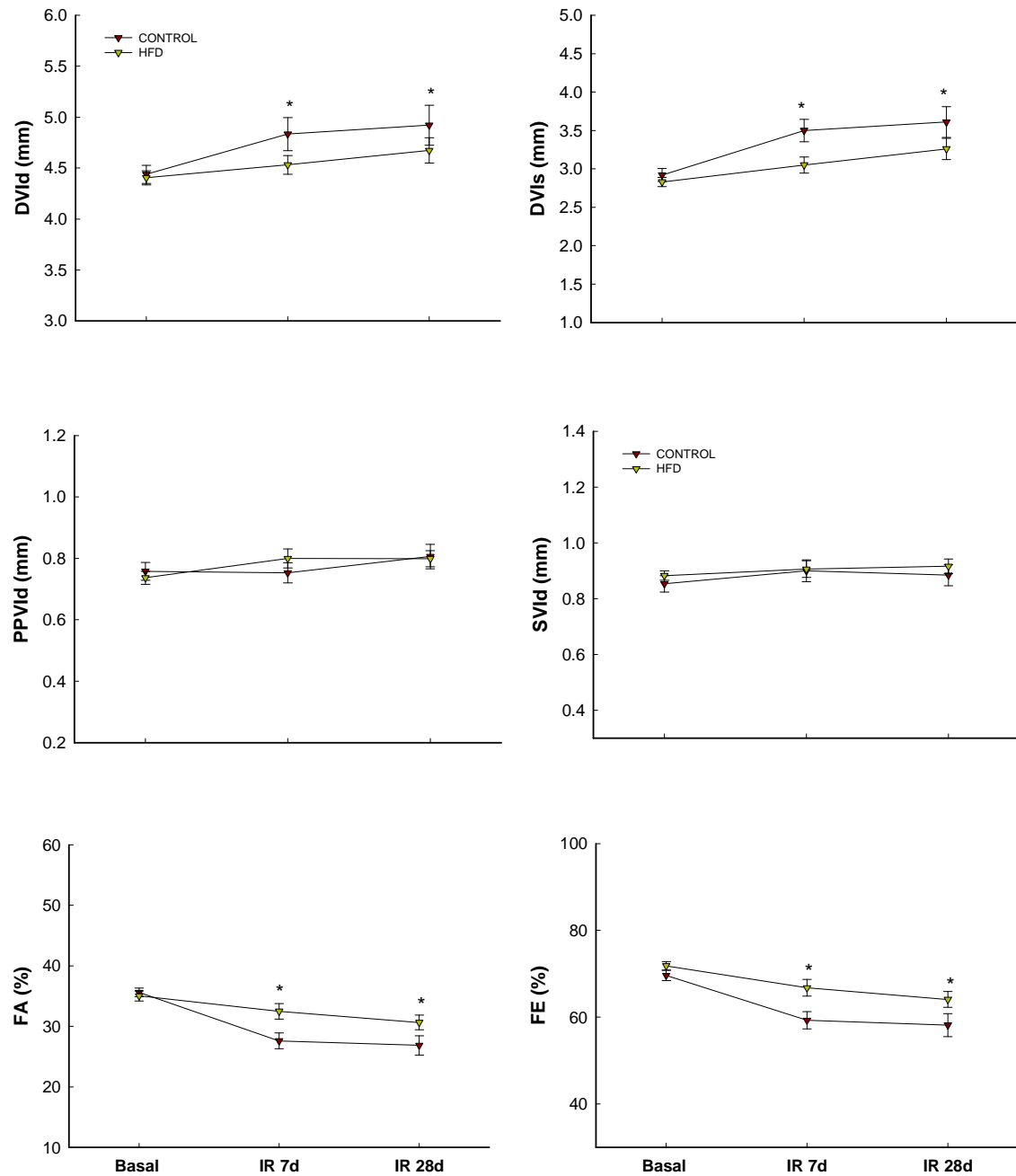


**FIGURA 31.** Imágenes ecocardiográficas en modo M mostrando las paredes del VI en animales obesos (HFD) transcurridos 7 días de reperfusión (IR 7d).

El análisis de estas imágenes confirmó una dilatación en el VI del corazón infartado tanto en animales control como en animales con dieta HFD, como demuestra el aumento de DVId y DVIs después de 7 días de reperfusión en comparación con los valores basales. Esta dilatación del VI fue mayor tras 28 días de reperfusión (IR 28d) reflejando la progresión del proceso de RVA (Figura 32).

El remodelado de los corazones infartados se asoció con un descenso significativo de la FE y la FA tras 7 días de reperfusión tanto para el grupo control como para el grupo con dieta HFD, siendo este descenso aun mayor tras 28 días de reperfusión.

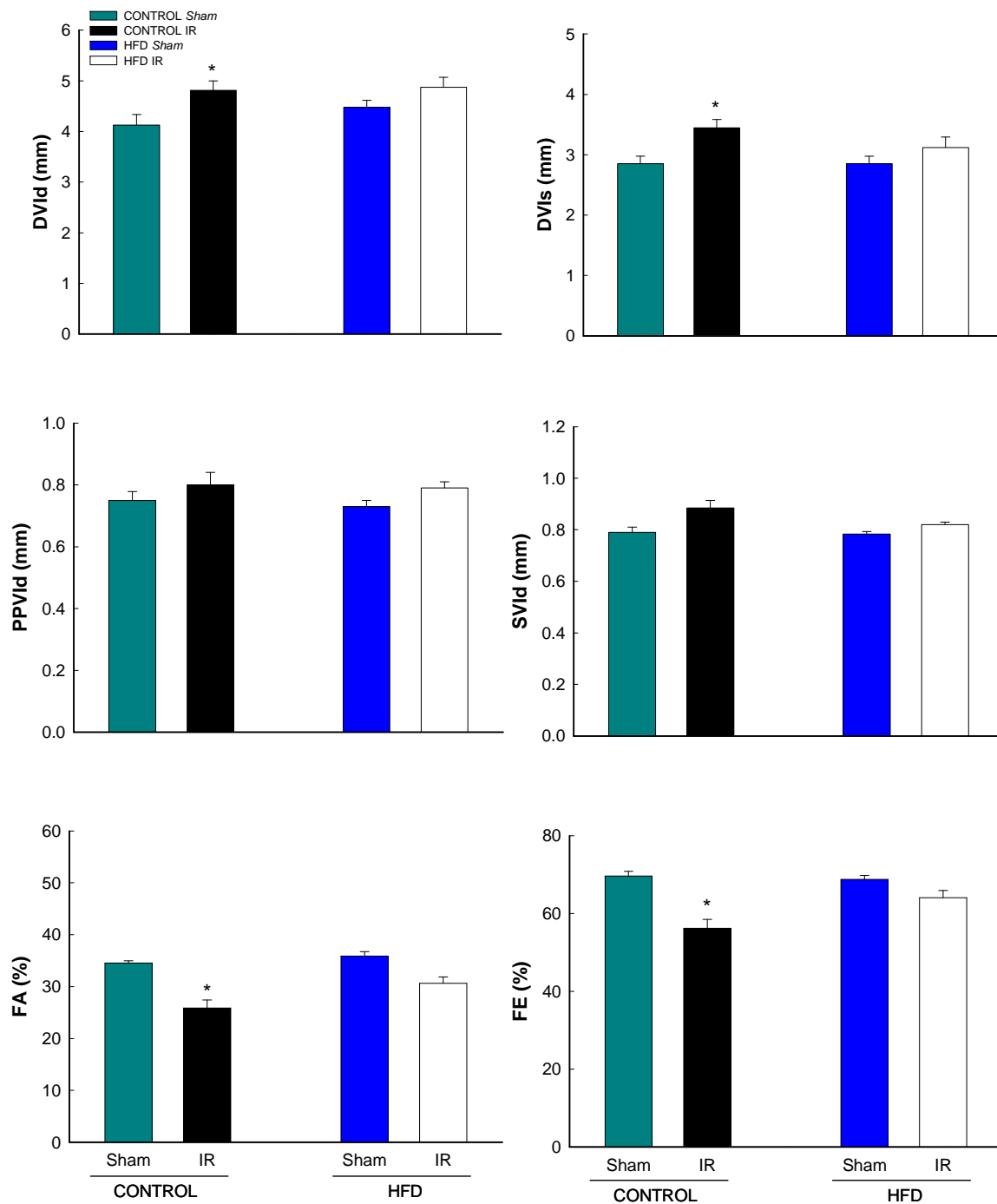
Si comparamos los resultados con respecto a la dieta, se observó una mayor dilatación ventricular en ausencia de diferencias significativas en el grosor ventricular, y un descenso significativo de la FE y la FA ( $p=0,003$ ) en los animales con dieta control, indicando una mayor disfunción sistólica con respecto a los animales con obesidad inducida por dieta HFD (Figura 32 y Figura 33).



**FIGURA 32. Análisis ecocardiográfico tras 7 (IR 7d) y 28 días de reperusión (IR 28d).** DVI<sub>d</sub>, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVI<sub>s</sub>, diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; PPV<sub>d</sub>, diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; SV<sub>d</sub>, grosor del septum del ventrículo izquierdo en diástole; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento. Los datos corresponden a la media±SEM. \*p<0,05 respecto a CONTROL. CONTROL, n=10; HFD, n=12



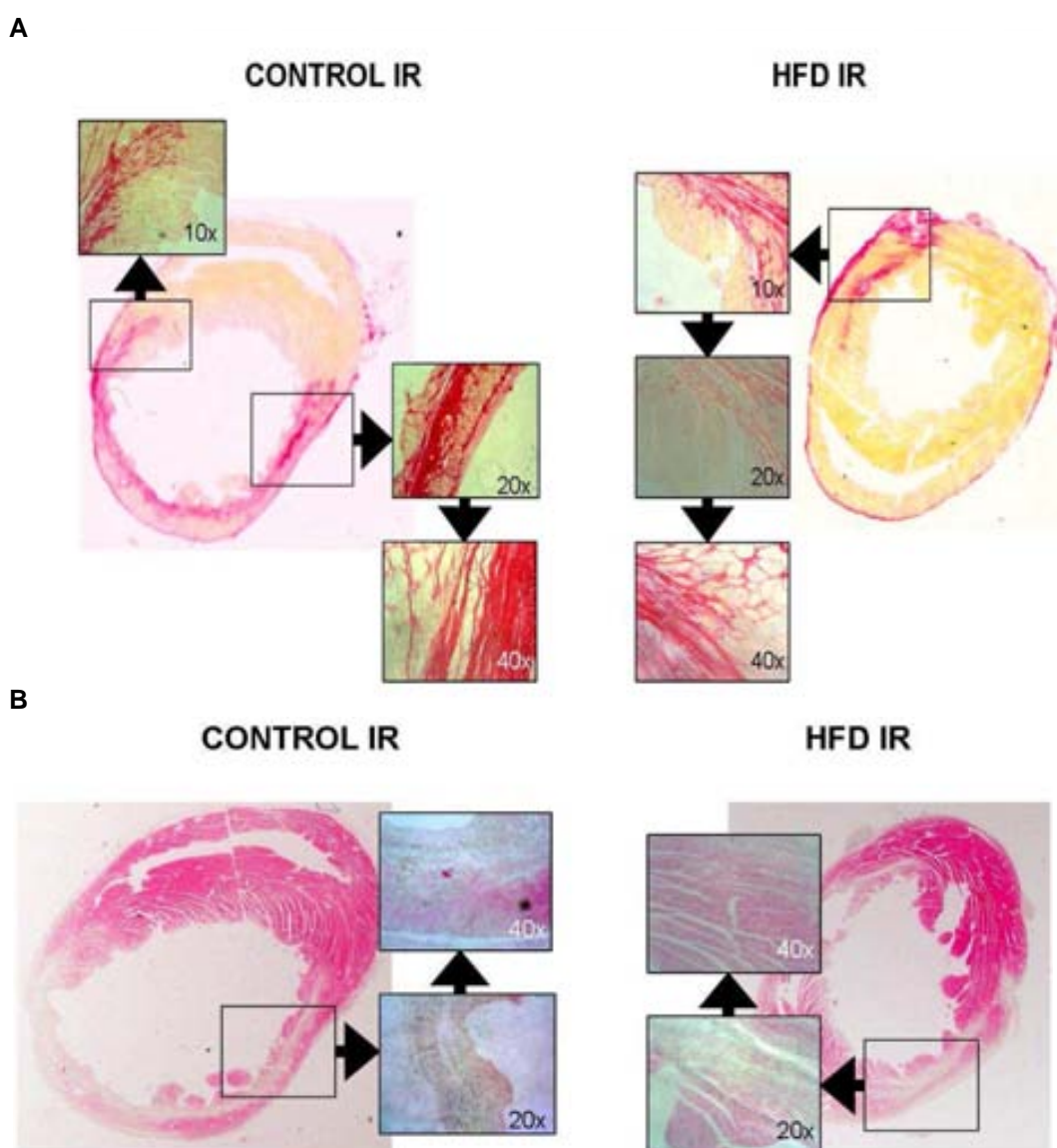
## IR 28d



**FIGURA 33. Análisis ecocardiográfico tras 28 días de reperfusión (IR 28d).** DVId, diámetro telediastólico del ventrículo izquierdo; DVIs, diámetro telesistólico del ventrículo izquierdo; PPVId, diámetro de la pared posterior del ventrículo izquierdo en diástole; SVId, grosor del septum del ventrículo izquierdo en diástole; FE, fracción de eyección; FA, fracción de acortamiento. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM. \* $p < 0,05$  respecto a Sham. Control Sham, n=7; Control IR, n=14; HFD Sham, n=12; HFD IR, n=12.

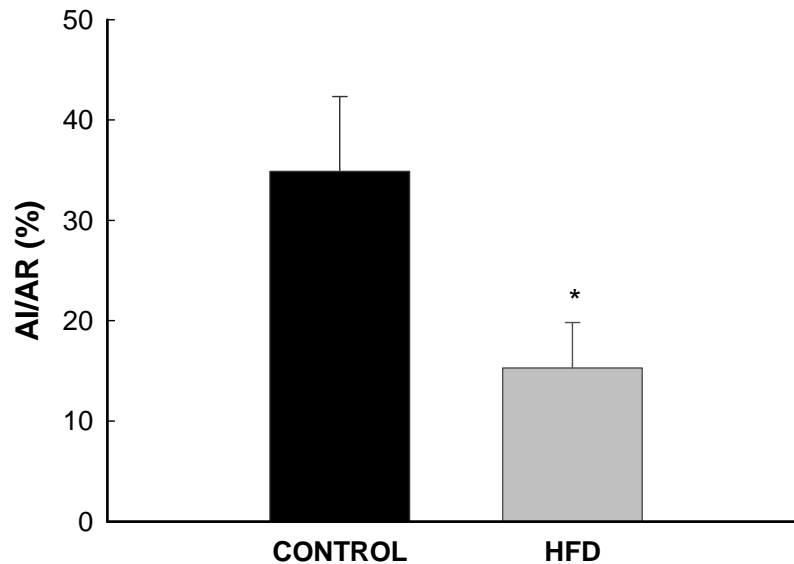
### 3.6. Determinación del área de infarto en ratones obesos

Tras 28 días de reperfusión, la cicatriz miocárdica madura quedó definida mediante una delgada franja de matriz extracelular de colágeno flanqueada por el tejido miocárdico no infartado. Las muestras de corazón teñidas con PSR mostraron un estrechamiento de la pared ventricular con dilatación del VI, tanto en ratones con dieta control como en ratones con dieta HFD, lo que se correspondería con un proceso agudo de RVA (Figura 34, A). La HE reflejó las zonas de acumulación de miofibroblastos formando una estructura fibrilar ausente en el miocardio no afectado por el IAM (Figura 34, B).



**FIGURA 34. Formación de la cicatriz y acumulación de fibras de colágeno.** Las secciones de corazón fueron obtenidas de animales con dieta HFD (HFD IR) y animales con dieta control (CONTROL IR) después de 28 días de reperfusión. **A**, secciones teñidas con picrosirius red (PSR). **B**, secciones teñidas con hematoxilina-eosina (HE).

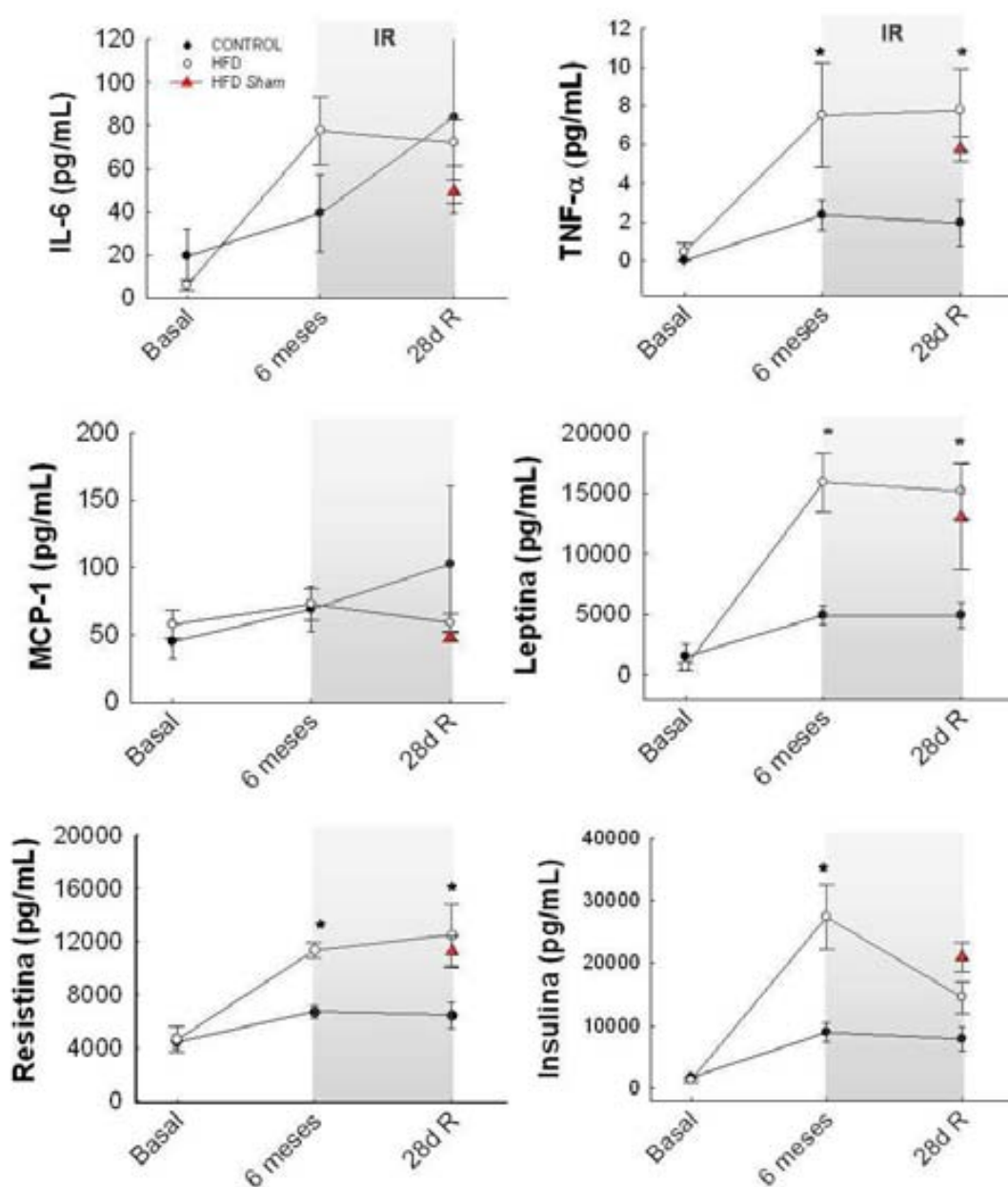
La valoración del AI a partir de los cortes histológicos marcados con PSR mostró una disminución significativa en el tamaño del infarto en los ratones con dieta HFD con respecto a los ratones con dieta control (Control,  $34,05 \pm 9,35\%$ ; HFD,  $15,57 \pm 4,63\%$ ;  $p = 0,021$ ) (Figura 35).



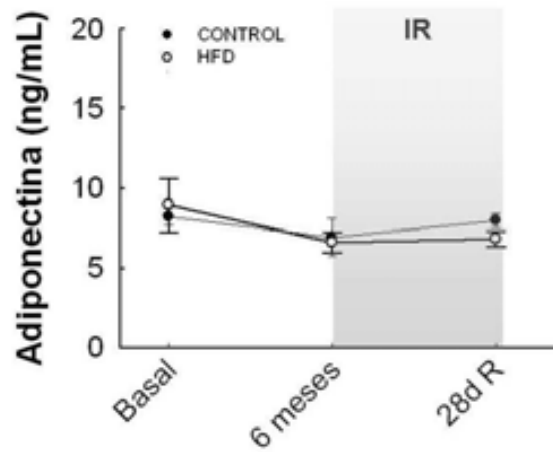
**FIGURA 35. Tamaño de infarto miocárdico en ratones alimentados con dieta control o dieta HFD tras 28 días de reperfusión.** La gráfica muestra el AI como porcentaje del AR (AI/AR) tras 28 días de reperfusión. Los datos corresponden a la media  $\pm$  SEM. CONTROL, n=17; HFD, n=17.

### 3.7. Determinación de los niveles de citoquinas, adipoquinas e insulina en ratones obesos

En los ratones BDF1 con dieta control y con dieta HFD, los niveles basales de citoquinas, adipoquinas e insulina fueron similares (Figura 36). La alimentación con dieta HFD durante 6 meses produjo un aumento en los niveles plasmáticos de insulina, leptina, resistina, TNF- $\alpha$  e IL-6 para ambos grupos experimentales, y al sexto mes estos niveles fueron significativamente mayores en ratones HFD comparados con los ratones con dieta control, con excepción para la IL-6 ( $p=0,092$ ). Estas diferencias se mantuvieron durante todo el periodo de reperfusión (Figura 36). Por el contrario, no se observaron diferencias significativas en los niveles de MCP-1 y adiponectina (Figura 36, Figura 37).



**FIGURA 36. Efecto de la alimentación con dieta HFD durante 6 meses en citoquinas (TNF- $\alpha$ , IL-6 y MCP-1), leptina, resistina e insulina.** Todos los compuestos fueron determinados en animales con dieta normal (CONTROL) y animales con dieta alta en grasas (HFD), todos ellos sometidos a un protocolo de 45 min de isquemia seguida de 28 días de reperusión (IR) o bien a un protocolo *Sham*. Se utilizó un kit enzimático con anticuerpos específicos expresando los datos como pg de compuesto por mL de suero. IL-6, interleucina 6. TNF- $\alpha$ , factor de necrosis tumoral  $\alpha$ . MCP-1, proteína quimioatrayente de monocitos 1. Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM mediante ANOVA. \* $p < 0,05$  respecto a CONTROL.  $n = 10$  por grupo.



**FIGURA 37. Efecto de la alimentación con dieta HFD durante 6 meses sobre la adiponectina en ratones BDF1.** La adiponectina fue determinada en animales con dieta normal (CONTROL) y animales con dieta alta en grasas (HFD), todos ellos sometidos a un protocolo de 45 min de isquemia seguida de 28 días reperusión (IR). Los datos corresponden a la media $\pm$ SEM. n=10 por grupo.



# **DISCUSIÓN**





## 1. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO *IN VIVO* DE ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

En la primera parte de esta tesis, se ha desarrollado un modelo de IR miocárdica *in vivo* en ratón mediante la ligadura transitoria de la arteria coronaria descendente anterior (ADA). Se ha conseguido una alta reproducibilidad y una mortalidad por debajo de la observada en la literatura (menor del 15%) (Michael et al., 1995).

Este procedimiento puede realizarse en un tiempo significativamente menor que otros procedimientos quirúrgicos de IAM gracias a la utilización del isoflurano como anestésico de inducción y mantenimiento (Michael et al., 1995). Como ejemplo, la oclusión transitoria de ADA se realiza en un tiempo inferior a 15 minutos una vez que el animal se encuentra anestesiado y con VMC. Cabe destacar que gracias a la rapidez del procedimiento, se produce un menor daño tisular, se reduce la inflamación y la aparición de arritmias cardíacas, y se obtiene una recuperación postcirugía mucho más rápida.

Son varias las ventajas que nos proporciona el modelo de IR *in vivo* murino con respecto a otros modelos experimentales. A diferencia de otros modelos menos fisiológicos, como por ejemplo, corazones aislados perfundidos en un sistema Langendorff o cultivos celulares, el modelo *in vivo* de IR miocárdica reproduce a nivel experimental de una manera más exacta la patología del IAM que se produce en pacientes. Otra de las ventajas a tener en cuenta del modelo es que posibilita la inducción de un IAM en grado variable dependiendo del criterio del investigador o de la naturaleza de cada protocolo experimental, y además, permite la administración aguda o crónica de drogas, fármacos u otras sustancias vía intraperitoneal (IP), intravenosa (IV) o subcutánea (SC) reduciendo la cantidad de droga necesaria con relación a otras especies de mayor tamaño usadas en protocolos *in vivo*. En nuestro laboratorio se lleva a cabo un protocolo de IR miocárdica *in vivo* porcino en el que se somete al animal a un período de reperfusión de 28 días. Sin embargo, llevar a cabo períodos prolongados de reperfusión en cerdos supone un elevado coste económico derivado de los complejos cuidados postoperatorios a los que es necesario someter al animal. En este trabajo se han realizado protocolos de IR en ratón con tiempos de reperfusión de hasta 28 días. Estos

tiempos prolongados de reperfusión permiten llevar a cabo estudios crónicos y analizar los mecanismos implicados en el remodelado ventricular tras el IAM, tal y como se ha realizado en este trabajo experimental. Por último, la principal ventaja del uso de ratones frente a otros animales de experimentación es la posibilidad de utilizar ratones transgénicos con el objetivo de examinar el impacto de la ausencia o la sobreexpresión del producto de un gen en la progresión del daño y la inflamación posteriores a la IR miocárdica (Chu et al., 2002). La disponibilidad de ratones modificados genéticamente otorga un gran potencial a este modelo experimental y abre un gran abanico de posibilidades a la experimentación en cardiología.

### **1.1. Isoflorano como anestésico de elección**

La cirugía de IR miocárdica *in vivo* en ratón requiere un tipo de anestesia específico que no interfiera de forma significativa con los parámetros cardíacos (FC y MAP). Basándonos en diversos estudios, hemos escogido el isoflorano como el anestésico inhalatorio en nuestro procedimiento experimental (Dardai and Heavner, 1989; Szczesny et al., 2004)

La anestesia inhalatoria usando isoflorano tiene una serie de ventajas que la hacen atractiva para la inducción y mantenimiento del plano anestésico en ratón: 1) fácil administración; 2) rápida inducción y reversión de la anestesia; 3) fácil control de la profundidad de la anestesia; y 4) mantenimiento de la MAP y la FC estables durante largos periodos de tiempo (Szczesny et al., 2004). Además, el isoflorano permite eliminar algunos problemas asociados con los anestésicos inyectables, como por ejemplo su larga vida media, la falta de agentes que reviertan el efecto anestésico en caso de sobredosis, o bien la relativa pequeña diferencia que existe para algunos de ellos entre la dosis letal y la dosis terapéutica.

A pesar de estas ventajas, los anestésicos halogenados como el isoflorano pueden alterar parámetros cardiovasculares provocando una hipercapnia, una acidosis moderada, una ligera depresión del gasto cardíaco y una disminución de la MAP por su acción directa sobre el músculo del corazón (Becker et al., 1984; Flecknell et al., 1999). En nuestro caso, las gasometrías arteriales tras 3 horas de anestesia descartaron la acidosis y la hipercadmia

( $pH=7,36\pm 0,03$ ), y la monitorización del animal durante la cirugía mostró valores de FC dentro de la normalidad ( $545,72\pm 4,83$  BPM).

## **1.2. Función ventricular en ratones tras un infarto agudo de miocardio**

Se han estudiado los cambios dinámicos en la función del VI y en las dimensiones de la cámara ventricular después de un IAM usando la ecocardiografía. A diferencia de otras técnicas terminales en las que se obtiene información en un único punto concreto del protocolo experimental, el estudio de la función ventricular mediante técnicas ecocardiográficas permite llevar a cabo estudios de forma seriada, no invasivos y no terminales (Gao et al., 2000). Además, los equipos ecocardiográficos actuales como el utilizado en nuestros estudios, son lo suficientemente sensibles como para ser útiles en el modelo de IR miocárdica en ratón (Yang et al., 1999).

El remodelado ventricular post IAM es un proceso progresivo que involucra la dilatación ventricular, el estrechamiento de la pared ventricular afectada por el infarto, y un estrechamiento compensatorio de la región no infartada (Sutton and Sharpe, 2000). Estos cambios pueden reflejarse en las alteraciones sufridas tras el IAM en los parámetros ecocardiográficos (Yang et al., 2002). Del mismo modo que se ha visto en la literatura, en nuestro modelo se produce un aumento en el volumen ventricular sistólico acompañado de una disminución de la FE tras 24 horas de reperfusión, datos que confirman el éxito de la oclusión coronaria (Finsen et al., 2005; Elrod et al., 2007; Thibault et al., 2007). Los cambios observados en los parámetros ecocardiográficos continúan en las medidas ecocardiográficas realizadas a los 7 y 28 días posteriores al IAM. Estos datos apoyan el proceso de RVA en nuestro modelo *in vivo* de IR miocárdica en ratón.

## **1.3. El área de infarto en el modelo de isquemia y reperfusión miocárdica en ratón**

El modelo de IR miocárdica *in vivo* murino fue descrito por primera vez por Michael et al., en 1995 (Michael et al., 1995). A pesar del gran interés que genera este modelo por la cada vez mayor disponibilidad de ratones

modificados genéticamente, su uso no está muy extendido debido a su dificultad técnica.

El área de infarto (AI) es la variable principal en este modelo experimental y es por ello que se hace imprescindible establecer un método de cuantificación reproducible. En nuestro método de procesado para la cuantificación del AI hemos optimizado las concentraciones de colorante y los tiempos de tinción, y hemos fijado una serie de criterios de tratamiento del tejido con el fin de evitar errores en la medición. En la puesta a punto del modelo, se demuestra que pequeñas variaciones en el método de procesado de las lonchas de corazón, como pueden ser un excesivo calentamiento de la solución de tinción, o un excesivo enfriamiento del tejido cardíaco, pueden alterar de manera significativa los valores finales del AI.

Debido al gran número de variables dentro del protocolo experimental, los datos de AI entre diferentes laboratorios no se pueden comparar directamente. El tamaño del infarto depende de la duración del periodo isquémico siguiendo una relación de tipo sigmoideo. Los estudios realizados por el grupo de Michael et al., demuestran que en ratones sometidos a un tiempo de oclusión coronaria de entre 30 y 60 minutos se produce un aumento lineal del tamaño del infarto en función del tiempo de isquemia (Michael et al., 1995; Michael et al., 1999). Sin embargo, cuando el tiempo de oclusión es superior a los 60 minutos se pierde esta relación y se alcanzan valores de más del 60% del AI/AR que provocan una mortalidad muy elevada (más del 50%) (Xu et al., 2006). Por el contrario, si la oclusión es inferior a los 30 minutos, los valores de AI/AR son pequeños. En nuestro modelo de IR miocárdica *in vivo* en ratón hemos utilizado un tiempo de isquemia de 45 minutos que nos ha permitido obtener valores de AI/AR en torno al 30-40%, siendo similares a los obtenidos en la literatura y compatibles con una baja mortalidad durante la fase aguda de la reperfusión (Redel et al., 2008).

El tiempo de reperfusión mínimo establecido en los modelos *in vivo* para poder determinar el tamaño del infarto mediante técnicas como el TTC es de 2 horas, si bien se ha propuesto que el AI puede variar de manera más tardía como consecuencia de los procesos de inflamación y remodelado (Mezzaroma et al., 2011; Luther et al., 2013). Nuestro estudio pone a prueba la hipótesis de que la mayor parte de la muerte de los cardiomiocitos se produce durante las

primeras horas de reperfusión y para ello se ha analizado la evolución del tamaño del infarto en función del tiempo de reperfusión (García-Dorado et al., 1987; García-Dorado et al., 2004; García-Dorado et al., 2009). Los resultados obtenidos en nuestro modelo de IR miocárdica *in vivo* en ratón, demuestran que la extensión del tamaño del infarto obtenido tras 45 minutos de isquemia no varía de manera significativa con el tiempo de reperfusión (IR 2h:  $32,74 \pm 2,34\%$ ; IR 24h:  $33,84 \pm 3,26\%$ ; IR 7d:  $29,48 \pm 2,68\%$ ; IR 28d:  $30,52 \pm 4,13\%$ ). Estos valores han sido similares a los obtenidos por otros grupos y confirman que la muerte celular tras una oclusión transitoria tiene lugar durante las primeras horas de reperfusión (Jones et al., 1999; Michael et al., 1999; Mayr et al., 2004; Redel et al., 2008).

## **2. DETERMINACIÓN DE LA CONTRIBUCIÓN DE LA MUERTE POR APOPTOSIS AL DAÑO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

### **2.1. La vía de activación clásica de la apoptosis no interviene de forma significativa en la muerte celular tras un episodio de isquemia y reperfusión miocárdica**

Si bien en un primer momento se consideró que la muerte de los cardiomiocitos que tiene lugar durante un periodo de IR ocurría exclusivamente en forma de necrosis, a partir del trabajo de Gottlieb et al., se propuso que la apoptosis también participa en la muerte de los cardiomiocitos que tiene lugar durante la reperfusión miocárdica (Gottlieb et al., 1994). Algunos grupos de investigación incluso han mantenido que la apoptosis es la principal causa de muerte celular tanto en animales experimentales como en patologías crónicas del corazón humano (Anversa and Kajstura, 1998).

Existen estudios que proponen que la duración de la isquemia miocárdica se relaciona con la tasa de necrosis y que la duración de la reperfusión lo hace con la tasa de apoptosis (Gottlieb et al., 1994; Anversa et al., 1998; Dumont et al., 2000; Hofstra et al., 2000). Sin embargo, la contribución relativa de la apoptosis al daño por IR, así como el momento de su activación continúan siendo debatidos. Se ha sugerido que la apoptosis comienza durante el periodo de isquemia y se completa en la reperfusión (Freude et al., 2000; Rodriguez et al., 2002). Por el contrario, los estudios de Gottlieb et al., realizados en modelos de isquemia regional en conejo, han propuesto que la apoptosis forma parte del daño por reperfusión y no se inicia en el periodo de isquemia debido a que es un proceso dependiente de ATP (Gottlieb et al., 1994). También se ha sugerido que el AI aumenta con el tiempo de reperfusión, debido, al menos en parte, a la muerte celular por apoptosis, y que además, este proceso apoptótico puede intervenir en los mecanismos de RVA mediante su contribución a la expansión del infarto (Narula et al., 1996; Redel et al., 2008).

Por otra parte, otros estudios han defendido que la apoptosis no es un fenómeno de importancia en la muerte celular tras un proceso de IR (Ohno et

al., 1998; Kanoh et al., 1999; Knaapen et al., 2001). En esta línea, diferentes estudios han propuesto mediante la utilización de corazones aislados de rata reperfundidos en sistema Langendorff y cardiomiocitos aislados, que la isquemia modifica la expresión de genes implicados en el proceso apoptótico generando un patrón antiapoptótico durante el periodo de isquemia (Hofstaetter et al., 2002; Garcia-Dorado et al., 2004; Garcia-Dorado et al., 2009). Más recientemente, se ha descrito que los genes que controlan las vías de muerte celular dependientes de las caspasas son silenciados en las etapas tempranas del desarrollo postnatal (Bahi et al., 2006; Sanchis et al., 2008). Estos trabajos apoyarían la idea de que la muerte postmitótica de los cardiomiocitos es un evento independiente de las caspasas y estarían en contra de la apoptosis como mecanismo principal de muerte celular durante la IR. Por otro lado, en nuestro modelo experimental de IR miocárdica en ratón hemos demostrado que el tamaño del infarto se establece durante las primeras horas de reperfusión, resultados que contradicen la posible participación de la muerte por apoptosis en la expansión del infarto asociada a la prolongación del tiempo de reperfusión.

En este trabajo experimental, hemos utilizado un nuevo modelo de ratón con delección cardioespecífica para las caspasas efectoras 3 y 7 (ratones Casp 3/7), que nos ha permitido estudiar la contribución de la apoptosis a la muerte de los cardiomiocitos que tiene lugar durante la IR. Los resultados de nuestro estudio han demostrado que las vías de activación de la apoptosis en las que intervienen las caspasas efectoras 3 y 7 no modifican el tamaño del IAM, lo que descartaría la contribución de la apoptosis a la muerte celular de los cardiomiocitos durante la reperfusión y confirmaría que esta muerte se produce principalmente por mecanismos de necrosis (Garcia-Dorado et al., 2004; Garcia-Dorado et al., 2009). Además, la ausencia de diferencias en el deterioro de la función ventricular y en el tamaño de la cicatriz de colágeno formada en los ratones Casp 3/7 con respecto a los WT al finalizar el periodo de 28 días de reperfusión, también descarta un papel relevante de la muerte por apoptosis en la progresión del RVA en nuestro modelo.

Las razones de las discrepancias existentes sobre el papel de la apoptosis en la patología cardíaca son múltiples y principalmente se relacionan con las técnicas y los métodos de medida de la apoptosis. Básicamente, los

estudios que sugieren que la apoptosis contribuye de manera relevante a la muerte celular se han realizado utilizando homogenados de tejido total en los que la apoptosis se cuantifica en un conglomerado celular que no distingue la apoptosis en los cardiomiocitos de otros tipos celulares en los que sí existe actividad caspasa (Kanoh et al., 1999; Kostin and Schaper, 2001); se han utilizado cardiomiocitos neonatales no diferenciados que todavía expresan caspasa 3 y caspasa 7 y no reflejan la realidad del cardiomiocito adulto diferenciado (Song et al., 2012); se han usado inhibidores inespecíficos de la apoptosis o de proteínas implicadas en las vías de activación apoptóticas que también actúan sobre otras proteínas como es el caso de las calpaínas, proteasas implicadas en la muerte celular por necrosis (Lee et al., 2003); hasta la fecha no se disponía de modelos genéticos que presentaran alteraciones cardioespecíficas en la expresión de proteínas implicadas en la apoptosis, por lo que los estudios realizados se han basado en animales modificados genéticamente a nivel celular global (Elsasser et al., 2000); y por último, el uso de técnicas clásicas como el ensayo TUNEL para la detección y cuantificación de la apoptosis ha demostrado que además de apoptosis, puede ser positivo para núcleos oncóticos o núcleos en proceso de reparación del DNA (Ohno et al., 1998; Kanoh et al., 1999)



### **3. EFECTO DE LA OBESIDAD SOBRE EL DAÑO MIOCÁRDICO POR ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN**

La cardiopatía isquémica se desarrolla como consecuencia de la aparición de diferentes factores de riesgo etiológicos en coexistencia con otras patologías. Estos factores pueden dificultar la traslación a la práctica clínica de estrategias desarrolladas con éxito en el ámbito experimental para la prevención y el tratamiento de la cardiopatía isquémica. Debido a que la obesidad alcanza grado de epidemia en los países desarrollados y a su importancia clínica como factor de riesgo asociado al IAM, hemos estudiado si la obesidad modifica el RVA y la función ventricular, usando para ello un modelo de obesidad inducida por dieta alta en grasas (HFD). Nuestro modelo ha desarrollado obesidad en ausencia de hiperglucemia e hipertensión arterial, y ha mostrado un aumento de la tolerancia del miocardio al daño por IR reflejado en una reducción de la dilatación ventricular, del área de fibrosis, y una mejora en la función ventricular tras un período de reperfusión prolongado en comparación con los animales de peso normal. Estos datos apoyarían la existencia de la paradoja de la obesidad y sugieren que los cambios observados en los niveles de citoquinas y adipocinas en los ratones obesos podrían ser los responsables de este fenómeno.

#### **3.1. El ratón BDF1 desarrolla una obesidad inducida por dieta alta en grasas en ausencia de comorbilidades asociadas**

La existencia de la paradoja de la obesidad en pacientes con IAM es controvertida. En la literatura existen tanto estudios epidemiológicos que asocian la obesidad con un mejor pronóstico y un menor tamaño del infarto, como estudios en los que se observa un claro efecto negativo (Horwich et al., 2001; Kenchaiah et al., 2002; Wilson et al., 2002; Cepeda-Valery et al., 2013). Uno de los posibles motivos que pueden explicar estas discrepancias radica en el hecho de que la obesidad se encuentra asociada de forma frecuente con otras comorbilidades como hipertensión, DM-2 o dislipidemia, que por si mismas actúan como factores de riesgo cardiovascular y hacen que sea muy complicado interpretar la contribución aislada de la obesidad (Nguyen and Lau, 2012).

Con el objetivo de determinar si la obesidad modifica la tolerancia del miocardio al daño por IR, en este estudio se ha generado un modelo de obesidad inducida por dieta HFD en ausencia de otros factores de riesgo que suelen encontrarse asociados en los pacientes obesos. En este modelo, los ratones BDF1, alimentados durante seis meses con una dieta rica en grasas que simula la dieta hipercalórica que junto con el sedentarismo son los principales factores causantes de la obesidad en los países desarrollados, generan de manera progresiva una obesidad que presenta algunos de los signos del síndrome metabólico: hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipercolesterolemia, aumento de los depósitos de grasa visceral y resistencia a la insulina. Sin embargo, aunque se ha descrito el ratón BDF1 alimentado con una dieta HFD como un modelo de DM-2, en nuestro estudio no desarrolla hiperglucemia a los 6 meses de alimentación con dieta HFD (Karasawa et al., 2009).

La obesidad está relacionada de forma directa con la hiperglucemia, la resistencia a la insulina y el desarrollo de DM-2 (Winzell and Ahren, 2004; Bugger and Abel, 2009; Collins et al., 2010). Nuestro modelo presenta resistencia a la insulina en ausencia de hiperglucemia, mostrando un aumento moderado de la glucemia hasta el quinto mes de alimentación con dieta HFD seguido de un descenso progresivo de los niveles de glucosa. Estos resultados están de acuerdo con un estudio previo en el que no se observó hiperglucemia o empeoramiento de la tolerancia a la glucosa cuando se examinó el metabolismo glucídico en ratones BDF1 alimentados con dieta HFD durante un año (Hull et al., 2005). Determinados estudios han sugerido que los lípidos presentes en la dieta HFD serían los responsables de desarrollar y mantener la resistencia a la insulina (Black et al., 1998; Harte et al., 1999). En nuestro modelo, la resistencia a la insulina detectada está relacionada con el mayor contenido de grasa visceral y la hiperinsulinemia observada en los ratones obesos.

Existen numerosos estudios que mantienen que la obesidad inducida por dieta HFD se acompaña de hipertensión arterial que a su vez sería la causante del desarrollo de hipertrofia cardíaca (Kaufman et al., 1991; Mills et al., 1993; Montani et al., 2002). Se ha postulado que el aumento en los niveles de ácidos grasos libres, leptina e insulina, son los responsables de la hipertensión

observada en la obesidad, dado que pueden actuar de forma individual y de forma sinérgica estimulando la actividad simpática y generando vasoconstricción. Además, la resistencia a la insulina mediante la estimulación del sistema nervioso simpático y la retención de sodio renal, puede intervenir como amplificador de la respuesta vasoconstrictora (Montani et al., 2002). En contraposición, el modelo desarrollado en este estudio no presenta hipertensión arterial. Además, los resultados que hemos obtenido en el estudio de la contractilidad en anillos aórticos aislados indicando la ausencia de disfunción endotelial, concuerdan con este estado normotenso.

En la literatura, los estudios analizando los efectos de la obesidad sobre el miocardio son escasos y presentan evidencias tanto a favor como en contra de su contribución al desarrollo de hipertrofia y disfunción cardíaca (Thakker et al., 2006; Wang et al., 2012). En nuestro estudio, el análisis de la función ventricular mediante técnicas ecocardiográficas mostró un aumento progresivo de los diámetros diastólicos y del septum interventricular, sin cambios significativos en la FE y en la FA a lo largo de los seis meses de alimentación. Sin embargo, este aumento en los diámetros ventriculares se produjo de forma independiente al tipo de dieta recibido, con lo que se concluye que el aumento a largo plazo en la ingesta de grasas no induce el remodelado cardíaco o la disfunción ventricular. Estos resultados concuerdan con el estado normotenso de nuestros ratones observado a lo largo de todo el estudio. Además, se ha propuesto que la hipertrofia cardíaca podría estar relacionada con la hiperglucemia mediante mecanismos asociados con un aumento en la producción miocárdica de angiotensina II (Singh et al., 2008). De acuerdo con esto, la ausencia de hiperglucemia en nuestro modelo podría contribuir a explicar la falta de cambios en la función y morfología cardíacas, a diferencia de otros modelos de obesidad en los que si se produce un aumento de los niveles de glucosa plasmática. De forma global, nuestros datos indican que estamos ante un modelo de obesidad inducida por dieta HFD en ausencia de hipertensión, disfunción endotelial, hipertrofia e hiperglucemia.

Finalmente, durante el tiempo de estudio en nuestro modelo, no se produjo un aumento de la mortalidad en los animales obesos antes de la IR con respecto a los animales de peso normal. En conjunto, nuestros datos, de la misma forma que se ha visto en estudios recientes (Calligaris et al., 2013;

Donner et al., 2013), no permiten confirmar que la obesidad en ausencia de otras comorbilidades aumente el riesgo cardiovascular.

### **3.2. La obesidad inducida por dieta alta en grasas disminuye el tamaño del infarto: se cumple la paradoja de la obesidad**

Existe una gran controversia sobre el efecto que ejerce la obesidad en el miocardio isquémico humano. Se ha demostrado una relación directa entre la obesidad y la cardiopatía isquémica tras un IAM (Kenchiah et al., 2002; Wilson et al., 2002). Sin embargo, en la literatura también existen estudios que apoyan el efecto beneficioso de la obesidad sobre el miocardio infartado (Horwich et al., 2001; Lavie et al., 2003; Fonarow et al., 2007; Arena et al., 2009; Bucholz et al., 2012). Estas discrepancias hacen que por el momento, no se tengan evidencias clínicas sólidas de que la obesidad modifique la tolerancia del miocardio al daño por IR.

Los intentos de dar una respuesta al papel de la obesidad sobre el miocardio mediante el uso de modelos experimentales han dado resultados contradictorios. En la gran mayoría de estos estudios se ha observado que los ratones obesos, con dislipemia y resistencia a la insulina son más propensos a los efectos del daño por IR (Thakker et al., 2006; Thakker et al., 2008; Clark et al., 2010; Liu and Lloyd, 2013). En estos estudios los animales obesos presentan un mayor tamaño del infarto, un mayor deterioro de la función ventricular tras la reperfusión, una mayor respuesta inflamatoria, un aumento del RVA y un aumento de la masa ventricular izquierda. El análisis de los efectos a corto plazo de la dieta usando modelos de rata con obesidad inducida por dieta suplementada con sucrosa y leche condensada, mostró una peor recuperación funcional postisquemia a pesar de un menor tamaño del infarto en comparación con los controles. Todos estos estudios analizan el daño agudo por IR utilizando protocolos de IR agudos (con tiempos cortos de reperfusión) y tienen en común el uso de modelos experimentales que se alejan fisiológicamente de lo que ocurre en los humanos, como por ejemplo el sistema Langendorff, los cultivos celulares o los protocolos de isquemia miocárdica permanente. Se ha observado que la prolongación del periodo de reperfusión favorece el remodelado ventricular y el fallo cardíaco tras un IAM, aumentando la fibrosis intersticial del miocardio no infartado en un modelo de DM-2 inducido

por dieta HFD (Matsushima et al., 2009). Por el contrario, en nuestro estudio hemos analizado los efectos de la obesidad en ausencia de hiperglucemia e hipertensión y con resistencia a la insulina, en la función ventricular y el RVA usando un modelo *in vivo* de ratón sometido a una oclusión coronaria transitoria seguida de un tiempo prolongado de reperfusión. Los resultados obtenidos, paradójicamente mostraron una mejor función ventricular tras el IAM, un menor RVA, reflejado en una menor cantidad de colágeno como se ha visto mediante la tinción PSR, y una disminución del tamaño del infarto, datos que confirmarían la existencia del fenómeno de la paradoja de la obesidad. En la literatura, existe un único estudio que ha analizado los efectos de la obesidad en el RVA tras un período corto de reperfusión (siete días) sin la presencia de datos ecocardiográficos morfológicos y funcionales. Este estudio determina que la obesidad empeora el RVA basándose en una reducción de la deposición de colágeno en la cicatriz del infarto, y en un aumento del volumen telediastólico medido mediante análisis histológico cuantitativo (Thakker et al., 2006).

En concordancia con nuestros datos, existen dos estudios recientes en animales con obesidad inducida por dieta que apoyarían los resultados a favor de la paradoja de la obesidad (Huisamen et al., 2012; Donner et al., 2013). Sin embargo, se debe tener en consideración que estos trabajos utilizan dietas ricas en carbohidratos que no reflejan la composición de las dietas occidentales ricas en grasas y difieren en los efectos adversos que pudieran tener las grasas sobre el miocardio. Además, en estos estudios positivos los animales no desarrollaron resistencia a la insulina, mecanismo que se ha sugerido como determinante en la fisiopatología cardíaca en obesidad.

Se ha propuesto mediante el uso de un modelo de rata con obesidad inducida por dieta rica en carbohidratos que la resistencia a la insulina derivada de la obesidad podría ser el principal desencadenante del aumento de la susceptibilidad del miocardio al daño por IR, y que la obesidad por si misma podría tener el efecto contrario en ratas insensibles a la insulina mediante la activación de la vía de señalización RISK-NO (Wensley et al., 2013). Sin embargo, mientras que nuestro estudio apoya la existencia de la paradoja de la obesidad en ratones con obesidad inducida por dieta, los efectos cardioprotectores han sido observados en un modelo que combina obesidad y resistencia a la insulina. A pesar de que la resistencia a la insulina se ha visto

que puede causar disfunción endotelial y por lo tanto, influenciar negativamente en la susceptibilidad del miocardio al daño por IR, un estudio reciente ha demostrado mediante el uso de un modelo de ratón con disfunción de los receptores de insulina (*Endothelial Specific Mutant Insulin Receptor Over-expressing*, ESMIRO), que la resistencia a la insulina en el endotelio vascular podría proteger frente al daño por reperfusión (Sharma et al., 2014).

### **3.3. Posibles mecanismos cardioprotectores en la obesidad**

En estudios previos se ha establecido que el tejido adiposo y los macrófagos infiltrados residentes funcionan, no solo como un almacén de lípidos, sino también como un órgano endocrino activo y parte del sistema inmune secretando hormonas y péptidos proinflamatorios (Olefsky and Glass, 2010). Las citoquinas circulantes liberadas por los adipocitos pueden ejercer su efecto en múltiples órganos, incluyendo el corazón.

Dentro del tejido adiposo, la grasa visceral está asociada con la producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, PCR, resistina y leptina. En el escenario de la obesidad, la regulación en la síntesis y secreción de estas sustancias se ve modificada produciéndose un aumento en los niveles plasmáticos de citoquinas como TNF- $\alpha$ , IL-6 o MCP-1, de adipoquinas como la resistina o la leptina, y un descenso en los niveles de adiponectina (Vendrell et al., 2004). También en el contexto de la obesidad se produce un aumento en la secreción de insulina, que como consecuencia de diversos factores tales como la lipotoxicidad, desencadena la resistencia a la insulina. En nuestro modelo de ratón obeso, al igual que se ha descrito anteriormente, tras seis meses de alimentación con dieta HFD se confirma un aumento significativo de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , IL-6, leptina y resistina, que no han sufrido modificaciones significativas tras el protocolo de IR, y el desarrollo de hiperinsulinemia relacionada con la resistencia a la insulina. Además, la resistencia a la insulina observada en nuestro modelo descarta este factor como determinante en la respuesta a la IR tal y como se ha propuesto recientemente (Donner et al., 2013). De acuerdo con nuestros datos podemos sugerir que los cambios en la producción de citoquinas y adipoquinas observados en los ratones HFD antes de la isquemia, podrían activar mecanismos endógenos de cardioprotección que serían los responsables del aumento de la tolerancia del miocardio al daño por IR.

Tras un IAM, se produce una respuesta inflamatoria y un aumento en la síntesis de citoquinas que se suma al proceso inflamatorio leve que desarrolla la obesidad. El grado de la respuesta inflamatoria está directamente relacionado con la reparación del tejido cardíaco dañado y el RVA. Las consecuencias de los efectos de las citoquinas inflamatorias pueden ser positivas, lo que favorece la recuperación de la función ventricular si el infarto es leve y de corta duración, o negativas, dando lugar a la rotura cardíaca aguda o la dilatación ventricular crónica que causarán la insuficiencia cardíaca (Nian et al., 2004). Tras un período de isquemia de 45 minutos seguido de 28 días de reperfusión, nuestros ratones obesos han mantenido niveles elevados de TNF- $\alpha$ , leptina y resistina, incluso aumentando con respecto a las medidas observadas tras el periodo de seis meses de alimentación con dieta HFD. Esto probablemente sea debido a un efecto aditivo de la unión del proceso inflamatorio como consecuencia del IAM con la inflamación crónica desencadenada por la obesidad.

Determinados estudios relacionan las alteraciones en los niveles de citoquinas, adipoquinas e insulina con efectos beneficiosos en el miocardio tras un período de isquemia transitoria (Berg and Scherer, 2005). Estas alteraciones podrían formar parte de los mecanismos implicados en el desarrollo de la paradoja de la obesidad. En el caso del TNF- $\alpha$  y la IL-6 se ha demostrado que el aumento en sus niveles asociado con la obesidad incrementa el riesgo de IAM en hombres (Ridker et al., 2000). También se ha descrito que el aumento sostenido y prolongado en la expresión de estas citoquinas en ratones obesos se correlaciona con el RVA (Thakker et al., 2006). Por el contrario, aunque en nuestro trabajo el aumento en los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$  e IL-6 confirma un estado proinflamatorio en ratones obesos antes del episodio isquémico, esto podría estar relacionado con un menor RVA tras el IAM.

Diversos estudios han propuesto que el TNF- $\alpha$  podría tener un efecto dual, es decir, disminuye el tamaño del infarto tras la IR a bajas concentraciones, mientras que ejerce efectos adversos sobre el miocardio a concentraciones más elevadas (Smart et al., 2006; Schulz and Heusch, 2009; Lacerda et al., 2012). Mediante el uso de un modelo de ratón deficiente para TNF- $\alpha$ , se ha sugerido un efecto cardioprotector del TNF- $\alpha$  en obesidad inducida por dieta que podría estar relacionado con la activación de la vía de

señalización SAFE (Lecour, 2009; Lacerda et al., 2012). Además, existe una fuerte correlación entre los niveles plasmáticos de leptina y TNF- $\alpha$  que ha dado pie a proponer que el TNF- $\alpha$  podría influenciar la actividad de la leptina mediante la regulación de la expresión de su receptor (Gan et al., 2012).

En obesidad se produce un marcado aumento en los niveles plasmáticos de leptina que se cree que contribuye a la resistencia a la insulina (Ren, 2004). Aunque algunos trabajos sugieren que la leptina favorece la hipertrofia e interviene en el daño por reperfusión, existen evidencias de que la leptina puede intervenir en la cardioprotección mediante la activación de las vías de señalización RISK y STAT, y a través de la inhibición del mPTP (Rajapurohitam et al., 2003; Ren, 2004; Smith et al., 2006; Ren et al., 2010; Smith et al., 2010; Smith and Yellon, 2011). Estos efectos beneficiosos de la leptina han llevado a sugerir que podría contribuir a explicar la paradoja de la obesidad observada en pacientes (Karmazyn et al., 2008), y por tanto nuestros resultados.

Por el contrario, los niveles altos de resistina que se han obtenido en nuestro modelo y que en la literatura han sido asociados con un aumento del riesgo cardiovascular, la disfunción endotelial y mayores efectos adversos tras un IAM, no parecen influir de forma negativa en la cardioprotección desarrollada en nuestros ratones obesos, y por lo tanto, es posible que la resistina no forme parte de los mecanismos moleculares causantes del efecto paradójico de la obesidad (Mattu and Randeve, 2013).

Para el caso de la adiponectina, los bajos niveles plasmáticos de esta adipocina que se detectan en obesidad se han relacionado con patologías cardíacas como la enfermedad coronaria, la hipertensión o el IAM (Pischon et al., 2004). Sin embargo, la adiponectina también ha demostrado limitar el tamaño del infarto mediante la vía AMPK y actuar frente al RVA a través del aumento en la supervivencia del miocardio y la disminución en la fibrosis cardíaca (Shibata et al., 2007; Gonon et al., 2008; Debinski et al., 2011). En la literatura, se ha descrito que la insulina es capaz de inhibir la secreción de adiponectina y que existe una relación inversa entre los niveles circulantes de insulina y adiponectina (Ng et al., 2012). En nuestros ratones este efecto no se observa ya que presentan niveles normales de adiponectina cuando lo descrito en obesidad, y mediado en parte por la insulina, es que se produzca una disminución en los niveles plasmáticos de esta adipocina. La preservación de



los niveles plasmáticos de adiponectina en nuestro modelo podría ser otro de los factores responsables del menor RVA y la menor fibrosis que este presenta.

Los ratones HFD muestran un aumento significativo en los niveles plasmáticos de insulina antes de la isquemia. Existen evidencias sólidas de que la insulina puede modular el daño por IR (Ji et al., 2010; Wong et al., 2011). Así mismo, diferentes estudios experimentales y clínicos han demostrado la eficacia de la administración de insulina junto con glucosa y potasio (terapia GIK, glucosa-insulina-potasio) (Sodi-Pallares et al., 1962; Sack and Yellon, 2003; Ng et al., 2012). Además, se ha mostrado que la insulina y no la glucosa ni el potasio, puede activar la vía de señalización PI3K/Akt/eNOS potenciando la producción de óxido nítrico (NO) y favoreciendo la cardioprotección (Jonassen et al., 2001; Yu et al., 2011; Ng et al., 2012). Se ha descrito también que la insulina disminuye la necrosis de los cardiomiocitos causada por el estrés mecánico mediante la activación de la vía PI3K/Akt y la reducción en la síntesis de RLO, ambos efectos minimizados cuando los niveles de glucosa son elevados (Teshima et al., 2010). Por lo tanto, podríamos sugerir que nuestros niveles elevados de insulina plasmática en los ratones HFD previos al proceso de isquemia, podrían haber preconditionado el miocardio aumentando su tolerancia frente al daño por IR.

Tomando nuestros datos en conjunto, las evidencias experimentales sugieren que la alteración en los niveles de citoquinas y adipocinas observados en los ratones HFD podrían ser responsables de los efectos cardioprotectores observados. Los trabajos futuros se centrarían en la identificación de forma más directa del factor específico y los mecanismos moleculares que podrían contribuir a la cardioprotección observada.



# **RESUMEN DE RESULTADOS Y CONCLUSIONES**



## RESUMEN DE RESULTADOS

### **1) Desarrollo de un modelo murino *in vivo* de isquemia y reperfusión miocárdica**

- 1.1) El isoflurano fue el agente anestésico escogido en el modelo murino gracias a su rápido efecto inductor, así como a la pronta reversión de la anestesia que ejerce.
- 1.2) La realización de la oclusión transitoria de ADA mediante un nudo doble y un tubo PE-50 interpuesto entre la coronaria y el hilo de sutura permitió una adecuada reperfusión.
- 1.3) La elevación del segmento ST en el ECG junto con la palidez y la hipoquinesia de la región isquémica permitió verificar el éxito de la oclusión.
- 1.4) La obtención de valores similares de AR para todos los protocolos de IR constata la reproducibilidad de la técnica de oclusión.
- 1.5) La mortalidad por IAM en ratón se situó en torno al 15%, estando este porcentaje por debajo de la mortalidad descrita por otros autores.
- 1.6) Las técnicas ecocardiográficas nos permitieron valorar a partir de las 24 horas de reperfusión con seguridad y una alta reproducibilidad cambios en la función y morfología ventricular.
- 1.7) No existen diferencias significativas en el tamaño del infarto medido a las 2 horas, las 24 horas, los 7 días y los 28 días de reperfusión, demostrándose que la muerte por IR se produce de manera aguda durante las primeras horas de reperfusión.

### **2) Determinación de la contribución de la muerte por apoptosis al daño por isquemia y reperfusión**

- 2.1) No se produjeron diferencias significativas en la mortalidad entre los protocolos de 24 horas y 28 días de reperfusión, ni entre los animales control y Casp3/7.
- 2.2) La ausencia de las caspasas 3 y 7 en cardiomiocitos adultos no provoca alteraciones morfológicas ni funcionales en el miocardio.

- 2.3) La depleción de las caspasas 3 y 7 no modifica de manera significativa el tamaño del infarto cuantificado tras 24 horas o 28 días de reperfusión con respecto a los animales control.

### **3) Efecto de la obesidad sobre el daño miocárdico por isquemia y reperfusión.**

- 3.1) Los ratones BDF1 desarrollan obesidad inducida por dieta alta en grasas en ausencia de hipertensión arterial, disfunción endotelial y presentando algunos de los signos del síndrome metabólico de forma progresiva: hiperinsulinemia, hiperleptinemia, hipercolesterolemia, aumento de los depósitos de grasa visceral y resistencia a la insulina.
- 3.2) En nuestro modelo de ratón obeso tras seis meses de alimentación con dieta alta en grasas se observó un aumento de los niveles plasmáticos de TNF- $\alpha$ , leptina, resistina, e insulina y una ausencia de cambios significativos en los niveles plasmáticos de MCP-1, IL-6 y adiponectina.
- 3.3) La dieta alta en grasas no provoca alteraciones en la morfología ni en la función ventricular en ratones obesos.
- 3.4) No se produjeron diferencias significativas en la mortalidad tras la IR entre los ratones obesos y los ratones alimentados con dieta estándar.
- 3.5) El estudio ecocardiográfico mostró que los ratones obesos presentan menor disfunción ventricular tras un episodio de IR en comparación con los ratones de peso normal.
- 3.6) Los ratones obesos presentan un menor RVA con disminución del área de infarto tras la IR.

## CONCLUSIONES

A partir de estos resultados, se concluye que:

- 1) El modelo experimental desarrollado de isquemia y reperfusión miocárdica *in vivo* en ratones permite simular la fisiopatología del infarto agudo de miocardio con una elevada reproducibilidad y una baja mortalidad.
- 2) En nuestro modelo de isquemia y reperfusión miocárdica *in vivo* murino se confirma que el tamaño del infarto queda definido durante las primeras horas de reperfusión y no se modifica de manera significativa durante el mes siguiente.
- 3) Las vías de activación de la apoptosis en las que intervienen las caspasas efectoras 3 y 7 no contribuyen de manera apreciable a la muerte celular de los cardiomiocitos durante la reperfusión, siendo esta muerte principalmente por mecanismos de necrosis.
- 4) El ratón BDF1 desarrolla obesidad inducida por dieta alta en grasas en ausencia de hipertensión arterial y sin alteraciones en la morfología y la función del corazón.
- 5) Los ratones con obesidad inducida por dieta alta en grasas presentan tras un infarto agudo de miocardio una mejor función ventricular, un menor remodelado ventricular adverso reflejado en una menor cantidad de colágeno depositado en la zona de cicatriz y una disminución del área infartada. Estas observaciones apoyan fuertemente la existencia de lo que se ha denominado como la paradoja de la obesidad, la cual podría estar asociada a las propiedades cardioprotectoras relacionadas con la insulina y la sobreproducción de determinadas citoquinas y adipocinas, junto con la preservación de los niveles de adiponectina.

**En resumen, los resultados presentados describen un modelo murino de oclusión coronaria transitoria con una elevada reproducibilidad y fiabilidad, y demuestran mediante el uso de este modelo, que la apoptosis no desempeña un papel relevante en el infarto agudo de miocardio ni en el remodelado postinfarto, y que por el contrario, la presencia de obesidad, una comorbilidad frecuente en pacientes con infarto, sí que modula las consecuencias de la oclusión coronaria disminuyéndolas de forma paradójica.**





# **BIBLIOGRAFÍA**



Abdallah, Y., Kasseckert, S.A., Iraqi, W., Said, M., Shahzad, T., Erdogan, A., Neuhofer, C., Gunduz, D., Schluter, K.D., Tillmanns, H., *et al.* (2011). Interplay between Ca<sup>2+</sup> cycling and mitochondrial permeability transition pores promotes reperfusion-induced injury of cardiac myocytes. *J Cell Mol Med* 15, 2478-2485.

Abel, E.D., Litwin, S.E., and Sweeney, G. (2008). Cardiac remodeling in obesity. *Physiol Rev* 88, 389-419.

Alpert, M.A. (2001). Obesity cardiomyopathy: pathophysiology and evolution of the clinical syndrome. *Am J Med Sci* 321, 225-236.

Amenta, J.S., and Baccino, F.M. (1989). Proteolysis and cell death. *Revis Biol Celular* 21, 401-422.

Angeras, O., Albertsson, P., Karason, K., Ramunddal, T., Matejka, G., James, S., Lagerqvist, B., Rosengren, A., and Omerovic, E. (2013). Evidence for obesity paradox in patients with acute coronary syndromes: a report from the Swedish Coronary Angiography and Angioplasty Registry. *Eur Heart J* 34, 345-353.

Anversa, P., Cheng, W., Liu, Y., Leri, A., Redaelli, G., and Kajstura, J. (1998). Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 93 Suppl 3, 8-12.

Anversa, P., and Kajstura, J. (1998). Myocyte cell death in the diseased heart. *Circ Res* 82, 1231-1233.

Anversa, P., Olivetti, G., and Capasso, J.M. (1991). Cellular basis of ventricular remodeling after myocardial infarction. *Am J Cardiol* 68, 7D-16D.

Arena, R., Myers, J., Abella, J., Pinkstaff, S., Brubaker, P., Moore, B., Kitzman, D., Peberdy, M.A., Bensimhon, D., Chase, P., *et al.* (2009). Influence of etiology of heart failure on the obesity paradox. *Am J Cardiol* 104, 1116-1121.

Aronson, D., Nassar, M., Goldberg, T., Kapeliovich, M., Hammerman, H., and Azzam, Z.S. (2010). The impact of body mass index on clinical outcomes after acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 145, 476-480.

Aurigemma, G.P., de Simone, G., and Fitzgibbons, T.P. (2013). Cardiac remodeling in obesity. *Circ Cardiovasc Imaging* 6, 142-152.

Bahi, N., Zhang, J., Llovera, M., Ballester, M., Comella, J.X., and Sanchis, D. (2006). Switch from caspase-dependent to caspase-independent death during heart development: essential role of endonuclease G in ischemia-induced DNA processing of differentiated cardiomyocytes. *J Biol Chem* 281, 22943-22952.

Baines, C.P., Kaiser, R.A., Purcell, N.H., Blair, N.S., Osinska, H., Hambleton, M.A., Brunskill, E.W., Sayen, M.R., Gottlieb, R.A., Dorn, G.W., *et al.* (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 434, 658-662.

Baines, C.P., Wang, L., Cohen, M.V., and Downey, J.M. (1999). Myocardial protection by insulin is dependent on phosphatidylinositol 3-kinase but not protein kinase C or KATP channels in the isolated rabbit heart. *Basic Res Cardiol* 94, 188-198.

Barrabes, J.A., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Piper, H.M., Solares, J., Gonzalez, M.A., Oliveras, J., Herrejon, M.P., and Soler Soler, J. (1996). Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch* 431, 519-526.

Bayat, H., Swaney, J.S., Ander, A.N., Dalton, N., Kennedy, B.P., Hammond, H.K., and Roth, D.M. (2002). Progressive heart failure after myocardial infarction in mice. *Basic Res Cardiol* 97, 206-213.

Becker, M., Beglinger, R., and Youssef, H.A. (1984). [Isoflurane anesthesia in the Gottinger minipig. Hemodynamic and cardiac changes under controlled ventilation]. *Anaesthesist* 33, 377-383.

Beltowski, J. (2003). Adiponectin and resistin--new hormones of white adipose tissue. *Med Sci Monit* 9, RA55-61.

Bello, N., and Mosca, L. (2004). Epidemiology of coronary heart disease in women. *Prog Cardiovasc Dis* 46, 287-295.

Benavides-Vallve, C., Corbacho, D., Iglesias-Garcia, O., Pelacho, B., Albiasu, E., Castano, S., Munoz-Barrutia, A., Prosper, F., and Ortiz-de-Solorzano, C. (2012). New strategies for echocardiographic evaluation of left ventricular function in a mouse model of long-term myocardial infarction. *PLoS One* 7, e41691.

Benderly, M., Boyko, V., and Goldbourt, U. (2010). Relation of body mass index to mortality among men with coronary heart disease. *Am J Cardiol* 106, 297-304.

Berg, A.H., and Scherer, P.E. (2005). Adipose tissue, inflammation, and cardiovascular disease. *Circ Res* 96, 939-949.

Bers, D.M. (2002). Cardiac Na/Ca exchange function in rabbit, mouse and man: what's the difference? *J Mol Cell Cardiol* 34, 369-373.

Berul, C.I., Aronovitz, M.J., Wang, P.J., and Mendelsohn, M.E. (1996). In vivo cardiac electrophysiology studies in the mouse. *Circulation* 94, 2641-2648.

Binder, S.R. (2006). Autoantibody detection using multiplex technologies. *Lupus* 15, 412-421.

Black, B.L., Croom, J., Eisen, E.J., Petro, A.E., Edwards, C.L., and Surwit, R.S. (1998). Differential effects of fat and sucrose on body composition in A/J and C57BL/6 mice. *Metabolism* 47, 1354-1359.

Boengler, K., Hilfiker-Kleiner, D., Heusch, G., and Schulz, R. (2010). Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 105, 771-785.

Bohl, S., Medway, D.J., Schulz-Menger, J., Schneider, J.E., Neubauer, S., and Lygate, C.A. (2009). Refined approach for quantification of in vivo ischemia-reperfusion injury in the mouse heart. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H2054-2058.

Bond, M.G., Bullock, B.C., Bellinger, D.A., and Hamm, T.E. (1980). Myocardial infarction in a large colony of nonhuman primates with coronary artery atherosclerosis. *Am J Pathol* 101, 675-692.

Borst, O., Ochmann, C., Schonberger, T., Jacoby, C., Stellos, K., Seizer, P., Flogel, U., Lang, F., and Gawaz, M. (2011). Methods employed for induction and analysis of experimental myocardial infarction in mice. *Cell Physiol Biochem* 28, 1-12.

Bouhidel, O., Pons, S., Souktani, R., Zini, R., Berdeaux, A., and Ghaleh, B. (2008). Myocardial ischemic postconditioning against ischemia-reperfusion is impaired in ob/ob mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 295, H1580-1586.

Brocheriou, V., Hagege, A.A., Oubenaissa, A., Lambert, M., Mallet, V.O., Duriez, M., Wassef, M., Kahn, A., Menasche, P., and Gilgenkrantz, H. (2000). Cardiac functional improvement by a human Bcl-2 transgene in a mouse model of ischemia/reperfusion injury. *J Gene Med* 2, 326-333.

Brown, R.H., Walters, D.M., Greenberg, R.S., and Mitzner, W. (1999). A method of endotracheal intubation and pulmonary functional assessment for repeated studies in mice. *J Appl Physiol* (1985) 87, 2362-2365.

Buchanan, J., Mazumder, P.K., Hu, P., Chakrabarti, G., Roberts, M.W., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Litwin, S.E., and Abel, E.D. (2005). Reduced cardiac efficiency and altered substrate metabolism precedes the onset of hyperglycemia and contractile dysfunction in two mouse models of insulin resistance and obesity. *Endocrinology* 146, 5341-5349.

Bucholz, E.M., Rathore, S.S., Reid, K.J., Jones, P.G., Chan, P.S., Rich, M.W., Spertus, J.A., and Krumholz, H.M. (2012). Body mass index and mortality in acute myocardial infarction patients. *Am J Med* 125, 796-803.

Buettner, R., Scholmerich, J., and Bollheimer, L.C. (2007). High-fat diets: modeling the metabolic disorders of human obesity in rodents. *Obesity (Silver Spring)* 15, 798-808.

Bugger, H., and Abel, E.D. (2009). Rodent models of diabetic cardiomyopathy. *Dis Model Mech* 2, 454-466.

Calligaris, S.D., Lecanda, M., Solis, F., Ezquer, M., Gutierrez, J., Brandan, E., Leiva, A., Sobrevia, L., and Conget, P. (2013). Mice long-term high-fat diet feeding recapitulates human cardiovascular alterations: an animal model to study the early phases of diabetic cardiomyopathy. *PLoS One* 8, e60931.

Cepeda-Valery, B., Slipczuk, L., Figueredo, V.M., Pressman, G.S., Morris, D.L., Lavie, C.J., and Romero-Corral, A. (2013). Association between obesity and infarct size: insight into the obesity paradox. *Int J Cardiol* 167, 604-606.

Clark, C., Smith, W., Lochner, A., and du Toit, E.F. (2010). The effects of gender and obesity on myocardial tolerance to ischemia. *Physiol Res* 60, 291-301.

Cleutjens, J.P., Kandala, J.C., Guarda, E., Guntaka, R.V., and Weber, K.T. (1995). Regulation of collagen degradation in the rat myocardium after infarction. *J Mol Cell Cardiol* 27, 1281-1292.

Collins, S.C., Hoppa, M.B., Walker, J.N., Amisten, S., Abdulkader, F., Bengtsson, M., Fearnside, J., Ramracheya, R., Toyne, A.A., Zhang, Q., *et al.* (2010). Progression of diet-induced diabetes in C57BL6J mice involves functional dissociation of Ca<sup>2+</sup>(+) channels from secretory vesicles. *Diabetes* 59, 1192-1201.

Communal, C., Sumandea, M., de Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J., and Hajjar, R.J. (2002). Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 6252-6256.

Condorelli, G., Roncarati, R., Ross, J., Jr., Pisani, A., Stassi, G., Todaro, M., Trocha, S., Drusco, A., Gu, Y., Russo, M.A., *et al.* (2001). Heart-targeted overexpression of caspase3 in mice increases infarct size and depresses cardiac function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 9977-9982.

Cornier, M.A., Dabelea, D., Hernandez, T.L., Lindstrom, R.C., Steig, A.J., Stob, N.R., Van Pelt, R.E., Wang, H., and Eckel, R.H. (2008). The metabolic syndrome. *Endocr Rev* 29, 777-822.

Curtis, J.P., Selter, J.G., Wang, Y., Rathore, S.S., Jovin, I.S., Jadbabaie, F., Kosiborod, M., Portnay, E.L., Sokol, S.I., Bader, F., *et al.* (2005). The obesity paradox: body mass index and outcomes in patients with heart failure. *Arch Intern Med* 165, 55-61.

Chen, Z., Chua, C.C., Ho, Y.S., Hamdy, R.C., and Chua, B.H. (2001). Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2313-2320.

Christia, P., Bujak, M., Gonzalez-Quesada, C., Chen, W., Dobaczewski, M., Reddy, A., and Frangogiannis, N.G. (2013). Systematic characterization of myocardial inflammation, repair, and remodeling in a mouse model of reperfused myocardial infarction. *J Histochem Cytochem* 61, 555-570.

Christoffersen, C., Bollano, E., Lindegaard, M.L., Bartels, E.D., Goetze, J.P., Andersen, C.B., and Nielsen, L.B. (2003). Cardiac lipid accumulation associated with diastolic dysfunction in obese mice. *Endocrinology* 144, 3483-3490.

Chu, G., Haghghi, K., and Kranias, E.G. (2002). From mouse to man: understanding heart failure through genetically altered mouse models. *J Card Fail* 8, S432-449.

Dardai, E., and Heavner, J.E. (1989). Comparison of respiratory and cardiovascular effects of halothane, isoflurane, and enflurane delivered via the Jackson-Rees breathing system in rats. New anaesthesia model for small animal surgery. *Z Exp Chir Transplant Kunstliche Organe* 22, 50-54.

Das, M. (2007). Apoptosis as a therapeutic target in heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H1322-1323.

Debinski, M., Buszman, P.P., Milewski, K., Wojakowski, W., Jackiewicz, W., Pajak, J., Szurlej, D., Fryc-Stanek, J., Wiernek, S., Jelonek, M., *et al.* (2011). Intracoronary adiponectin at reperfusion reduces infarct size in a porcine myocardial infarction model. *Int J Mol Med* 27, 775-781.

Degterev, A., Boyce, M., and Yuan, J. (2003). A decade of caspases. *Oncogene* 22, 8543-8567.

Deten, A., Volz, H.C., Briest, W., and Zimmer, H.G. (2002). Cardiac cytokine expression is upregulated in the acute phase after myocardial infarction. Experimental studies in rats. *Cardiovasc Res* 55, 329-340.

Dewald, O., Ren, G., Duerr, G.D., Zoerlein, M., Klemm, C., Gersch, C., Tincey, S., Michael, L.H., Entman, M.L., and Frangogiannis, N.G. (2004). Of mice and dogs: species-specific differences in the inflammatory response following myocardial infarction. *Am J Pathol* 164, 665-677.

Diercks, D.B., Roe, M.T., Mulgund, J., Pollack, C.V., Jr., Kirk, J.D., Gibler, W.B., Ohman, E.M., Smith, S.C., Jr., Boden, W.E., and Peterson, E.D. (2006). The obesity paradox in non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: results from the Can Rapid risk stratification of Unstable angina patients Suppress ADverse outcomes with Early implementation of the American College of Cardiology/American Heart Association Guidelines Quality Improvement Initiative. *Am Heart J* 152, 140-148.

Domanski, M.J., Jablonski, K.A., Rice, M.M., Fowler, S.E., and Braunwald, E. (2006). Obesity and cardiovascular events in patients with established coronary disease. *Eur Heart J* 27, 1416-1422.

Dong, F., Zhang, X., and Ren, J. (2006). Leptin regulates cardiomyocyte contractile function through endothelin-1 receptor-NADPH oxidase pathway. *Hypertension* 47, 222-229.

Donner, D., Headrick, J.P., Peart, J.N., and du Toit, E.F. (2013). Obesity improves myocardial ischaemic tolerance and RISK signalling in insulin-insensitive rats. *Dis Model Mech* 6, 457-466.

Dorge, H., Schulz, R., Belosjorow, S., Post, H., van de Sand, A., Konietzka, I., Frede, S., Hartung, T., Vinten-Johansen, J., Youker, K.A., *et al.* (2002). Coronary microembolization: the role of TNF-alpha in contractile dysfunction. *J Mol Cell Cardiol* 34, 51-62.

du Toit, E.F., Nabben, M., and Lochner, A. (2005). A potential role for angiotensin II in obesity induced cardiac hypertrophy and ischaemic/reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 100, 346-354.

Dumont, E.A., Hofstra, L., van Heerde, W.L., van den Eijnde, S., Doevendans, P.A., DeMuinck, E., Daemen, M.A., Smits, J.F., Frederik, P., Wellens, H.J., *et al.* (2000). Cardiomyocyte death induced by myocardial ischemia and reperfusion: measurement with recombinant human annexin-V in a mouse model. *Circulation* 102, 1564-1568.



Eckel, R.H., Grundy, S.M., and Zimmet, P.Z. (2005). The metabolic syndrome. *Lancet* 365, 1415-1428.

Eckle, T., Grenz, A., Kohler, D., Redel, A., Falk, M., Rolauffs, B., Osswald, H., Kehl, F., and Eltzschig, H.K. (2006). Systematic evaluation of a novel model for cardiac ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2533-2540.

Elrod, J.W., Calvert, J.W., Morrison, J., Doeller, J.E., Kraus, D.W., Tao, L., Jiao, X., Scalia, R., Kiss, L., Szabo, C., *et al.* (2007). Hydrogen sulfide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by preservation of mitochondrial function. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15560-15565.

Elsasser, A., Suzuki, K., and Schaper, J. (2000). Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol* 32, 711-724.

Enriori, P.J., Evans, A.E., Sinnayah, P., and Cowley, M.A. (2006). Leptin resistance and obesity. *Obesity (Silver Spring)* 14 Suppl 5, 254S-258S.

Erickson, J.R., He, B.J., Grumbach, I.M., and Anderson, M.E. (2011). CaMKII in the cardiovascular system: sensing redox states. *Physiol Rev* 91, 889-915.

Esposito, K., Pontillo, A., Di Palo, C., Giugliano, G., Masella, M., Marfella, R., and Giugliano, D. (2003). Effect of weight loss and lifestyle changes on vascular inflammatory markers in obese women: a randomized trial. *Jama* 289, 1799-1804.

Febbraio, M.A., and Pedersen, B.K. (2002). Muscle-derived interleukin-6: mechanisms for activation and possible biological roles. *Faseb J* 16, 1335-1347.

Finsen, A.V., Christensen, G., and Sjaastad, I. (2005). Echocardiographic parameters discriminating myocardial infarction with pulmonary congestion from myocardial infarction without congestion in the mouse. *J Appl Physiol (1985)* 98, 680-689.

Flecknell, P.A., Roughan, J.V., and Hedenqvist, P. (1999). Induction of anaesthesia with sevoflurane and isoflurane in the rabbit. *Lab Anim* 33, 41-46.

Fonarow, G.C., Srikanthan, P., Costanzo, M.R., Cintron, G.B., and Lopatin, M. (2007). An obesity paradox in acute heart failure: analysis of body mass index and in-hospital mortality for 108,927 patients in the Acute Decompensated Heart Failure National Registry. *Am Heart J* 153, 74-81.

Forouzanfar, M.H., Moran, A.E., Flaxman, A.D., Roth, G., Mensah, G.A., Ezzati, M., Naghavi, M., and Murray, C.J. (2012). Assessing the global burden of ischemic heart disease, part 2: analytic methods and estimates of the global epidemiology of ischemic heart disease in 2010. *Glob Heart* 7, 331-342.

Freude, B., Masters, T.N., Robicsek, F., Fokin, A., Kostin, S., Zimmermann, R., Ullmann, C., Lorenz-Meyer, S., and Schaper, J. (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 32, 197-208.

Fuglestad, B.N., Suleman, N., Tiron, C., Kanhema, T., Lacerda, L., Andreassen, T.V., Sack, M.N., Jonassen, A.K., Mjos, O.D., Opie, L.H., *et al.* (2008). Signal transducer and activator of transcription 3 is involved in the cardioprotective signalling pathway activated by insulin therapy at reperfusion. *Basic Res Cardiol* 103, 444-453.

Gan, L., Guo, K., Cremona, M.L., McGraw, T.E., Leibel, R.L., and Zhang, Y. (2012). TNF-alpha up-regulates protein level and cell surface expression of the leptin receptor by stimulating its export via a PKC-dependent mechanism. *Endocrinology* 153, 5821-5833.

Gao, J., Chang Chua, C., Chen, Z., Wang, H., Xu, X., R, C.H., McMullen, J.R., Shioi, T., Izumo, S., and Chua, B.H. (2007). Resistin, an adipocytokine, offers protection against acute myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 43, 601-609.

Gao, X.M., Dart, A.M., Dewar, E., Jennings, G., and Du, X.J. (2000). Serial echocardiographic assessment of left ventricular dimensions and function after myocardial infarction in mice. *Cardiovasc Res* 45, 330-338.

Garcia-Dorado, D., Rodriguez-Sinovas, A., and Ruiz-Meana, M. (2004). Gap junction-mediated spread of cell injury and death during myocardial ischemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 61, 386-401.

Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., and Piper, H.M. (2009). Lethal reperfusion injury in acute myocardial infarction: facts and unresolved issues. *Cardiovasc Res* 83, 165-168.

Garcia-Dorado, D., Theroux, P., Elizaga, J., Galinanes, M., Solares, J., Riesgo, M., Gomez, M.J., Garcia-Dorado, A., and Fernandez Aviles, F. (1987). Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 21, 537-544.

Garg, S., Narula, J., and Chandrashekhar, Y. (2005). Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target. *J Mol Cell Cardiol* 38, 73-79.

Gilles, S., Zahler, S., Welsch, U., Sommerhoff, C.P., and Becker, B.F. (2003). Release of TNF-alpha during myocardial reperfusion depends on oxidative stress and is prevented by mast cell stabilizers. *Cardiovasc Res* 60, 608-616.

Gonon, A.T., Widegren, U., Bulhak, A., Salehzadeh, F., Persson, J., Sjoquist, P.O., and Pernow, J. (2008). Adiponectin protects against myocardial ischaemia-reperfusion injury via AMP-activated protein kinase, Akt, and nitric oxide. *Cardiovasc Res* 78, 116-122.

Gottlieb, R.A., Burleson, K.O., Kloner, R.A., Babior, B.M., and Engler, R.L. (1994). Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 94, 1621-1628.

Gruberg, L., Weissman, N.J., Waksman, R., Fuchs, S., Deible, R., Pinnow, E.E., Ahmed, L.M., Kent, K.M., Pichard, A.D., Suddath, W.O., *et al.* (2002). The impact of obesity on the short-term and long-term outcomes after percutaneous coronary intervention: the obesity paradox? *J Am Coll Cardiol* 39, 578-584.

Guglin, M., Baxi, K., and Schabath, M. (2013). Anatomy of the obesity paradox in heart failure. *Heart Fail Rev*.

Gurm, H.S., Brennan, D.M., Booth, J., Tchong, J.E., Lincoff, A.M., and Topol, E.J. (2002). Impact of body mass index on outcome after percutaneous coronary intervention (the obesity paradox). *Am J Cardiol* 90, 42-45.

Habbu, A., Lakkis, N.M., and Dokainish, H. (2006). The obesity paradox: fact or fiction? *Am J Cardiol* 98, 944-948.

Halestrap, A.P., Clarke, S.J., and Javadov, S.A. (2004). Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion--a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 61, 372-385.

Han, C., Zhao, R., Kroger, J., Qu, M., Wani, A.A., and Wang, Q.E. (2013). Caspase-2 short isoform interacts with membrane-associated cytoskeleton proteins to inhibit apoptosis. *PLoS One* 8, e67033.

Harte, R.A., Kirk, E.A., Rosenfeld, M.E., and LeBoeuf, R.C. (1999). Initiation of hyperinsulinemia and hyperleptinemia is diet dependent in C57BL/6 mice. *Horm Metab Res* 31, 570-575.

Hausenloy, D.J., Lecour, S., and Yellon, D.M. (2011). Reperfusion injury salvage kinase and survivor activating factor enhancement prosurvival signaling pathways in ischemic postconditioning: two sides of the same coin. *Antioxid Redox Signal* 14, 893-907.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2004). New directions for protecting the heart against ischaemia-reperfusion injury: targeting the Reperfusion Injury Salvage Kinase (RISK)-pathway. *Cardiovasc Res* 61, 448-460.

Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2009). Cardioprotective growth factors. *Cardiovasc Res* 83, 179-194.

Hayashidani, S., Tsutsui, H., Shiomi, T., Ikeuchi, M., Matsusaka, H., Suematsu, N., Wen, J., Egashira, K., and Takeshita, A. (2003). Anti-monocyte chemoattractant protein-1 gene therapy attenuates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction. *Circulation* 108, 2134-2140.

Hernando, V., Inserte, J., Sartorio, C.L., Parra, V.M., Poncelas-Nozal, M., and Garcia-Dorado, D. (2010). Calpain translocation and activation as pharmacological targets during myocardial ischemia/reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 49, 271-279.

Hibi, M., Nakajima, K., and Hirano, T. (1996). IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J Mol Med (Berl)* 74, 1-12.

Hoff, J. (2000). Methods of Blood Collection in the Mouse. *Lab Animal* 29, 47-53.

Hofstaetter, B., Taimor, G., Inserte, J., Garcia-Dorado, D., and Piper, H.M. (2002). Inhibition of apoptotic responses after ischemic stress in isolated hearts and cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 97, 479-488.

Hofstra, L., Liem, I.H., Dumont, E.A., Boersma, H.H., van Heerde, W.L., Doevendans, P.A., De Muinck, E., Wellens, H.J., Kemerink, G.J., Reutelingsperger, C.P., *et al.* (2000). Visualisation of cell death in vivo in patients with acute myocardial infarction. *Lancet* 356, 209-212.

Holly, T.A., Drincic, A., Byun, Y., Nakamura, S., Harris, K., Klocke, F.J., and Cryns, V.L. (1999). Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 31, 1709-1715.

Hood, W.B., Jr., McCarthy, B., and Lown, B. (1967). Myocardial infarction following coronary ligation in dogs. Hemodynamic effects of isoproterenol and acetylstrophanthidin. *Circ Res* 21, 191-199.

Horwich, T.B., Fonarow, G.C., Hamilton, M.A., MacLellan, W.R., Woo, M.A., and Tillisch, J.H. (2001). The relationship between obesity and mortality in patients with heart failure. *J Am Coll Cardiol* 38, 789-795.

Hotamisligil, G.S. (1999). The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance. *J Intern Med* 245, 621-625.

Hotamisligil, G.S., Arner, P., Caro, J.F., Atkinson, R.L., and Spiegelman, B.M. (1995). Increased adipose tissue expression of tumor necrosis factor-alpha in human obesity and insulin resistance. *J Clin Invest* 95, 2409-2415.

Huisamen, B., Dietrich, D., Bezuidenhout, N., Lopes, J., Flepisi, B., Blackhurst, D., and Lochner, A. (2012). Early cardiovascular changes occurring in diet-induced, obese insulin-resistant rats. *Mol Cell Biochem* 368, 37-45.

Hull, R.L., Kodama, K., Utzschneider, K.M., Carr, D.B., Prigeon, R.L., and Kahn, S.E. (2005). Dietary-fat-induced obesity in mice results in beta cell hyperplasia but not increased insulin release: evidence for specificity of impaired beta cell adaptation. *Diabetologia* 48, 1350-1358.

Icardo, J.M., and Colvee, E. (2001). Origin and course of the coronary arteries in normal mice and in iv/iv mice. *J Anat* 199, 473-482.

Inserte, J., Barba, I., Hernando, V., Abellan, A., Ruiz-Meana, M., Rodriguez-Sinovas, A., and Garcia-Dorado, D. (2008). Effect of acidic reperfusion on prolongation of intracellular acidosis and myocardial salvage. *Cardiovasc Res* 77, 782-790.

Inserte, J., Barba, I., Hernando, V., and Garcia-Dorado, D. (2009). Delayed recovery of intracellular acidosis during reperfusion prevents calpain activation and determines protection in postconditioned myocardium. *Cardiovasc Res* 81, 116-122.

Inserte, J., Barba, I., Poncelas-Nozal, M., Hernando, V., Agullo, L., Ruiz-Meana, M., and Garcia-Dorado, D. (2011). cGMP/PKG pathway mediates myocardial postconditioning protection in rat hearts by delaying normalization of intracellular acidosis during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 50, 903-909.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Hernando, V., and Soler-Soler, J. (2005). Calpain-mediated impairment of Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase activity during early reperfusion contributes to cell death after myocardial ischemia. *Circ Res* 97, 465-473.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Agullo, L., Pina, P., and Soler-Soler, J. (2004). Ischemic preconditioning attenuates calpain-mediated degradation of structural proteins through a protein kinase A-dependent mechanism. *Cardiovasc Res* 64, 105-114.

Inserte, J., Garcia-Dorado, D., Ruiz-Meana, M., Padilla, F., Barrabes, J.A., Pina, P., Agullo, L., Piper, H.M., and Soler-Soler, J. (2002). Effect of inhibition of Na<sup>(+)</sup>/Ca<sup>(2+)</sup> exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res* 55, 739-748.

Ishikawa, Y., Akasaka, Y., Ishii, T., Yoda-Murakami, M., Choi-Miura, N.H., Tomita, M., Ito, K., Zhang, L., Akishima, Y., Ishihara, M., *et al.* (2003). Changes in the distribution pattern of gelatin-binding protein of 28 kDa (adiponectin) in myocardial remodelling after ischaemic injury. *Histopathology* 42, 43-52.

Jahangir, E., De Schutter, A., and Lavie, C.J. (2014). The relationship between obesity and coronary artery disease. *Transl Res*.

Ji, L., Fu, F., Zhang, L., Liu, W., Cai, X., Zhang, L., Zheng, Q., Zhang, H., and Gao, F. (2010). Insulin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury via reducing oxidative/nitrative stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 298, E871-880.

Jonassen, A.K., Sack, M.N., Mjos, O.D., and Yellon, D.M. (2001). Myocardial protection by insulin at reperfusion requires early administration and is mediated via Akt and p70s6 kinase cell-survival signaling. *Circ Res* 89, 1191-1198.

Jones, S.P., Girod, W.G., Palazzo, A.J., Granger, D.N., Grisham, M.B., Jourd'Heuil, D., Huang, P.L., and Lefer, D.J. (1999). Myocardial ischemia-reperfusion injury is exacerbated in absence of endothelial cell nitric oxide synthase. *Am J Physiol* 276, H1567-1573.

Jordan, J.E., Zhao, Z.Q., and Vinten-Johansen, J. (1999). The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 43, 860-878.

Junqueira, L.C., Bignolas, G., and Brentani, R.R. (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem J* 11, 447-455.

Kaikita, K., Hayasaki, T., Okuma, T., Kuziel, W.A., Ogawa, H., and Takeya, M. (2004). Targeted deletion of CC chemokine receptor 2 attenuates left ventricular remodeling after experimental myocardial infarction. *Am J Pathol* 165, 439-447.

Kanoh, M., Takemura, G., Misao, J., Hayakawa, Y., Aoyama, T., Nishigaki, K., Noda, T., Fujiwara, T., Fukuda, K., Minatoguchi, S., *et al.* (1999). Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation* 99, 2757-2764.

Kaplan, E.L., and Meier, P. (1954). Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *Journal of the American Statistical Association* 53, 457-481.

Karasawa, H., Nagata-Goto, S., Takaishi, K., and Kumagae, Y. (2009). A novel model of type 2 diabetes mellitus based on obesity induced by high-fat diet in BDF1 mice. *Metabolism* 58, 296-303.

Karmazyn, M., Purdham, D.M., Rajapurohitam, V., and Zeidan, A. (2008). Signalling mechanisms underlying the metabolic and other effects of adipokines on the heart. *Cardiovasc Res* 79, 279-286.

Kaufman, L.N., Peterson, M.M., and Smith, S.M. (1991). Hypertension and sympathetic hyperactivity induced in rats by high-fat or glucose diets. *Am J Physiol* 260, E95-100.

Kenchaiah, S., Evans, J.C., Levy, D., Wilson, P.W., Benjamin, E.J., Larson, M.G., Kannel, W.B., and Vasan, R.S. (2002). Obesity and the risk of heart failure. *N Engl J Med* 347, 305-313.

Kennedy, L.M., Dickstein, K., Anker, S.D., Kristianson, K., and Willenheimer, R. (2005). The prognostic importance of body mass index after complicated myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol* 45, 156-158.

Kern, P.A., Di Gregorio, G.B., Lu, T., Rassouli, N., and Ranganathan, G. (2003). Adiponectin expression from human adipose tissue: relation to obesity, insulin resistance, and tumor necrosis factor-alpha expression. *Diabetes* 52, 1779-1785.

Kim, C.S., Park, H.S., Kawada, T., Kim, J.H., Lim, D., Hubbard, N.E., Kwon, B.S., Erickson, K.L., and Yu, R. (2006). Circulating levels of MCP-1 and IL-8 are elevated in human obese subjects and associated with obesity-related parameters. *Int J Obes (Lond)* 30, 1347-1355.

Klocke, R., Tian, W., Kuhlmann, M.T., and Nikol, S. (2007). Surgical animal models of heart failure related to coronary heart disease. *Cardiovasc Res* 74, 29-38.

Knaapen, M.W., Davies, M.J., De Bie, M., Haven, A.J., Martinet, W., and Kockx, M.M. (2001). Apoptotic versus autophagic cell death in heart failure. *Cardiovasc Res* 51, 304-312.

Kopp, H.P., Kopp, C.W., Festa, A., Krzyzanowska, K., Kriwanek, S., Minar, E., Roka, R., and Scherthaner, G. (2003). Impact of weight loss on inflammatory proteins and their association with the insulin resistance syndrome in morbidly obese patients. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23, 1042-1047.

Kostin, S., and Schaper, J. (2001). Tissue-specific patterns of Gap junctions in adult rat atrial and ventricular cardiomyocytes in vivo and in vitro. *Circ Res* 88, 933-939.

Kumar, D., Hacker, T.A., Buck, J., Whitesell, L.F., Kaji, E.H., Douglas, P.S., and Kamp, T.J. (2005). Distinct mouse coronary anatomy and myocardial infarction consequent to ligation. *Coron Artery Dis* 16, 41-44.

Lacerda, L., Opie, L.H., and Lecour, S. (2012). Influence of tumour necrosis factor alpha on the outcome of ischaemic postconditioning in the presence of obesity and diabetes. *Exp Diabetes Res* 2012, 502654.

Lacerda, L., Somers, S., Opie, L.H., and Lecour, S. (2009). Ischaemic postconditioning protects against reperfusion injury via the SAFE pathway. *Cardiovasc Res* 84, 201-208.

Ladilov, Y., Efe, O., Schafer, C., Rother, B., Kasseckert, S., Abdallah, Y., Meuter, K., Dieter Schluter, K., and Piper, H.M. (2003). Reoxygenation-induced rigor-type contracture. *J Mol Cell Cardiol* 35, 1481-1490.

Lamkanfi, M., and Kanneganti, T.D. (2010). Caspase-7: a protease involved in apoptosis and inflammation. *Int J Biochem Cell Biol* 42, 21-24.

Lavie, C.J., Milani, R.V., and Ventura, H.O. (2007). Obesity, heart disease, and favorable prognosis--truth or paradox? *Am J Med* 120, 825-826.

Lavie, C.J., Osman, A.F., Milani, R.V., and Mehra, M.R. (2003). Body composition and prognosis in chronic systolic heart failure: the obesity paradox. *Am J Cardiol* 91, 891-894.

Lecour, S. (2009). Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: Does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol* 47, 32-40.

Lee, K.T., Jarmolych, J., Kim, D.N., Grant, C., Krasney, J.A., Thomas, W.A., and Bruno, A.M. (1971). Production of advanced coronary atherosclerosis, myocardial infarction and "sudden death" in swine. *Exp Mol Pathol* 15, 170-190.

Lee, P., Sata, M., Lefer, D.J., Factor, S.M., Walsh, K., and Kitsis, R.N. (2003). Fas pathway is a critical mediator of cardiac myocyte death and MI during ischemia-reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 284, H456-463.

Lepor, N.E., Fouchia, D.D., and McCullough, P.A. (2013). New vistas for the treatment of obesity: turning the tide against the leading cause of morbidity and cardiovascular mortality in the developed world. *Rev Cardiovasc Med* 14, 20-39; quiz 40.

Li, J., Zhang, H., Wu, F., Nan, Y., Ma, H., Guo, W., Wang, H., Ren, J., Das, U.N., and Gao, F. (2008). Insulin inhibits tumor necrosis factor-alpha induction in myocardial ischemia/reperfusion: role of Akt and endothelial nitric oxide synthase phosphorylation. *Crit Care Med* 36, 1551-1558.

Li, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., and Wang, X. (1997). Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

Libby, P. (2001). Current concepts of the pathogenesis of the acute coronary syndromes. *Circulation* 104, 365-372.

Lim, S.Y., Hausenloy, D.J., Arjun, S., Price, A.N., Davidson, S.M., Lythgoe, M.F., and Yellon, D.M. (2011). Mitochondrial cyclophilin-D as a potential therapeutic target for post-myocardial infarction heart failure. *J Cell Mol Med* 15, 2443-2451.

Liu, G., Iden, J.B., Kovithavongs, K., Gulamhusein, R., Duff, H.J., and Kavanagh, K.M. (2004). In vivo temporal and spatial distribution of depolarization and repolarization and the illusive murine T wave. *J Physiol* 555, 267-279.

Liu, J., and Lloyd, S.G. (2013). High-fat, low-carbohydrate diet alters myocardial oxidative stress and impairs recovery of cardiac function after ischemia and reperfusion in obese rats. *Nutr Res* 33, 311-321.

Lopez-Jimenez, F., and Cortes-Bergoderi, M. (2011). Update: systemic diseases and the cardiovascular system (i): obesity and the heart. *Rev Esp Cardiol* 64, 140-149.

Lopez-Jimenez, F., Jacobsen, S.J., Reeder, G.S., Weston, S.A., Meverden, R.A., and Roger, V.L. (2004). Prevalence and secular trends of excess body weight and impact on outcomes after myocardial infarction in the community. *Chest* 125, 1205-1212.

Lowe, G.D. (2001). The relationship between infection, inflammation, and cardiovascular disease: an overview. *Ann Periodontol* 6, 1-8.

Lubos, E., Messow, C.M., Schnabel, R., Rupprecht, H.J., Espinola-Klein, C., Bickel, C., Peetz, D., Post, F., Lackner, K.J., Tiret, L., *et al.* (2007). Resistin, acute coronary syndrome and prognosis results from the AtheroGene study. *Atherosclerosis* 193, 121-128.

Luther, D.J., Thodeti, C.K., and Meszaros, J.G. (2013). Injury models to study cardiac remodeling in the mouse: myocardial infarction and ischemia-reperfusion. *Methods Mol Biol* 1037, 325-342.

Lyon, C.J., Law, R.E., and Hsueh, W.A. (2003). Minireview: adiposity, inflammation, and atherogenesis. *Endocrinology* 144, 2195-2200.

Madani, S., De Girolamo, S., Munoz, D.M., Li, R.K., and Sweeney, G. (2006). Direct effects of leptin on size and extracellular matrix components of human pediatric ventricular myocytes. *Cardiovasc Res* 69, 716-725.

Madden, S.D., Donovan, M., and Cotter, T.G. (2007). Key apoptosis regulating proteins are down-regulated during postnatal tissue development. *Int J Dev Biol* 51, 415-423.

Mahaffey, K.W., Tonev, S.T., Spinler, S.A., Levine, G.N., Gallo, R., Ducas, J., Goodman, S.G., Antman, E.M., Becker, R.C., Langer, A., *et al.* (2010). Obesity in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndromes: results from the SYNERGY trial. *Int J Cardiol* 139, 123-133.

Manson, J.E., Skerrett, P.J., Greenland, P., and VanItallie, T.B. (2004). The escalating pandemics of obesity and sedentary lifestyle. A call to action for clinicians. *Arch Intern Med* 164, 249-258.



- Martin, S.S., Qasim, A., and Reilly, M.P. (2008). Leptin resistance: a possible interface of inflammation and metabolism in obesity-related cardiovascular disease. *J Am Coll Cardiol* 52, 1201-1210.
- Matsushima, S., Kinugawa, S., Yokota, T., Inoue, N., Ohta, Y., Hamaguchi, S., and Tsutsui, H. (2009). Increased myocardial NAD(P)H oxidase-derived superoxide causes the exacerbation of postinfarct heart failure in type 2 diabetes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 297, H409-416.
- Mattu, H.S., and Randeva, H.S. (2013). Role of adipokines in cardiovascular disease. *J Endocrinol* 216, T17-36.
- Mayr, M., Metzler, B., Chung, Y.L., McGregor, E., Mayr, U., Troy, H., Hu, Y., Leitges, M., Pachinger, O., Griffiths, J.R., *et al.* (2004). Ischemic preconditioning exaggerates cardiac damage in PKC-delta null mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H946-956.
- Mazumder, P.K., O'Neill, B.T., Roberts, M.W., Buchanan, J., Yun, U.J., Cooksey, R.C., Boudina, S., and Abel, E.D. (2004). Impaired cardiac efficiency and increased fatty acid oxidation in insulin-resistant ob/ob mouse hearts. *Diabetes* 53, 2366-2374.
- Messerli, F.H., Nunez, B.D., Ventura, H.O., and Snyder, D.W. (1987). Overweight and sudden death. Increased ventricular ectopy in cardiopathy of obesity. *Arch Intern Med* 147, 1725-1728.
- Mezzaroma, E., Toldo, S., Farkas, D., Seropian, I.M., Van Tassell, B.W., Salloum, F.N., Kannan, H.R., Menna, A.C., Voelkel, N.F., and Abbate, A. (2011). The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 19725-19730.
- Michael, L.H., Ballantyne, C.M., Zachariah, J.P., Gould, K.E., Pocius, J.S., Taffet, G.E., Hartley, C.J., Pham, T.T., Daniel, S.L., Funk, E., *et al.* (1999). Myocardial infarction and remodeling in mice: effect of reperfusion. *Am J Physiol* 277, H660-668.
- Michael, L.H., Entman, M.L., Hartley, C.J., Youker, K.A., Zhu, J., Hall, S.R., Hawkins, H.K., Berens, K., and Ballantyne, C.M. (1995). Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 269, H2147-2154.
- Mills, E., Kuhn, C.M., Feinglos, M.N., and Surwit, R. (1993). Hypertension in CB57BL/6J mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Am J Physiol* 264, R73-78.
- Modi, N. (2004). Management of fluid balance in the very immature neonate. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 89, F108-111.
- Mohamed-Ali, V., Goodrick, S., Rawesh, A., Katz, D.R., Miles, J.M., Yudkin, J.S., Klein, S., and Coppack, S.W. (1997). Subcutaneous adipose tissue releases interleukin-6, but not tumor necrosis factor-alpha, in vivo. *J Clin Endocrinol Metab* 82, 4196-4200.

Montani, J.P., Antic, V., Yang, Z., and Dulloo, A. (2002). Pathways from obesity to hypertension: from the perspective of a vicious triangle. *Int J Obes Relat Metab Disord* 26 Suppl 2, S28-38.

Mora, S., and Pessin, J.E. (2002). An adipocentric view of signaling and intracellular trafficking. *Diabetes Metab Res Rev* 18, 345-356.

Morimoto, H., Takahashi, M., Izawa, A., Ise, H., Hongo, M., Kolattukudy, P.E., and Ikeda, U. (2006). Cardiac overexpression of monocyte chemoattractant protein-1 in transgenic mice prevents cardiac dysfunction and remodeling after myocardial infarction. *Circ Res* 99, 891-899.

Nakagawa, T., Shimizu, S., Watanabe, T., Yamaguchi, O., Otsu, K., Yamagata, H., Inohara, H., Kubo, T., and Tsujimoto, Y. (2005). Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 434, 652-658.

Nakagawa, T., and Yuan, J. (2000). Cross-talk between two cysteine protease families. Activation of caspase-12 by calpain in apoptosis. *J Cell Biol* 150, 887-894.

Nanayakkara, G., Kariharan, T., Wang, L., Zhong, J., and Amin, R. (2012). The cardio-protective signaling and mechanisms of adiponectin. *Am J Cardiovasc Dis* 2, 253-266.

Narula, J., Haider, N., Virmani, R., DiSalvo, T.G., Kolodgie, F.D., Hajjar, R.J., Schmidt, U., Semigran, M.J., Dec, G.W., and Khaw, B.A. (1996). Apoptosis in myocytes in end-stage heart failure. *N Engl J Med* 335, 1182-1189.

Neels, J.G., Pandey, M., Hotamisligil, G.S., and Samad, F. (2006). Autoamplification of tumor necrosis factor-alpha: a potential mechanism for the maintenance of elevated tumor necrosis factor-alpha in male but not female obese mice. *Am J Pathol* 168, 435-444.

Ng, K.W., Allen, M.L., Desai, A., Macrae, D., and Pathan, N. (2012). Cardioprotective effects of insulin: how intensive insulin therapy may benefit cardiac surgery patients. *Circulation* 125, 721-728.

Nguyen, T., and Lau, D.C. (2012). The obesity epidemic and its impact on hypertension. *Can J Cardiol* 28, 326-333.

Nian, M., Lee, P., Khaper, N., and Liu, P. (2004). Inflammatory cytokines and postmyocardial infarction remodeling. *Circ Res* 94, 1543-1553.

Nickola, M.W., Wold, L.E., Colligan, P.B., Wang, G.J., Samson, W.K., and Ren, J. (2000). Leptin attenuates cardiac contraction in rat ventricular myocytes. Role of NO. *Hypertension* 36, 501-505.

Nogueiras, R., Perez-Tilve, D., Veyrat-Durebex, C., Morgan, D.A., Varela, L., Haynes, W.G., Patterson, J.T., Disse, E., Pfluger, P.T., Lopez, M., et al. (2009). Direct control of peripheral lipid deposition by CNS GLP-1 receptor signaling is mediated by the sympathetic nervous system and blunted in diet-induced obesity. *J Neurosci* 29, 5916-5925.

Nomura, S., Shouzu, A., Omoto, S., Nishikawa, M., and Fukuhara, S. (2000). Significance of chemokines and activated platelets in patients with diabetes. *Clin Exp Immunol* 121, 437-443.

Ohno, M., Takemura, G., Ohno, A., Misao, J., Hayakawa, Y., Minatoguchi, S., Fujiwara, T., and Fujiwara, H. (1998). "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation* 98, 1422-1430.

Okere, I.C., Chandler, M.P., McElfresh, T.A., Rennison, J.H., Sharov, V., Sabbah, H.N., Tserng, K.Y., Hoit, B.D., Ernsberger, P., Young, M.E., *et al.* (2006). Differential effects of saturated and unsaturated fatty acid diets on cardiomyocyte apoptosis, adipose distribution, and serum leptin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H38-44.

Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, inflammation, and insulin resistance. *Annu Rev Physiol* 72, 219-246.

Olivetti, G., Cigola, E., Maestri, R., Corradi, D., Lagrasta, C., Gambert, S.R., and Anversa, P. (1996). Aging, cardiac hypertrophy and ischemic cardiomyopathy do not affect the proportion of mononucleated and multinucleated myocytes in the human heart. *J Mol Cell Cardiol* 28, 1463-1477.

Oreopoulos, A., Padwal, R., Kalantar-Zadeh, K., Fonarow, G.C., Norris, C.M., and McAlister, F.A. (2008). Body mass index and mortality in heart failure: a meta-analysis. *Am Heart J* 156, 13-22.

Orogo, A.M., and Gustafsson, A.B. (2013). Cell death in the myocardium: my heart won't go on. *IUBMB Life* 65, 651-656.

Pacher, P., Nagayama, T., Mukhopadhyay, P., Batkai, S., and Kass, D.A. (2008). Measurement of cardiac function using pressure-volume conductance catheter technique in mice and rats. *Nat Protoc* 3, 1422-1434.

Palanivel, R., Eguchi, M., Shuralyova, I., Coe, I., and Sweeney, G. (2006). Distinct effects of short- and long-term leptin treatment on glucose and fatty acid uptake and metabolism in HL-1 cardiomyocytes. *Metabolism* 55, 1067-1075.

Palmer, A.M., Greengrass, P.M., and Cavalla, D. (2000). The role of mitochondria in apoptosis. *Drug News Perspect* 13, 378-384.

Palojoki, E., Saraste, A., Eriksson, A., Pulkki, K., Kallajoki, M., Voipio-Pulkki, L.M., and Tikkanen, I. (2001). Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280, H2726-2731.

Pfeffer, M.A., Pfeffer, J.M., Fishbein, M.C., Fletcher, P.J., Spadaro, J., Kloner, R.A., and Braunwald, E. (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 44, 503-512.

Pineiro, R., Iglesias, M.J., Gallego, R., Raghay, K., Eiras, S., Rubio, J., Dieguez, C., Gualillo, O., Gonzalez-Juanatey, J.R., and Lago, F. (2005). Adiponectin is synthesized and secreted by human and murine cardiomyocytes. *FEBS Lett* 579, 5163-5169.

Pingitore, A., Di Bella, G., Lombardi, M., Iervasi, G., Strata, E., Aquaro, G.D., Positano, V., De Marchi, D., Rossi, G., L'Abbate, A., *et al.* (2007). The obesity paradox and myocardial infarct size. *J Cardiovasc Med (Hagerstown)* 8, 713-717.

Piper, H.M., Garcia-Dorado, D., and Ovize, M. (1998). A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 38, 291-300.

Pischon, T., Girman, C.J., Hotamisligil, G.S., Rifai, N., Hu, F.B., and Rimm, E.B. (2004). Plasma adiponectin levels and risk of myocardial infarction in men. *Jama* 291, 1730-1737.

Poirier, P., Giles, T.D., Bray, G.A., Hong, Y., Stern, J.S., Pi-Sunyer, F.X., and Eckel, R.H. (2006). Obesity and cardiovascular disease: pathophysiology, evaluation, and effect of weight loss: an update of the 1997 American Heart Association Scientific Statement on Obesity and Heart Disease from the Obesity Committee of the Council on Nutrition, Physical Activity, and Metabolism. *Circulation* 113, 898-918.

Porter, A.G., and Janicke, R.U. (1999). Emerging roles of caspase-3 in apoptosis. *Cell Death Differ* 6, 99-104.

Purdham, D.M., Zou, M.X., Rajapurohitam, V., and Karmazyn, M. (2004). Rat heart is a site of leptin production and action. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H2877-2884.

Qi, Y., Nie, Z., Lee, Y.S., Singhal, N.S., Scherer, P.E., Lazar, M.A., and Ahima, R.S. (2006). Loss of resistin improves glucose homeostasis in leptin deficiency. *Diabetes* 55, 3083-3090.

Rajapurohitam, V., Gan, X.T., Kirshenbaum, L.A., and Karmazyn, M. (2003). The obesity-associated peptide leptin induces hypertrophy in neonatal rat ventricular myocytes. *Circ Res* 93, 277-279.

Rana, J.S., Mukamal, K.J., Morgan, J.P., Muller, J.E., and Mittleman, M.A. (2004). Obesity and the risk of death after acute myocardial infarction. *Am Heart J* 147, 841-846.

Rauchhaus, M., Coats, A.J., and Anker, S.D. (2000). The endotoxin-lipoprotein hypothesis. *Lancet* 356, 930-933.

Reaven, G.M. (2011). Insulin resistance: the link between obesity and cardiovascular disease. *Med Clin North Am* 95, 875-892.

Redel, A., Jazbutyte, V., Smul, T.M., Lange, M., Eckle, T., Eltzhig, H., Roewer, N., and Kehl, F. (2008). Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. *Exp Biol Med (Maywood)* 233, 84-93.

Ren, J. (2004). Leptin and hyperleptinemia - from friend to foe for cardiovascular function. *J Endocrinol* 181, 1-10.

Ren, J., Dong, F., Cai, G.J., Zhao, P., Nunn, J.M., Wold, L.E., and Pei, J. (2010). Interaction between age and obesity on cardiomyocyte contractile function: role of leptin and stress signaling. *PLoS One* 5, e10085.

Ridker, P.M., Rifai, N., Pfeffer, M., Sacks, F., Lepage, S., and Braunwald, E. (2000). Elevation of tumor necrosis factor-alpha and increased risk of recurrent coronary events after myocardial infarction. *Circulation* 101, 2149-2153.

Rodriguez-Sinovas, A., Cabestrero, A., Garcia del Blanco, B., Inserte, J., Garcia, A., and Garcia-Dorado, D. (2009). Intracoronary acid infusion as an alternative to ischemic postconditioning in pigs. *Basic Res Cardiol* 104, 761-771.

Rodriguez, M., Lucchesi, B.R., and Schaper, J. (2002). Apoptosis in myocardial infarction. *Ann Med* 34, 470-479.

Romero-Corral, A., Montori, V.M., Somers, V.K., Korinek, J., Thomas, R.J., Allison, T.G., Mookadam, F., and Lopez-Jimenez, F. (2006). Association of bodyweight with total mortality and with cardiovascular events in coronary artery disease: a systematic review of cohort studies. *Lancet* 368, 666-678.

Roos, C.J., Quax, P.H., and Jukema, J.W. (2012). Cardiovascular metabolic syndrome: mediators involved in the pathophysiology from obesity to coronary heart disease. *Biomark Med* 6, 35-52.

Rothwell, S.E., Richards, A.M., and Pemberton, C.J. (2006). Resistin worsens cardiac ischaemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun* 349, 400-407.

Ruiz-Meana, M., Abellan, A., Miro-Casas, E., and Garcia-Dorado, D. (2007). Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca<sup>2+</sup> overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol* 102, 542-552.

Ruiz-Meana, M., Garcia-Dorado, D., Hofstaetter, B., Piper, H.M., and Soler-Soler, J. (1999). Propagation of cardiomyocyte hypercontracture by passage of Na<sup>(+)</sup> through gap junctions. *Circ Res* 85, 280-287.

Ruiz-Meana, M., Inserte, J., Fernandez-Sanz, C., Hernando, V., Miro-Casas, E., Barba, I., and Garcia-Dorado, D. (2011). The role of mitochondrial permeability transition in reperfusion-induced cardiomyocyte death depends on the duration of ischemia. *Basic Res Cardiol* 106, 1259-1268.

Russell, J.C., and Proctor, S.D. (2006). Small animal models of cardiovascular disease: tools for the study of the roles of metabolic syndrome, dyslipidemia, and atherosclerosis. *Cardiovasc Pathol* 15, 318-330.

Sack, M.N., and Yellon, D.M. (2003). Insulin therapy as an adjunct to reperfusion after acute coronary ischemia: a proposed direct myocardial cell survival effect independent of metabolic modulation. *J Am Coll Cardiol* 41, 1404-1407.

Sanchis, D., Llovera, M., Ballester, M., and Comella, J.X. (2008). An alternative view of apoptosis in heart development and disease. *Cardiovasc Res* 77, 448-451.

Saraste, A., and Pulkki, K. (2000). Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528-537.

Scarpellini, E., and Tack, J. (2012). Food allergy: from diagnosis to treatment. *Dig Dis* 30, 224-231.

Schaefer, K.S., Doughman, Y.Q., Fisher, S.A., and Watanabe, M. (2004). Dynamic patterns of apoptosis in the developing chicken heart. *Dev Dyn* 229, 489-499.

Schmid, G.M., Converset, V., Walter, N., Sennitt, M.V., Leung, K.Y., Byers, H., Ward, M., Hochstrasser, D.F., Cawthorne, M.A., and Sanchez, J.C. (2004). Effect of high-fat diet on the expression of proteins in muscle, adipose tissues, and liver of C57BL/6 mice. *Proteomics* 4, 2270-2282.

Schulz, R. (2008). TNFalpha in myocardial ischemia/reperfusion: damage vs. protection. *J Mol Cell Cardiol* 45, 712-714.

Schulz, R., and Heusch, G. (2009). Tumor necrosis factor-alpha and its receptors 1 and 2: Yin and Yang in myocardial infarction? *Circulation* 119, 1355-1357.

Schwarte, L.A., Zuurbier, C.J., and Ince, C. (2000). Mechanical ventilation of mice. *Basic Res Cardiol* 95, 510-520.

Schwartz, M.W., Baskin, D.G., Kaiyala, K.J., and Woods, S.C. (1999). Model for the regulation of energy balance and adiposity by the central nervous system. *Am J Clin Nutr* 69, 584-596.

Sharma, V., Kearney, M.T., Davidson, S.M., and Yellon, D.M. (2014). Endothelial Insulin Resistance Protects the Heart Against Prolonged Ischemia-Reperfusion Injury But Does Not Prevent Insulin Transport Across the Endothelium in a Mouse Langendorff Model. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*.

Shetty, G.K., Economides, P.A., Horton, E.S., Mantzoros, C.S., and Veves, A. (2004). Circulating adiponectin and resistin levels in relation to metabolic factors, inflammatory markers, and vascular reactivity in diabetic patients and subjects at risk for diabetes. *Diabetes Care* 27, 2450-2457.

Shibata, R., Izumiya, Y., Sato, K., Papanicolaou, K., Kihara, S., Colucci, W.S., Sam, F., Ouchi, N., and Walsh, K. (2007). Adiponectin protects against the development of systolic dysfunction following myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol* 42, 1065-1074.

Shibata, R., Sato, K., Pimentel, D.R., Takemura, Y., Kihara, S., Ohashi, K., Funahashi, T., Ouchi, N., and Walsh, K. (2005). Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms. *Nat Med* 11, 1096-1103.

Sierra-Johnson, J., Wright, S.R., Lopez-Jimenez, F., and Allison, T.G. (2005). Relation of body mass index to fatal and nonfatal cardiovascular events after cardiac rehabilitation. *Am J Cardiol* 96, 211-214.

Silswal, N., Singh, A.K., Aruna, B., Mukhopadhyay, S., Ghosh, S., and Ehtesham, N.Z. (2005). Human resistin stimulates the pro-inflammatory cytokines TNF-alpha and IL-12 in macrophages by NF-kappaB-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun* 334, 1092-1101.

Silva, M.N., Markland, D., Minderico, C.S., Vieira, P.N., Castro, M.M., Coutinho, S.R., Santos, T.C., Matos, M.G., Sardinha, L.B., and Teixeira, P.J. (2008). A randomized controlled trial to evaluate self-determination theory for exercise adherence and weight control: rationale and intervention description. *BMC Public Health* 8, 234.

Singh, V.P., Baker, K.M., and Kumar, R. (2008). Activation of the intracellular renin-angiotensin system in cardiac fibroblasts by high glucose: role in extracellular matrix production. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1675-1684.

Smart, N., Mojet, M.H., Latchman, D.S., Marber, M.S., Duchen, M.R., and Heads, R.J. (2006). IL-6 induces PI 3-kinase and nitric oxide-dependent protection and preserves mitochondrial function in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res* 69, 164-177.

Smith, C.C., Dixon, R.A., Wynne, A.M., Theodorou, L., Ong, S.G., Subrayan, S., Davidson, S.M., Hausenloy, D.J., and Yellon, D.M. (2010). Leptin-induced cardioprotection involves JAK/STAT signaling that may be linked to the mitochondrial permeability transition pore. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 299, H1265-1270.

Smith, C.C., Mocanu, M.M., Davidson, S.M., Wynne, A.M., Simpkin, J.C., and Yellon, D.M. (2006). Leptin, the obesity-associated hormone, exhibits direct cardioprotective effects. *Br J Pharmacol* 149, 5-13.

Smith, C.C., and Yellon, D.M. (2011). Adipocytokines, cardiovascular pathophysiology and myocardial protection. *Pharmacol Ther* 129, 206-219.

Sodi-Pallares, D., Testelli, M.R., Fishleder, B.L., Bisteni, A., Medrano, G.A., Friedland, C., and De Micheli, A. (1962). Effects of an intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. A preliminary clinical report. *Am J Cardiol* 9, 166-181.

Song, L., Yang, H., Wang, H.X., Tian, C., Liu, Y., Zeng, X.J., Gao, E., Kang, Y.M., Du, J., and Li, H.H. (2012). Inhibition of 12/15 lipoxygenase by baicalein reduces myocardial ischemia/reperfusion injury via modulation of multiple signaling pathways. *Apoptosis*.

Srikanthan, P., and Horwich, T.B. (2012). The obesity paradox: time for a new look at an old paradigm. *Rev Esp Cardiol (Engl Ed)* 65, 403-404.

Stamler, R., Ford, C.E., and Stamler, J. (1991). Why do lean hypertensives have higher mortality rates than other hypertensives? Findings of the Hypertension Detection and Follow-up Program. *Hypertension* 17, 553-564.

Stangherlin, A., Gesellchen, F., Zoccarato, A., Terrin, A., Fields, L.A., Berrera, M., Surdo, N.C., Craig, M.A., Smith, G., Hamilton, G., *et al.* (2011). cGMP signals modulate cAMP levels in a compartment-specific manner to regulate catecholamine-dependent signaling in cardiac myocytes. *Circ Res* 108, 929-939.

Steppan, C.M., Bailey, S.T., Bhat, S., Brown, E.J., Banerjee, R.R., Wright, C.M., Patel, H.R., Ahima, R.S., and Lazar, M.A. (2001). The hormone resistin links obesity to diabetes. *Nature* 409, 307-312.

Sutton, M.G., and Sharpe, N. (2000). Left ventricular remodeling after myocardial infarction: pathophysiology and therapy. *Circulation* 101, 2981-2988.

Swynghedauw, B. (1999). Molecular mechanisms of myocardial remodeling. *Physiol Rev* 79, 215-262.

Szczesny, G., Veihelmann, A., Massberg, S., Nolte, D., and Messmer, K. (2004). Long-term anaesthesia using inhalatory isoflurane in different strains of mice-the haemodynamic effects. *Lab Anim* 38, 64-69.

Tarnavski, O., McMullen, J.R., Schinke, M., Nie, Q., Kong, S., and Izumo, S. (2004). Mouse cardiac surgery: comprehensive techniques for the generation of mouse models of human diseases and their application for genomic studies. *Physiol Genomics* 16, 349-360.

Teshima, Y., Takahashi, N., Thuc, L.C., Nishio, S., Nagano-Torigoe, Y., Miyazaki, H., Ezaki, K., Yufu, K., Hara, M., Nakagawa, M., *et al.* (2010). High-glucose condition reduces cardioprotective effects of insulin against mechanical stress-induced cell injury. *Life Sci* 87, 154-161.

Thakker, G.D., Frangogiannis, N.G., Bujak, M., Zymek, P., Gaubatz, J.W., Reddy, A.K., Taffet, G., Michael, L.H., Entman, M.L., and Ballantyne, C.M. (2006). Effects of diet-induced obesity on inflammation and remodeling after myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 291, H2504-2514.

Thakker, G.D., Frangogiannis, N.G., Zymek, P.T., Sharma, S., Raya, J.L., Barger, P.M., Taegtmeier, H., Entman, M.L., and Ballantyne, C.M. (2008). Increased myocardial susceptibility to repetitive ischemia with high-fat diet-induced obesity. *Obesity (Silver Spring)* 16, 2593-2600.

Thibault, H., Gomez, L., Donal, E., Pontier, G., Scherrer-Crosbie, M., Ovize, M., and Derumeaux, G. (2007). Acute myocardial infarction in mice: assessment of transmural by strain rate imaging. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 293, H496-502.

Thomas, G., Khunti, K., Curcin, V., Molokhia, M., Millett, C., Majeed, A., and Paul, S. (2013). Obesity Paradox in People Newly Diagnosed With Type 2 Diabetes With and Without Prior Cardiovascular Disease. *Diabetes Obes Metab.*

Thompson, P.L., Fletcher, E.E., and Katavatis, V. (1979). Enzymatic indices of myocardial necrosis: influence on short- and long-term prognosis after myocardial infarction. *Circulation* 59, 113-119.

Trayhurn, P., and Wood, I.S. (2004). Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue. *Br J Nutr* 92, 347-355.

Tresaco, B., Bueno, G., Pineda, I., Moreno, L.A., Garagorri, J.M., and Bueno, M. (2005). Homeostatic model assessment (HOMA) index cut-off values to identify the metabolic syndrome in children. *J Physiol Biochem* 61, 381-388.

Varfolomeev, E.E., Schuchmann, M., Luria, V., Chiannikulchai, N., Beckmann, J.S., Mett, I.L., Rebrikov, D., Brodianski, V.M., Kemper, O.C., Kollet, O., *et al.* (1998).



Targeted disruption of the mouse Caspase 8 gene ablates cell death induction by the TNF receptors, Fas/Apo1, and DR3 and is lethal prenatally. *Immunity* 9, 267-276.

Vendrell, J., Broch, M., Vilarrasa, N., Molina, A., Gomez, J.M., Gutierrez, C., Simon, I., Soler, J., and Richart, C. (2004). Resistin, adiponectin, ghrelin, leptin, and proinflammatory cytokines: relationships in obesity. *Obes Res* 12, 962-971.

Vivo, R.P., Krim, S.R., Cevik, C., and Witteles, R.M. (2009). Heart failure in Hispanics. *J Am Coll Cardiol* 53, 1167-1175.

Wanahita, N., Messerli, F.H., Bangalore, S., Gami, A.S., Somers, V.K., and Steinberg, J.S. (2008). Atrial fibrillation and obesity--results of a meta-analysis. *Am Heart J* 155, 310-315.

Wang, H., Luo, W., Wang, J., Guo, C., Wang, X., Wolffe, S.L., Bodary, P.F., and Eitzman, D.T. (2012). Obesity-induced endothelial dysfunction is prevented by deficiency of P-selectin glycoprotein ligand-1. *Diabetes* 61, 3219-3227.

Wang, T.J., Parise, H., Levy, D., D'Agostino, R.B., Sr., Wolf, P.A., Vasan, R.S., and Benjamin, E.J. (2004). Obesity and the risk of new-onset atrial fibrillation. *Jama* 292, 2471-2477.

Warren, S.E., Royal, H.D., Markis, J.E., Grossman, W., and McKay, R.G. (1988). Time course of left ventricular dilation after myocardial infarction: influence of infarct-related artery and success of coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 11, 12-19.

Wassertheil-Smoller, S., Fann, C., Allman, R.M., Black, H.R., Camel, G.H., Davis, B., Masaki, K., Pressel, S., Prineas, R.J., Stamler, J., *et al.* (2000). Relation of low body mass to death and stroke in the systolic hypertension in the elderly program. The SHEP Cooperative Research Group. *Arch Intern Med* 160, 494-500.

Weisberg, S.P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R.L., and Ferrante, A.W., Jr. (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *J Clin Invest* 112, 1796-1808.

Wensley, I., Salaveria, K., Bulmer, A.C., Donner, D.G., and du Toit, E.F. (2013). Myocardial structure, function and ischaemic tolerance in a rodent model of obesity with insulin resistance. *Exp Physiol* 98, 1552-1564.

Wilson, P.W., D'Agostino, R.B., Sullivan, L., Parise, H., and Kannel, W.B. (2002). Overweight and obesity as determinants of cardiovascular risk: the Framingham experience. *Arch Intern Med* 162, 1867-1872.

Wilson, R.B., and Hartroft, W.S. (1970). Pathogenesis of myocardial infarcts in rats fed a thrombogenic diet. *Arch Pathol* 89, 457-469.

Winzell, M.S., and Ahren, B. (2004). The high-fat diet-fed mouse: a model for studying mechanisms and treatment of impaired glucose tolerance and type 2 diabetes. *Diabetes* 53 Suppl 3, S215-219.

Wong, V.W., Mardini, M., Cheung, N.W., and Mihailidou, A.S. (2011). High-dose insulin in experimental myocardial infarction in rabbits: protection against effects of hyperglycaemia. *J Diabetes Complications* 25, 122-128.

Xu, H., Barnes, G.T., Yang, Q., Tan, G., Yang, D., Chou, C.J., Sole, J., Nichols, A., Ross, J.S., Tartaglia, L.A., *et al.* (2003). Chronic inflammation in fat plays a crucial role in the development of obesity-related insulin resistance. *J Clin Invest* 112, 1821-1830.

Xu, Y., Huo, Y., Toufektsian, M.C., Ramos, S.I., Ma, Y., Tejani, A.D., French, B.A., and Yang, Z. (2006). Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290, H692-699.

Ya, J., van den Hoff, M.J., de Boer, P.A., Tesink-Taekema, S., Franco, D., Moorman, A.F., and Lamers, W.H. (1998). Normal development of the outflow tract in the rat. *Circ Res* 82, 464-472.

Yamate, J., Tajima, M., Kudow, S., and Sannai, S. (1990). Background pathology in BDF1 mice allowed to live out their life-span. *Lab Anim* 24, 332-340.

Yang, F., Liu, Y.H., Yang, X.P., Xu, J., Kapke, A., and Carretero, O.A. (2002). Myocardial infarction and cardiac remodelling in mice. *Exp Physiol* 87, 547-555.

Yang, X.P., Liu, Y.H., Rhaleb, N.E., Kurihara, N., Kim, H.E., and Carretero, O.A. (1999). Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *Am J Physiol* 277, H1967-1974.

Yang, Y., Ma, Y., Han, W., Li, J., Xiang, Y., Liu, F., Ma, X., Zhang, J., Fu, Z., Su, Y.D., *et al.* (2008). Age-related differences in postinfarct left ventricular rupture and remodeling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 294, H1815-1822.

Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., and Maruyama, Y. (1998). Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 97, 276-281.

Yaoita, H., Ogawa, K., Maehara, K., and Maruyama, Y. (2000). Apoptosis in relevant clinical situations: contribution of apoptosis in myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 45, 630-641.

Ye, J., Yang, L., Sethi, R., Copps, J., Ramjiawan, B., Summers, R., and Deslauriers, R. (1997). A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Mol Cell Biochem* 176, 227-233.

Yu, Q., Gao, F., and Ma, X.L. (2011). Insulin says NO to cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 89, 516-524.

Yudkin, J.S., Kumari, M., Humphries, S.E., and Mohamed-Ali, V. (2000). Inflammation, obesity, stress and coronary heart disease: is interleukin-6 the link? *Atherosclerosis* 148, 209-214.

Zhang, Y., Proenca, R., Maffei, M., Barone, M., Leopold, L., and Friedman, J.M. (1994). Positional cloning of the mouse obese gene and its human homologue. *Nature* 372, 425-432.

Zhao, X., Ho, D., Gao, S., Hong, C., Vatner, D.E., and Vatner, S.F. (2011). Arterial Pressure Monitoring in Mice. *Curr Protoc Mouse Biol* 1, 105-122.

Zhou, Y.T., Grayburn, P., Karim, A., Shimabukuro, M., Higa, M., Baetens, D., Orci, L., and Unger, R.H. (2000). Lipotoxic heart disease in obese rats: implications for human obesity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 1784-1789.

Zhu, S.G., Xi, L., and Kukreja, R.C. (2012). Type 2 diabetic obese db/db mice are refractory to myocardial ischaemic post-conditioning in vivo: potential role for Hsp20, F1-ATPase delta and Echs1. *J Cell Mol Med* 16, 950-958.

Zolotareva, A.G., and Kogan, M.E. (1978). Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* 20, 308-314.



## APÉNDICE

### Instrumental utilizado durante el proceso quirúrgico

<i>Instrumental</i>	<i>Especificaciones</i>	<i>Finalidad</i>	<i>Referencia<sup>a</sup></i>
Tijeras de disección.	Punta roma, tipo 15,5 cm tamaño 6 1/8".	Todos los procesos de disección.	Martin, 11-365-15
Pinza disección.	Rectas, 12 cm, 1x2 dientes.	Todos los procesos de disección.	Medicon, 06.21.12
Porta-agujas.	Con cerradura, recto, 11,5 cm.	Ligadura de la arteria coronaria y suturas.	Medicon, 10.12.11
Retractor.	3x3 dientes, 3 cm, máxima apertura 1,8 cm.	Separación de costillas, facilitar acceso al corazón.	F.S.T., 17003-03
Retractor de alambre.	Sin dientes, máxima apertura 1,5 cm.	Separación de piel y tejido muscular.	F.S.T., 17000-03
Pinza microcirugía.	Curva, dentada, 10 cm.	Ligadura de la arteria coronaria. Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular. Traqueotomía.	Medicon, 07.55.20
Pinza microcirugía.	Curva, 11,5 cm.	Ligadura de la arteria coronaria. Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular. Traqueotomía.	Medicon, 07.60.07
Pinza disección.	Recta, dentada, 10 cm.	Ligadura de la arteria coronaria.	Medicon, 07.55.10
Pinza mosquito.	Recta, dentada, con cerradura, 13 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Elcon, 151-113
Tijeras tipo cinta.	Punta afilada, rectas, anillos extragrandes, 10 cm.	Traqueotomía.	Medicon, 02.50.22
Pinza hemostática.	Curva, dentada, 10 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Dimeda, 12.211.10
Pinza hemostática.	Curva, dentada, 12,5 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	Dimeda, 12.221.12
Tijeras microcirugía.	Punta afilada, recta, 8 cm.	Canulación de la arteria carótida y de la vena yugular.	F.S.T., 15000-08
Pinza Dumont 5-45.	Punta angulada 45°, 11 cm.	Introducción de la cánula en la arteria carótida y la vena yugular.	F.S.T., 11253-25

<sup>a</sup> Casa comercial y número de referencia

