

65
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

CUAUTITLAN



**"EFECTO DE LA NIFEDIPINA EN EL INFAR-
TO AGUDO AL MIOCARDIO EN RATA.
ESTUDIO REALIZADO A NIVEL DE MICROS-
COPIA OPTICA Y ELECTRONICA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P R E S E N T A M :

*DULCE MARIA RUVALCABA SIL
LUIS ARMANDO MARTINEZ ALTAMIRANO
RICARDO PEREZ PASTEN BORJA*

Asesores: M. en C. Luisa Martínez Aguilar
PhD. Eliseo Hernández Baumgarten
M. en C. Sofía González Gallardo
M.V.Z. Jorge Torres Martínez

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

CUAUTITLAN IZCALLI, EDO. DE MEXICO

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

ABREVIATURAS.....	1
RESUMEN.....	2
1. INTRODUCCION.	
1.1 INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.....	4
1.2 FACTORES DE RIESGO.....	6
1.3 PATOGENIA.	
1.3.1 OCLUSION CORONARIA EN EL HUMANO.....	11
1.3.2 DAÑO ISQUEMICO.....	14
1.3.3 CONSIDERACIONES FISIOPATOLOGICAS.....	21
1.4 TRASCENDENCIA.....	25
1.5 FARMACOLOGIA EN EL INFARTO AL MIOCARDIO.....	30
1.5.1 CALCIO ANTAGONISTAS.....	31
1.6 ANALISIS MORFOLOGICO DEL INFARTO.....	41
1.7 ANTECEDENTES.....	43
1.8 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	45
2. OBJETIVOS.....	47
3. MATERIALES Y METODOS.	
3.1 MATERIAL.	
3.1.1 Reactivos y Soluciones.....	48
3.1.2 Aparatos y Equipo.....	49
3.1.3 Material Biológico.....	50
3.2 METODOS.	
3.2.1 Distribución de Lotes.....	51
3.2.2 Ligadura Experimental en Rata.....	51
3.2.3 Procedimientos de Perfusión y Fijación Para Microscopia Electrónica de Transmisión.....	51
3.2.4 Deshidratación e Inclusión en Resina para Micros-	

copia Electrónica de Transmisión (MET).....	52
3.2.5 Corte y Tinción de Muestras Para Microscopia Electrónica de Transmisión (MET).....	53
3.2.6 Fijación, Deshidratación e Inclusión en Parafina para Microscopia Optica (MO).....	54
3.2.7 Cortes finos y tinción Tricrómica de Masson para Microscopia Optica.....	54
3.2.8 Estudios Cualitativos.....	55
3.2.9 Estudios Semi-Cuantitativos.....	56
4. RESULTADOS.	
4.1 Resultados Cualitativos de Microscopia Optica y Electrónica.....	60
4.2 Estudios Semi-Cuantitativos.	
4.2.1 Morfometría Sub-Celular.....	87
4.2.2 Efectos de Nifedipina Sobre la Arquitectura Sub- Celular.....	88
5. DISCUSION.....	102
6. CONCLUSIONES.....	107
7. BIBLIOGRAFIA: Referencias.....	108

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Síndromes Coronarios.....	13
2	Balance Entre Aporte y Demanda de Oxígeno.....	18
3	Isquemia Aguda (Hemodinámia).....	19
4	Muerte Celular Post-Isquemia.....	20
5	Expansión y Extensión del Infarto.....	24
6	Falla Miocárdica Post-Infarto.....	28
7	Sistemas de Transporte de Calcio.....	40
8	Diagrama de Trabajo Experimental.....	57
9	Ligadura de la Arteria Coronaria Descendente Anterior Izquierda.....	58
10	Disección del Corazón de Rata.....	59
11	Micrografía Control Sano.....	66
12	Micrografía 15x Control Infartado.....	67
13	Micrografía 15x Grupo Tratado con Nifedipina....	68
14	Micrografía 100x Grupo Control Infartado.....	69
15	Micrografía 40x Grupo Control Infartado.....	70
16	Micrografía 100x Grupo Control Infarto.....	71
17	Micrografía 100x Grupo Tratado con Nifedipina....	72
18	Micrografía 100x Grupo Tratado con Nifedipina....	73
19	Micrografía 100x Grupo Control Infartado.....	74
20	Micrografía 20,000x Núcleos Grupo Control Sano...	75
21	Micrografía 10,000x Núcleos Grupo Control Infarta- do.....	76
22	Micrografía 6000x Núcleo Grupo Tratado con Nife- dipina.....	77
23	Micrografía 6000x Sarcómeros Grupo Control Sano..	78

24	Micrografía 6000x Sarcómeros Grupo Control Infartado.....	79
25	Micrografía 15,000x Sarcómeros Grupo Tratado con Nifedipina.....	80
26	Micrografía 20,000x Mitocondrias Grupo Control Sano	81
27	Micrografía 20,000x Mitocondrias Grupo Control Sano	82
28	Micrografía 20,000x Mitocondrias Grupo Control -- Infartado.....	83
29	Micrografía 10,000x Mitocondrias Grupo Control --	84
30	Micrografía 10,000x Mitocondrias Grupo Tratado con Nifedipina.....	85
31	Micrografía 10,000x Mitocondrias Grupo Tratado con Nifedipina.....	86
32	Tamaño de Mitocondria en Grupo Control Sano.....	91
33	Número de Mitocondrias por 100 micras ² Control Sano	92
34	Tamaño de Mitocondria Grupo Control Infartado....	93
35	Número de Mitocondrias por 100 micras ² Control Infartado.....	94
36	Porcentaje de Mitocondrias Grupo Control Infartado	95
37	Tamaño de Mitocondrias Grupo Tratado con Nifedipina.....	96
38	Número de Mitocondrias por 100 micras ² Grupo Tratado con Nifedipina.....	97
39	Porcentaje de Mitocondrias Grupo Tratado con Nifedi-	

	pina.....	98
40	Comparación de Tamaños de Mitocondrias.....	99
41	Comparación de Número de Mitocondrias por 100 micras ²	100
42	Comparación de Porcientos de Mitocondrias.....	101

INDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Riesgo de Infarto, Estimado Según el Factor Predisponente.....	5
2	Infarto Según Arteria Coronaria Ocluida.....	29
3	Farmacología del Infarto.....	37
4	Grupos de bloqueadores de Calcio más Importantes..	38
5	Tipos de Corrientes de Calcio.....	39
6	Daño Celular. Microscopia Optica.....	62
7	Daño Celular. Microscopia Electrónica.....	63
8	Resultados de Microscopia Optica.....	64
9	Resultados de Microscopia Electrónica.....	65

ABREVIATURAS.

ADENOSIN TRIFOSFATO	ATP
DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA	ADI
CREATININFOSFATO	CP
FOSFATO DE ALTA ENERGIA	FAE
INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO	IAM
ISQUEMIA-REPERFUSION	I/R
LIPIDOS DE ALTA DENSIDAD	HDL
LIPIDOS DE BAJA DENSIDAD	LDL
MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION	MET
MICROSCOPIA OPTICA	MO
POLIMORFONUCLEARES	PMN's
SOLUCION SALINA FISIOLÓGICAS	SSF
VOLUMEN MAXIMO DE OXIGENO	VO2

RESUMEN

Una gran variedad de fármacos, se han estudiado con la intención de disminuir el tamaño del infarto, entre estos la nifedipina, la cual ha demostrado capacidad cardioprotectora (52). Este fármaco es clasificado como un bloqueador del canal lento de calcio y ha demostrado ser uno de los más potentes vasodilatadores (75). Se ha estudiado experimentalmente su capacidad para disminuir el tamaño del infarto (53,55,59).

Sin embargo, se conoce poco de su mecanismo a nivel sub-celular, además no se ha demostrado por morfometría sus efectos tisulares.

Por ello, el objetivo de éste estudio fué realizar el análisis por microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (MET) para determinar el efecto de la nifedipina a nivel sub-celular ante la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (DAI).

Para cumplir esta finalidad se utilizaron 12 ratas Wistar macho de 200 a 300g de peso; cuatro de ellas se emplearon como controles sin oclusión (sanos: como referencia de tejido normal). El segundo grupo se les administró media hora antes de la cirugía solamente vehículo y se les ocluyó la DAI (fungiendo como controles infartados sin fármaco) y por último los cuatro animales restantes se les administró nifedipina (5mcg/kg de peso), como grupo tratado. Después de 4h de oclusión, se procesaron los corazones de los diferentes grupos estudiados, por técnicas convencionales de M.O. Y M.E.T. Los resultados por M.O. fueron determinados por las diferencias encontradas en relación con el tejido sano. Siendo las alteraciones más frecuentes la necrosis coagulativa, congestión, edema,

hemorragia, vacuolización y careolisis. Observándose que el control infartado presentó estas alteraciones con mayor severidad en comparación al grupo tratado.

En base a los resultados obtenidos por M.E.T., se pudo clasificar a las mitocondrias de acuerdo a las características que presentaron en aquellas que permanecieron normales, las dañadas y las lisadas. Y en función de éstas, se determinó el tamaño, No. de mito./100 micras cuadradas y porcentaje, respectivamente.

En cuanto al tamaño de mitocondria normal, fué constante para controles sanos y mitocondrias normales de control infartado y grupo tratado. Pero el tamaño de mitocondria dañada de control infartado fué superior al tamaño de mitocondria dañada de grupo tratado, en donde el tamaño prácticamente correspondió al tamaño normal promedio determinado. El tamaño de mitocondria lisada carece de utilidad.

En función al número de mitocondrias se determinó el porcentaje respectivo para cada población de mitocondrias (normales, dañadas y lisadas) de cada uno de los controles sano e infartado, así como grupo tratado. Comparando las poblaciones de los tres diferentes grupos, se pudo observar como en controles sin oclusión (sano) a infartado la población de mitocondrias normales disminuyó, mostrando a su vez un el incremento de mitocondrias dañadas y lisadas. En el grupo tratado, disminuyó sensible la población de mitocondrias dañadas, con el aumento concomitante del número de mitocondrias normales, manteniendo constante la cantidad de mitocondrias lisadas.

De éste estudio, se puede decir que la nifedipina tiene una acción protectora de la integridad mitocondrial, ya que atenúa el edema mitocondrial. Además que la nifedipina administrada durante las cuatro primeras horas disminuye el daño en este organelo.

1) INTRODUCCION.

1.1. INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.

El infarto al miocardio es la mayor causa de muerte en países desarrollados (13). Aproximadamente en E.U. una de cada tres muertes, o cerca de 600,000 muertes por año, se deben a padecimientos coronarios, principalmente el infarto agudo al miocardio (IAM) (43). En México, todo parece indicar que la cardiopatía isquémica en los últimos años va tomando un papel cada vez más importante como causa de muerte en la población general (47). Durante el año de 1989 (reportado en Marzo de 1992), la mortalidad por causas cardiacas fué la primer causa de defunción en el país, con una incidencia de 58,102 individuos y por infarto agudo al miocardio fué de 21,347 habitantes, o sea, el 36.74% de todas las causas cardiacas, con una tasa de 25 defunciones a consecuencia del infarto por cada 100,000 habitantes (62).

En un estudio realizado en el Instituto Nacional de Cardiología con 538 pacientes admitidos por cardiopatía isquémica, el 94% de los casos el IAM fué la primera manifestación y el 27% presentaron complicaciones de fase aguda (20).

El infarto consiste en la oclusión del flujo sanguíneo de las arterias coronarias con la subsecuente isquemia, arritmias y necrosis tisular. Esto se da como resultado de la compleja interacción de los factores de riesgo que predisponen a este padecimiento (13,26,29,43). Tales como tabaquismo, niveles de colesterol sérico, hipertensión, tolerancia a la glucosa, niveles de estrógenos, vasoespasmo, entre otros (Tabla No 1.) (43).

Tabla 1. Riesgo de Infarto Estimado según el Factor Predisponente.

FACTOR	RIESGO ESTIMADO
FUMAR	50-70%, (EN FUMADORES DE MAS DE 5 AÑOS) COMPARADO CON NO FUMADORES.
COLESTEROL SERICO	2-3% DE RIESGO POR CADA 1% DE AUMENTO DE COLESTEROL SERICO.
HIPERTENSION	2-3% DE AUMENTO EN EL RIESGO POR CADA AUMENTO DE 1mmHg DE PRESION DIASTOLICA.
ESTILO DE VIDA	UN RIESGO AUMENTADO DEL 45% EN AQUELLOS QUE TIENEN UN ESTILO DE VIDA SEDENTARIA.
OBESIDAD	35-55% DE AUMENTO EN EL RIESGO DE INFARTO PARA AQUELLOS QUE TENGAN UN PESOS >20% DEL PESO IDEAL.

5

1.2 FACTORES DE RIESGO.

El tabaquismo es directamente responsable del 21% de la mortalidad de todas las enfermedades cardiacas, o cerca de 115,000 muertes anuales. La prevalencia del tabaquismo es mayor en hombres que en mujeres.

El hábito de fumar ha demostrado que la incidencia de enfermedades coronarias se ha incrementado más del doble, así como la mortalidad por enfermedad coronaria en un 70%.

La adicción al tabaco también actúa sinérgicamente con otros factores de riesgo coronario, por ejemplo, las usuarias de anticonceptivos orales tienen cuatro veces más riesgo de infarto al miocardio que las no usuarias; pero las mujeres que fuman prominentemente y usan anticonceptivos orales tienen 39 veces más riesgo de infarto que las usuarias de estos fármacos exclusivamente. El incremento del riesgo con la asociación de fumar y diabetes, hiperlipoproteinemia, hipertensión y otras más, también son algo más que una suma de riesgos (26,43).

La reducción estimada del riesgo de infarto asociado con dejar de fumar es de un 50% a un 70% (43).

La investigación básica en cuanto a los niveles de colesterol sérico, han mostrado una relación estrecha entre los niveles de colesterol sérico y el riesgo de enfermedad cardiaca. Esta ha sido juzgada como casual por varias instituciones de salud norteamericanas (26,43). Estudios recientes, indican que la reducción del 1% de los niveles de colesterol total sérico abate de 2% a 3% el riesgo de enfermedad coronaria, por el contrario un aumento en el

10% del colesterol sérico aumenta un 21% el riesgo de muerte por enfermedad coronaria(43).

En la población en general sin distinciones, los niveles séricos de colesterol y lípidos de baja densidad (LBD), están determinados por la dieta, ambiente exterior y factores genéticos (43).

Los niveles de lípidos de alta densidad (LAD) a diferencia de LBD y colesterol total, son inversamente proporcional al riesgo de enfermedad coronaria. Un incremento del 11% en la concentración sérica de LAD disminuye en un 34% el riesgo en la incidencia de enfermedad coronaria, independientemente de los niveles séricos de LBD.

La reducción estimada en el riesgo de infarto al miocardio es de 2% a 3% por cada 1% de reducción en los niveles séricos de colesterol(43,57).

Estudios prospectivos, han demostrado que la presión sanguínea elevada esta asociada con el riesgo de paro cardiaco, infarto al miocardio y la mortalidad relacionada a todas las causas vasculares(43,57).

El uso de fármacos antihipertensivos, han demostrado efectos benéficos sobre la prevención de paro e infarto al miocardio. Con esta terapia se ha demostrado que la disminución de la presión diastólica reducida en promedio de 5 a 6 mmHg, reduce significativamente la mortalidad dada por causas de tipo vascular; en un 21% la incidencia de paro cardiaco, y la incidencia de infarto al miocardio de un 14% a un 17% (43).

Aunque la mayoría de los estudios se han concentrado en la presión diastólica elevada, la presión sistólica elevada es también un fuerte predictor de enfermedad cardiovascular (43).

Antes de los 45 años, la hipertensión sistólica esencial, es poco usual, y se incrementa marcadamente después de los 55 años. Es más común en mujeres que en hombres y afecta al 30% de aquellos entre 65 y 74 años.

Aproximadamente la disminución de 11.1 mmHg la presión sistólica y 3.4 mmHg la presión diastólica, disminuye 36% la incidencia de paro y 27% la incidencia de infarto(43).

Por otro lado, se ha relacionado el estilo de vida sedentaria con enfermedades coronarias, en donde se ha observado un efecto protector llevando un vida físicamente activa, variando en magnitud de un 10% a un 50% (43,18). Un efecto importante de la vida sedentaria es la obesidad y una mala composición corporal; por ejemplo un niño mexicano ve T.V. de 3 a 5h diarias, en esto se ha demostrado, que el volumen máximo de oxígeno (VO₂) es uno de los mas bajos (18).

Por otra parte se ha reportado que manteniendo una vida activa aumenta en un 12% el VO₂ y reduce de un 35 a un 55% el riesgo de infarto (43,18).

La obesidad está relacionada como causa de diabetes mellitus, hipertensión y alteraciones en el metabolismo de los lípidos (43). Aunque en México la prevalencia de la obesidad no ha sido establecida, informes preliminares indican que del 12 al 14% de los hombres entre los 20 y 60 años de edad son obesos, mientras que del 21 al 23% de las mujeres entre los 15 y 60 años presentan esta patología (18). Este porcentaje elevado de obesidad que existe en México, puede en un futuro representar un problema de salud, debido a sus efectos "per se" y su asociación con enfermedades cardiovasculares.

Algunos autores han determinado que la reducción estimada de riesgo de infarto es de 35 a 55%, manteniendo un peso ideal comparado con obesos (>20% del peso corporal ideal) (43,18).

Al parecer, la diabetes acelera el desarrollo de factores de riesgo que conducen al infarto, así mismo esta enfermedad incrementa la tendencia a trombosis, neuropatía cardíaca y a la cardiomiopatía diabética (26,43,47,57).

De alguna manera, los estrógenos endógenos tienen un papel importante en el bajo riesgo de enfermedad cardíaca obstructiva. Puesto que la incidencia de infarto en mujeres aumenta en aquellas post-menopáusicas, etapa en la cual la concentración sérica de estrógenos se ve sensiblemente abatida. La presencia de los estrógenos tiene efectos favorables en los perfiles de lípidos, reduciendo colesterol total y niveles de LBD y por lo tanto el incremento de los niveles LAD. La disminución de los estrógenos debidos a la menopausia aumentan en 44% el riesgo de infarto (43,26).

La edad, es un factor que influye marcadamente en la incidencia de IAM. El índice es mayor en varones de 40 años y en mujeres post-menopáusicas. Sin embargo, se ha incrementado el número de reportes que informan de la presencia creciente de IAM en personas jóvenes y la mayoría de ellas en la 3a década de la vida, donde ocurre muy predominantemente en varones. Además, en este grupo de población es marcado el predominio de ocupación de profesionistas y taxistas; con esto es apreciable la relación con los factores emocionales, que no han sido catalogados hasta el momento como una causa importante de infarto agudo al miocardio (26,43).

Se han relacionado factores genéticos, por ejemplo, individuos con antecedentes familiares de enfermedad vascular, se les ha encontrado homocistinuria, la que es ahora considerada como un factor importante para desarrollar enfermedades arteroscleróticas, en donde la incidencia de infarto es mayor en jóvenes (26).

1.3 PATOGENIA.

1.3.1 OCLUSION CORONARIA EN HUMANO

Como ya se ha mencionado, la oclusión coronaria puede ocurrir como consecuencia de la compleja interacción de lesiones arteroscleróticas, vasoespamo y factores activadores plaquetarios que crean las condiciones para formar trombos dentro de la arteria coronaria(26,27). Ross* propuso la teoría de daño-respuesta, ésta representa la visión más prevalente de la iniciación de la arteriosclerosis que conlleva a la oclusión coronaria responsable de los síndromes isquémicos agudos. El daño vascular y formación de trombos, son eventos clave en el origen y la progresión de los síndromes coronarios agudos. Un daño vascular mínimo permite la acumulación de lípidos y monocitos (macrófagos)(26). La liberación de productos tóxicos por los macrófagos permiten que el daño sea progresivo caracterizado por la adhesión de plaquetas. Las plaquetas y los macrófagos en conjunto con el endotelio, pueden liberar varios factores de crecimiento que inducen simultáneamente la migración y proliferación de células musculares lisas; proceso que puede contribuir a una lesión en la intima que desarrolle fibrosis o una lesión lípidica. La lesión lípidica esta rodeada de una cápsula delgada, que presenta depósitos grasos en su interior, ya sea en forma de múltiples gotas o ateroma (caracterizado por una gota); puede ser fácilmente dañada, permitiendo alteraciones más profundas con la formación de trombos. Si los trombos son pequeños pueden organizarse y contribuir al crecimiento de la placa arterosclerótica. Pero si éstos son grandes son oclusivos, y contribuyen a los síndromes coronarios agudos tales como angina

inestable, infarto al miocardio y muerte isquémica súbita (ver figura No 1.)(26,27,28).

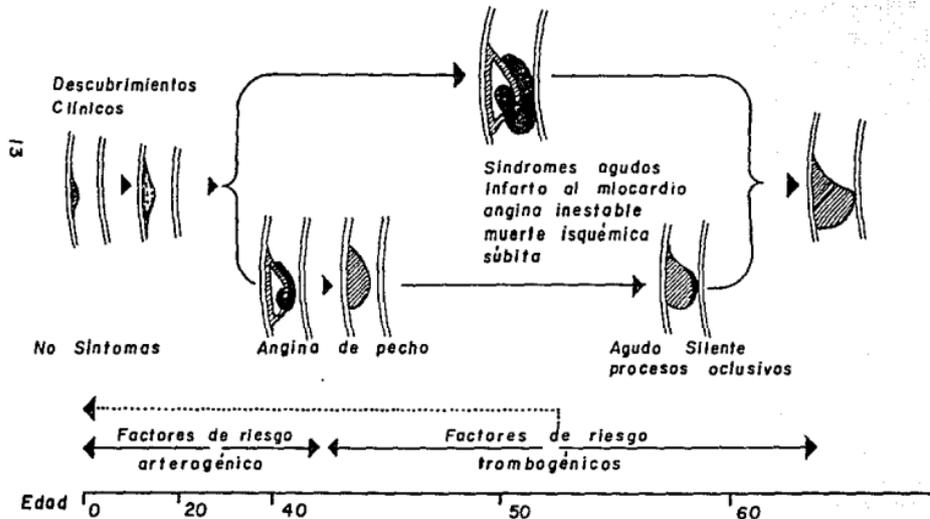
La progresión de lesiones arteroscleróticas tempranas a manifestaciones clínicas, es más rápido en personas con factores de riesgo coronario. En algunas placas la progresión es lenta y probablemente la continuación de procesos biológicos complejos iniciados por el daño crónico endotelial. Evidencias recientes sugieren que seguido a fisuras mínimas de la placa grasa o arteromatosa, con la subsecuente formación de trombos y organización fibrótica, eventualmente terminan en oclusión vascular (27).

En si, no es la severidad de la lesión, la responsable del infarto, sino, el daño a la placa con la trombosis superimpuesta, o bien, a la vasoconstricción coronaria por liberación de catecolaminas; que son los determinantes primarios de la oclusión aguda en el humano(26,27).

FIGURA No.1 SINDROMES CORONARIOS

Hallazgos
Patológicos

CRECIMIENTO DE LA PLACA				
Lesión Temprana	Placa Complicada			Oclusión Fibrotica Crónica
	Daño trombo mural	Daño trombos oclusivos	Sin daño trombos oclusivos	



1.3.2. DAÑO ISQUEMICO.

El funcionamiento normal del tejido cardiaco, está constituido por el balance entre la demanda de oxígeno y el aporte del mismo; que a su vez esta determinado por varios factores. Los tres factores más importantes de la demanda de oxígeno son la contractibilidad miocárdica, ritmo cardiaco y tensión de pared muscular. El aporte de oxígeno depende del flujo coronario, autorregulación, tamaño y calibre de arterias coronarias, numerosas sustancias vasoactivas y por último la presión diastólica (21,59) (figura No 2.).

Clásicamente, la suficiencia o insuficiencia coronaria se define en términos del equilibrio entre aporte y demanda de oxígeno (figura No 3.). El miocardio es un tejido eminentemente aeróbico que no soporta la menor deficiencia de oxígeno (21,57).

Una vez instalada la oclusión coronaria, bastan unos cuantos segundos para consumir el FAE necesario para la contracción y el sostenimiento de las funciones básicas de la célula. El metabolismo aeróbico es notoriamente insuficiente para generar el FAE necesario, de tal manera, que breve tiempo después del cese del suministro de oxígeno, el miocito empieza a sufrir las consecuencias bioquímicas, eléctricas, mecánicas e histopatológicas de la isquemia; así como la acumulación de metabolitos de deshecho que tienen efectos dañinos sobre la función y estructura del miocardio (54,55,63,67,72). En los primeros segundos después de establecida la isquemia severa los niveles de fosfato de alta energía (FAE) empiezan a disminuir, en los minutos siguientes el 80% o más del creatininfosfato (CP) se ha consumido. Después de 15 minutos el 65% del FAE tisular y 55% del total de los niveles de nucleótidos ha desaparecido. Transcurridos 40 minutos, el aporte de FAE es casi cero y la mayoría de las

células en isquemia severa son dañadas irreversiblemente y no se recuperan aún si el flujo es restaurado. La glucólisis anaeróbica es virtualmente la única fuente de FAE. Todo este proceso es estimulado por la liberación local de catecolaminas isquemia-inducido(24,36,38, 67,73).

El calcio es un regulador crucial de la bioquímica y fisiología del corazón y su concentración intracelular es cuidadosamente mantenida en un rango micromolar por diferentes sistemas de transporte, que son sensiblemente alterados por la disminución de los niveles de FAE durante la isquemia (75). Cualquier variación que causa grandes cambios en la concentración de calcio intracelular, encamina a disfunción celular profunda y paro cardíaco (39,54,55,59) (fig. No 4.). La acumulación de calcio a niveles altos, es índice de la transición entre daño reversible a irreversible. si existe calcio intracelular aumentado puede activar ATPasas, dañar mitocondrias, activar fosfolipasas y proteasas, aumentar la producción de radicales libres, dispara la liberación de catecolaminas y estimula la producción de sustancias de deshecho. En conjunto su manifestación es la pérdida de volumen celular, rompimiento de la membrana celular y gradientes iónicos (39). A nivel de mitocondria se manifiesta como pérdida de sustratos o cofactores, inhibición o destrucción de la creatinincinasa y daño de la integridad de la mitocondria (35,39). Se evidencia la presencia de calcio intramitocondrial y plasmalémico, consecuentemente se aumenta el transporte de calcio en vez de la producción FAE (39).

El miocardio sometido a periodos prolongados de ausencia de oxígeno y sustratos, pueden suceder dos situaciones, una, hace al corazón susceptible a daño severo cuando es expuesto a reperfusión y en

segunda las células dañadas reversiblemente mantienen su estructura pero las células dañadas irreversiblemente, se hinchan explosivamente con la formación de espacios subsarcolémicos, sarcómeras hipercontraídas con bandas de contracción y destrucción de membrana plasmática, permitiendo la liberación de proteínas citoplasmáticas solubles al espacio extracelular y la entrada de calcio extracelular al espacio citosol (27,28,32). Toda esta interacción compleja, se dificulta más con la respuesta celular al daño tisular desarrollado por los cambios circulatorios que por definición ocurren en la lesión isquémica. Se añaden otras alteraciones provocadas por ciertos componentes de la sangre, como los leucocitos polimorfonucleares (PMNs) que intensifican el grado de lesión tisular y además se encargan de eliminar al tejido necrosado por la isquemia. Al empezar la lesión de isquemia-reperusión (I/R), los neutrófilos sufren alteraciones funcionales y bioquímicas capaces de producir daño tisular. La presencia de neutrófilos en áreas sometidas a la I/R, es el mecanismo primario de daño y remoción celular mas importante (68,72). Como respuesta al fenómeno de I/R los PMNs se activan. Estos neutrófilos activados liberan enzimas lisosómicas capaces de producir cambios proteolíticos y daño severo a los tejidos. Además producen radicales libres de oxígeno como peróxido de hidrógeno, el radical oxidrilo, y superóxido. Estos son evidentes productores de las lesiones en la microvasculatura y el tejido muscular cardiaco. El tiempo crítico al que debe instalarse la reoxigenación sin causar el daño por reperusión, ha sido definido de hasta una hora (12,52). Por último los PMNs y macrófagos degradan al tejido necrosado. Seguido al daño agudo los miocitos viables se desinsertan de las

uniones intercalares de los miocitos irreversiblemente dañados perdiendo el anclaje necesario para la transmisión efectiva de la fuerza contráctil (68,71). Durante el proceso de restauración, los miocitos en el borde de la lesión se anclan al tejido conectivo de cicatrización que se formó desde la eliminación del tejido muerto, restableciendo la integridad estructural en un intento de restaurar en algún grado la eficiencia contráctil (71,76).

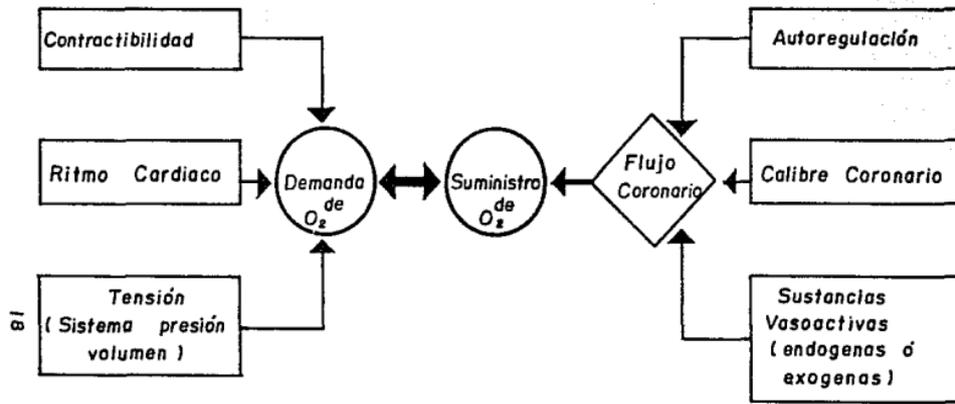
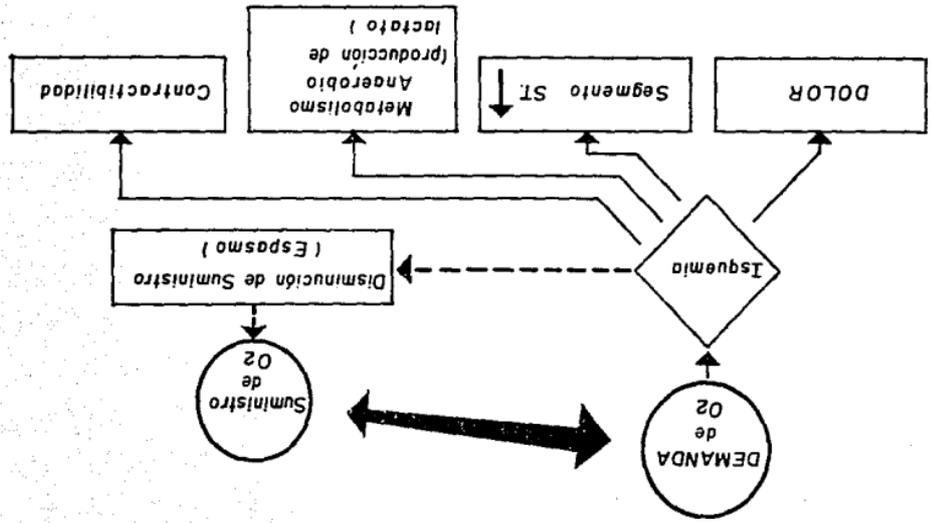


FIGURA No.2 BALANCE ENTRE APORTE Y DEMANDA DE OXIGENO

ANN. INTER. MED. 105 (5); 1986, 716

FIGURA No.3 ISQUEMIA AGUDA (HEMODINAMIA)



1.3.3. Consideraciones Fisiopatológicas.

Las determinantes más importantes del progreso clínico seguido a un IAM son la expansión y la extensión del infarto. Expansión es la dilatación de la zona de infarto y adelgazamiento regional desproporcionado, permanente y compuesto, que se ve dentro de las primeras 24h seguidas al episodio agudo del infarto (figura 5). Esta distorsión regional en la forma del ventrículo izquierdo tiene gran importancia debido a que tiene consecuencias inmediatas en la estructura general cardiaca y su función. También porque permite eventos tardíos adversos estructurales, electrofisiológicos y hemodinámicos. Estudios previos para examinar el mecanismo de dilatación ventricular, han sugerido por lo menos dos tipos de cambios celulares que pueden explicar los cambios en la arquitectura del miocardio; 1) hipertrofia de los miocitos por la adición de sarcómeros en series, como la principal causa de la elongación y alargamiento estructural. 2) El rearrreglo de los miocitos, que puede ocurrir en paquetes celulares que se deslizan y separan sin alterar las células individuales o alterar la dimensión celular individual. Por estudios histopatológicos en humanos y en modelos experimentales, se ha demostrado que son los que mas contribuyen en la expansión del infarto. Otros fenómenos como, estrechamiento celular y adelgazamiento del espacio intercelular, únicamente ocurren dentro de la región del infarto y contribuye escasamente en el adelgazamiento de la pared ventricular (31,65,66).

A diferencia de la expansión del infarto, la extensión del infarto representa la necrosis miocárdica de novo seguida al infarto agudo al miocardio (Figura No 5.). Mientras que la expansión causa un

incremento en tamaño funcional de un infarto por el incremento en la longitud del segmento, sin incrementar la masa en general del infarto, la extensión resulta en un verdadero incremento de la masa total de tejido infartado. Como la expansión del infarto, la extensión esta asociada con incrementos inmediatos y a largo plazo en la morbilidad y la mortalidad (31,65,66).

La cantidad inicial de necrosis y la posterior extensión dependen de factores tanto anatómicos como fisiológicos, un ejemplo es el aporte de oxígeno durante el infarto, gasto cardiaco, flujo colateral, ubicación anatómica, arteria ocluida, respuesta celular al daño, reflujo, etc... El fenómeno de la extensión ocurre dentro de las primeras 24h de instalado el infarto pero aún así se ha reportado que su período de duración alcanza hasta 17 días (31). En estudios histopatológicos realizados por Hutchins y col., han definido que la importancia en la diferencia de estos dos fenómenos radica en la implicación clínica y la frecuencia con la que se presentan. La extensión del infarto es un evento poco frecuente, y la cantidad y ubicación del tejido involucrado son generalmente insuficientes para comprometer la función cardiaca. En contraste estos autores hayaron, que la complicación más común fué la expansión del infarto y puede causar serios problemas al producir disfunción cardíaca a través de la dilatación ventricular (65,66).

No se trata de minimizar la importancia de la extensión del infarto que clásicamente se entiende como una determinante de corto y larga plazo de la sobrevivencia del paciente infartado. Sino más bien, farmacológicamente en la clínica poco se puede hacer por disminuir la extensión, puesto que la expansión del infarto es efectivamente

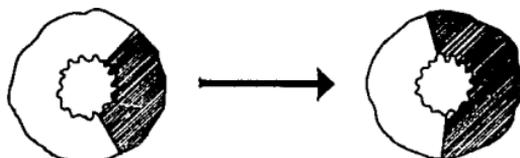
manejada por métodos quirúrgicos. Es evidente que de estas conclusiones se deja ver la creciente necesidad de desarrollar nuevos fármacos o terapias encaminadas a disminuir el área del tejido necrosado que se genera durante el infarto agudo al miocardio (64).

EXPANSIÓN



Deformación regional
Desproporción

EXTENSIÓN



Tejido infartado
de novo

EXPANSIÓN Y EXTENSIÓN DEL INFARTO

FIGURA No. 5

1.4) TRASCENDENCIA.

Los enfermos de infarto al miocardio pueden seguir uno de diversos caminos. Uno de ellos puede ser sin complicaciones, la sintomatología reduce poco a poco y se logra una curación progresiva; o bien puede ser dominada por uno o los dos tipos de secuelas: trastornos eléctricos o fracasos mecánicos. Los trastornos de frecuencia, ritmo o conducción cardiaca son tan frecuentes que prácticamente forman parte de todo el proceso. Las arritmias se han observado hasta en el 90% de pacientes vigilados (56). Al inicio son comunes y entre un 30 a 50% responsables de las muertes tempranas, o sea dentro de las primeras horas de instalado el infarto. De donde podemos decir que las más frecuentes son extrasístoles ventriculares y auriculares, taquicardia y bradicardia sinusales. De éstas las mortales son el bloqueo cardiaco completo, la fibrilación ventricular y la taquicardia ventricular (9,13,40,44,48).

Con arritmias o sin ellas, el cuadro clínico puede estar dominado por el comienzo de la insuficiencia de la función mecánica, manifestado como insuficiencia cardiaca congestiva. Cierta grado de insuficiencia ventricular izquierda acompaña invariablemente a casi todo infarto agudo al miocardio, inclusive cuando no hay manifestaciones clínicas. Estudios cuidadosos, demuestran congestión vascular pulmonar y trasudación hacia el espacio intersticial. En más del 60% de los pacientes se manifiesta insuficiencia cardiaca congestiva, pero puede ser pasajera.

La insuficiencia aguda del ventrículo izquierdo significa no sólo congestión pulmonar, sino también disminución del gasto cardiaco. Cuando ésta infartado más del 40% del ventrículo izquierdo se produce una intensa disminución del gasto cardiaco, lo que

constituye el choque cardiogéno (ver figura No 6.). Esto ocurre aproximadamente en 12% de los pacientes infartados. El comienzo del choque cardiogénico tiene singular importancia, ya que 80% de los individuos que lo sufren no sobreviven. Cuando coinciden edema pulmonar y choque cardiogénico el panorama es prácticamente desalentador (41,44,48).

Las complicaciones tardías del infarto al miocardio son, la ruptura de la porción infartada del corazón, que tiene lugar la semana siguiente al infarto; la ruptura de un músculo papilar, causa de una grave insuficiencia mitral, con soplo intenso; el desarrollo de un aneurisma ventricular en el punto de cicatrización, diversos fenómenos tromboembólicos que pueden originarse por trombos murales dentro del corazón.

El pronóstico global del paciente con infarto, es de una mortalidad del 10% durante el primer mes de hospitalización, si éste llega al hospital a tiempo. El peligro de muerte en un principio es el máximo pero con cada día que pasa disminuye rápidamente. Durante los seis meses seguidos la mortalidad aproximada es de 9%, luego disminuye en una cifra anual de 3 a 4% para los cuatro o cinco años siguientes.

Tiene importancia crítica para la evolución del paciente infartado, el grado de disfunción del ventrículo izquierdo. Esta disfunción depende del tipo de infarto presente, como consecuencia la arteria coronaria ocluida; además de la extensión del mismo. La severidad del infarto transmural es el más frecuente y mortal, depende del lecho coronario ocluido (ver tabla No 2.), en donde la oclusión total de la arteria coronaria izquierda descendente anterior, produce infartos de 40 a 50% de la pared anterior del ventrículo izquierdo y dos tercios del tabique interventricular apreciándose

infartos menores en las arterias coronarias derecha y circunfleja izquierda (42).

Con las intervenciones farmacológicas agudas y a largo plazo, es prometedor el pronóstico de estos pacientes en su mejoramiento. En la sección siguiente, revisaremos algunos de ellos.

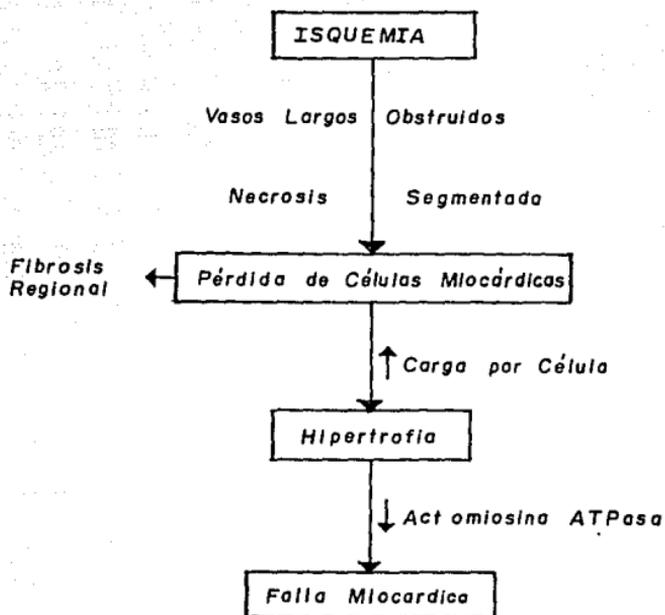


FIGURA No.6 FALLA MIOCARDICA POST-INFARTO

TABLA No. 2
Infarto Según Arteria Coronaria Ocluida

ARTERIA OCLUIDA	% DE INFARTO	EXTENSION
DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA	40 A 50%	Pared anterior del ventriculo izquierdo 2/3 anteriores de septo interventricular
ARTERIA CORONARIA DERECHA	30 A 40%	Pared posterior del ventriculo izquierdo 1/3 de tabique interventricular
ARTERIA CIRCUNFLEJA	15 A 20%	Pared lateral del ventriculo izquierdo

20

Tomado de Am. Heart j.:18:747, 1985.

1.5) FARMACOLOGIA EN EL INFARTO AL MIOCARDIO.

Una gran variedad de agentes farmacológicos han sido estudiados en un intento de reducir el tamaño del infarto, incluyendo beta-bloqueadores, nitratos, hialuronidasa, calcio antagonistas y agentes trombolíticos entre otros. Estos fármacos experimentalmente han demostrado grandes propiedades en este padecimiento cardiovascular(10,13,16,45,51). La investigación en los últimos 50 años, se ha concentrado en la limitación de la isquemia siguiendo la hipótesis propuesta sobre los agentes que incrementan la isquemia y/o la angina pectoris también incrementan o aceleran el infarto al miocardio e inversamente los agentes que disminuyen la isquemia limitan el tamaño del infarto o retardan el proceso de infarto (65). Los datos disponibles sugieren que en animales de experimentación, el grado de reducción del infarto es el que se altera; la reducción absoluta del tamaño del infarto requiere de la restauración del flujo sanguíneo (14,52,65,69)). Probablemente, la situación en el hombre es algo diferente porque en el los infartos están rodeados por áreas de miocardio con una perfusión y oclusión coronaria heterogénea. Lo que hace que se produzca el fenómeno conocido como frente de onda, que indica en términos sencillos que la necrosis tisular del miocardio no es un proceso sincronizado, sino que las células mueren a diferentes tiempos y hace al miocardio susceptible de ser intervenido farmacológicamente, en un intento por rescatar el tejido viable a pesar de la inminente necrosis del área (52,65). Esto es más que suficiente para lograr la limitación de las dimensiones del infarto por agentes bloqueadores beta-adrenérgicos, calcio antagonistas y otros fármacos (65,52). Es importante mencionar que los mejores avances, tales como la estreptocinasa,

factor activador del plasminógeno y revascularización quirúrgica han hecho de la restauración de la perfusión una realidad (12,14,52).

Estos avances justifican la búsqueda de nuevas técnicas para retrasar el proceso del infarto, primero en animales y posteriormente en el humano (16,65).

Cuando se utilizan modelos animales los resultados indican que las intervenciones pueden reducir la demanda de oxígeno o bien aumentar el aporte del mismo, incrementar el transporte de sustratos para la producción de energía dentro del tejido isquémico y protegerlo de procesos autolíticos o heterolíticos. Con esto se puede salvar el tejido isquémico. Actualmente algunos de estos tratamientos se usan en la clínica (ver tabla No 3.) (13).

1.5.1 CALCIO ANTAGONISTAS

Estos agentes son aceptados por atenuar la isquemia del miocardio cuando ésta se presenta como angina pectoris. Dos de los tres bloqueadores de los canales de calcio, más empleados, son la nifedipina y el verapamil, los que han demostrado reducir el tamaño del infarto en animales experimentación (16,21,53,55,59).

En estudios más recientes, se ha observado que la nifedipina y el verapamil son capaces de alcanzar una limitación sostenida del tamaño del infarto (con tinción de azul de tetrazolio y por el análisis autoradiográfico de la zona de riesgo con microesferas), en modelo experimental en perro con 24h de oclusión coronaria a tórax cerrado (33,38,39,40). Sin embargo, veinticuatro horas es aún tiempo insuficiente para que se desarrolle flujo coronario significativo. En estudios con corazones aislados, la nifedipina ha mostrado efectos cardioprotectores contra las consecuencias negativas del

metabolismo isquémico (21). Pero en otros estudios, los efectos benéficos no se pudieron duplicar cuando se administró después de dos horas de reperfusión. Falló en inducir una reducción significativa en el tamaño final del infarto. A pesar de esto, algunos reportes continúan sugiriendo que la nifedipina es eficiente en el tratamiento de infarto agudo al miocardio en animales y en humanos (51). Sin embargo, su uso en estos últimos años, no han dado resultados convincentes, incluso en algunos pacientes se ha reportado hasta infarto agudizado por estos agentes (51).

En un estudio, de doble ciego, control placebo, para el tratamiento de pacientes con amenaza de infarto. La nifedipina no pudo prevenir la progresión de la amenaza de infarto al estadio agudo, menos limitar la extensión del infarto en aquellos que lo desarrollaron. En cambio hubo un incremento estadísticamente significativo en la tasa de mortalidad en un grupo de pacientes que recibieron al azar el tratamiento con nifedipina (21).

De igual forma en un estudio multicéntrico en Noruega, con 277 pacientes, el tratamiento temprano con nifedipina a aquellos pacientes con IAM falló al no reducir las dimensiones del infarto(21).

Es cierto, que con el advenimiento de los calcio antagonistas se tiene una eficiente herramienta en la farmacología de la terapia cardiovascular. Los tres grupos más importantes de bloqueadores de calcio difieren en su mecanismo específico de acción. Estos grupos incluyen las difenilalquilaminas, de estas verapamil ha sido aprobado para su uso en los Estado Unidos; benzotiazepinas, como por ejemplo el comercialmente disponible diltiazem; y las dihidropiridinas, donde nifedipina es la única droga aceptada por la

administración de drogas y alimentos de los Estados Unidos (FDA). En sí una gran cantidad de calcio antagonistas se encuentran en diferentes etapas de experimentación. Fármacos como la nitrendipina, nisoldipina, niludipina, nimodipina, felodipina y rysodina; en el caso particular de nicardipina se encuentra en la última etapa de su experimentación y es posible encontrarla en el mercado (21,51). El verapamil y los agentes relacionados son especialmente efectivos en los canales que tienen altas frecuencias de apertura y cerrado, patrón que se aprecia en el sinus y nodos atrioventriculares, de ahí la utilidad de este agente contra las arritmias supraventriculares. El fármaco diltiazem tiene acciones propias de los de las difenilalquilaminas y es equipotencial para bloquear los canales de calcio de músculo liso y cardíaco (19). Las dihidropiridinas por su potencia vasodilatadora, por ejemplo, inhibe efectivamente los canales de calcio de músculo liso de vasos y arterias (60) (ver Tabla No 4.).

Estos agentes, las dihidropiridinas son los vasodilatadores más potentes y su uso en la clínica es muy importante, entre ellos nifedipina. Los calcio antagonistas pueden incrementar el flujo colateral coronario, disminuyen la resistencia periférica arterial, reducen la contractilidad miocárdica y el consumo de oxígeno, además ejercen influencia en los compartimientos de calcio durante la isquemia y la reperfusión (21,46). Estos factores pueden preservar los almacenes de energía en los miocitos. Además, alteran los compartimientos de calcio durante la isquemia o la reperfusión (46). Disminuyen la disponibilidad del calcio intracelular, reduciendo las corrientes de calcio iónico a la célula cardíaca y al músculo liso vascular (39). Algunos calcio antagonistas actúan más estimulando

el almacenamiento de este en sitios inactivos o por aumentar la excreción celular de calcio iónico. En general, el mecanismo de estos agentes involucra la interferencia de los sitios intracelulares de almacenamiento de éste, como sucede en el músculo cardíaco, o bien, el bloqueo de la entrada de calcio del espacio extracelular hacia el interior de la célula, en el caso del músculo liso vascular (19,38,58,70). La interferencia, bloqueo o ambos son generados por la interacción de los calcio antagonistas con los sitios celulares específicos de unión, que están ubicados en los canales de calcio (73).

El transporte de calcio en el miocardio y músculo liso vascular involucra tres sitios posibles (Fig No. 7). Una vía, que es el canal dependiente de voltaje, que es controlado por una "puerta" que se abre y cierra de acuerdo a un gradiente de voltaje. Este canal está presente en todas los tipos células musculares (lisas, cardíacas y esqueléticas), en células nerviosas (centrales y periféricas) y muchas células secretoras (37).

Las corrientes de calcio al interior de la célula, dependientes del canal operado por voltaje, se agrupan en cuatro tipos de acuerdo a sus propiedades electrofisiológicas y sensibilidad a fármacos y toxinas (ver tabla No 5.) (70).

La corriente tipo "L", llamada así por su larga duración de apertura, desempeña una importante función en el acoplamiento de la excitación y contracción en todas las células musculares y son sensibles a los calcio antagonistas. La función de las corrientes tipo-L, han sido plenamente caracterizadas en músculo cardíaco. En donde esta corriente permite el paso de calcio extracelular al citosol. Este es el "gatillo de calcio" que causa la liberación de

este ión almacenado en los depósitos intracelulares. De esta manera, la contracción cardiaca depende del "gatillo" antes mencionado y por supuesto de la corriente tipo-L. Esta corriente es específicamente bloqueada por los calcio antagonistas. Estos fármacos, cierran la puerta y así inhiben la entrada de calcio extracelular por este canal, lo que reduce la disponibilidad de calcio para los procesos contráctiles (16,21,37,55).

El canal receptor-operado, normalmente es activado por los alfa-agonistas como norepinefrina, angiotensina y otras sustancias endógenas. Cuando este canal se abre, por la interacción con el agonista alfa, el calcio extracelular entra, a pesar de que una proporción del calcio puede venir de los sitios de almacenamiento cuando el canal receptor-operado se ha activado. Los calcio antagonistas, actúan predominantemente en los canales voltaje dependiente, no obstante, por lo menos alguno de estos agentes puede interactuar con los canales receptor dependientes, por que pueden bloquear competitivamente los receptores alfa y por lo tanto los efectos de norepinefrina (37).

El tercer camino de transporte de calcio depende del intercambio sodio-calcio (21). Este mecanismo, involucra un acarreador que puede unir tanto una molécula de calcio iónico como dos o tres moléculas de sodio iónico, además es capaz de mover ambos cationes a través de la membrana plasmática (ver figura No 7). Este canal es muy importante en términos de glucósidos cardiacos, pero probablemente no sea muy relevante en cuanto a calcio-bloqueadores se refiere.

El intercambio sodio-calcio, que representa el mecanismo más importante de excreción de calcio del miocito, la membrana plasmática cardiaca contiene una bomba de calcio trifosfato de

adenosina (ATP)-dependiente, que une directamente la liberación de energía química del ATP al transporte activo de calcio. De esta manera, la efectividad de los bloqueadores de calcio radica en su habilidad de obstruir la entrada de calcio iónico a las células musculares cardíacas y lisas, que en combinación con los sistemas celulares de excreción de calcio, permite tener niveles bajos de este mensajero crucial (37). La obstrucción de calcio, impide que alcance los sitios en donde las células pueden iniciar o regular procesos clave (63).

Estudios realizados en los últimos años, han aumentado nuestro entendimiento de la farmacología de los bloqueadores del canal lento de calcio. De sus efectos el más importante es el inotrópico negativo, a dosis moderadas no implica ningún problema, y es posible su combinación con otros fármacos como los beta-bloqueadores (12,60).

TABLA No. 3
FARMACOLOGIA DEL INFARTO

CALCIO ANTAGONISTAS	TROMBOLITICOS	NITRATOS	BETA-BLOQUEADORES	ANTIINFLAMATORIOS	ATRAPADORES DE RAD. LIBRES
NIFEDIPINA *	ESTREPTOCINASA ~	NITROGLICERINA ~	PROPRANOLOL	AC. ACETIL SALICILICO	ALOPURINOL ~
VERAPAMIL *	UROKINASA *	NITROPRUSIDA *	ATENOLOL	INDOMETACINA	CATALASA ~
DILTIAZEM ~	PLASMINOGENO ACTIVADOR~		METOPROLOL	IBUPROFEN	MANITOL ~
NITRENDIPINA			PRACTOLOL	PIROXICAM	SUPEROXIDO DISMUTASA
NISOLDIPINA					

* FARMACOS UTILIZADOS EN CLINICA

TABLA 4
GRUPOS DE BLOQUEADORES DE CALCIO
MAS IMPORTANTES

GRUPO	EJEMPLO	MECANISMO
DIHIDROPIRIDINAS	NIFEDIPINA	VASODILADORES POTENTES, BLOQUEAN CANALES DE MUSCULO LISO DE VASOS Y ARTERIAS
BENZOTIAZEPINAS	DILTIAZEM	EQUIPOTENCIAL EN EL BLOQUEO DE CANALES DE MUSCULO LISO Y CARDIACO
DIFENILALQUILAMINAS	VERAPAMIL	BLOQUEAN CANALES DE ALTA FRECUENCIA DE APERTURA Y CERRADO, COMO NODO Y SINUS ATRIOVENTRICULARES

TABLA No. 5
TIPOS DE CORRIENTES DE CALCIO.

TIPO DE CORRIENTE	LOCALIZACION	CARACTERISTICAS
TIPO-L	TODAS LAS CELULAS, INCLUYENDO NERVIOSAS Y SECRETORAS	ALTO UMBRAL DE EXCITACION INACTIVACION LENTA
TIPO-T	EN EL NODO SINOATRIAL Y CEL. DE PURKINJE	BAJO UMBRAL DE EXCITACION BAJA CONDUCTANCIA
TIPO-N	UNICAMENTE EN CEL. NERVIOSAS	ALTO UMBRAL DE EXCITACION INACTIVACION RAPIDA
TIPO-P	CEL. DE PURKINJE CEREBELOSAS	AUN EN ESTUDIO

69

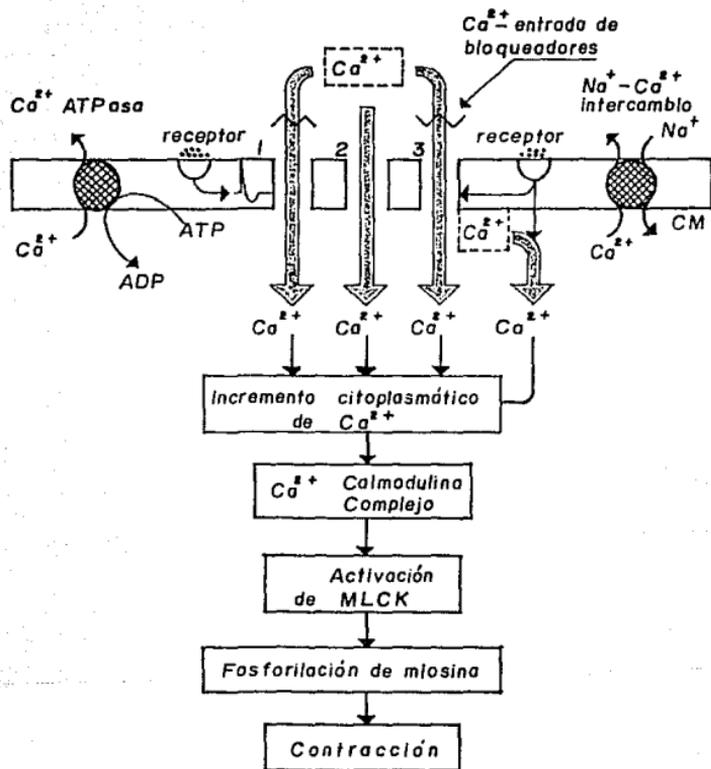


FIGURA No.7 SISTEMA DE TRANSPORTE DE CALCIO

AM. J. CARDIOL, 55; 1985, 198

1.6 ANALISIS MORFOLOGICO DEL INFARTO.

Sí se acepta que el total es mayor que la suma de sus partes, cada ser humano es en esencia un cúmulo de células fascinante y hábilmente complicado. La salud del individuo depende de que haya células sanas. Por otra parte, la enfermedad indica disfunción de un número importante de las mismas. En consecuencia, es necesario iniciar el estudio de la patología con el de la enfermedad a nivel celular y subcelular (2,3,4,5,6,7).

La célula normal, es un microcosmos dinámico que modifica constantemente su estructura y función en respuesta a demandas cambiantes. Hasta que estas se hacen demasiado intensas, la célula tiende a conservar un rango relativamente estrecho de estructura y función, designado como "normal". Así como el individuo ha de adaptarse a las demandas de la vida en cambios constantes, así lo hace la célula (4,5).

Dentro de ciertos límites, la adaptación celular sufre una alteración estable, lo que preserva la salud a pesar del cambio continuo. No obstante, sí se exceden los límites de la capacidad adaptativa, se origina lesión o aún muerte celular. En respuesta al estrés creciente la célula puede 1) adaptarse, 2) lesionarse de modo reversible o 3) morir. La célula normal, la célula adaptada, la lesionada y la que presenta lesión irreversible o la que está muerta, son estadios vagamente delimitados por un continuo de función y estructura. A pesar de los complicados métodos de investigación morfológica y bioquímica, aún es difícil definir los límites entre esos cambios, y los puntos de referencia mediante los cuales pueda distinguirse a la célula que está bajo tensión intensa, y es normal, de la que ha sido lesionada; son de todo muy variables

y dependen de la naturaleza del tejido. Lo mismo sucede para diferenciar a la célula lesionada, pero aún viable, de aquella con una lesión mortal (2,8,6,7).

1.7 ANTECEDENTES

En el año de 1989, se reportó la evolución temporal del tamaño del infarto y los efectos que una serie de fármacos producen sobre éste fenómeno. Se comparó la evolución natural del infarto de las 4 horas hasta las 96 horas, contra la evolución del infarto con el previo tratamiento de propranolol, nifedipina, dexametasona y ropitoina, en el modelo de oclusión coronaria en rata. Determinándose el tamaño del infarto por técnicas de tinción vital. En este trabajo se confirmó las notorias cualidades del propranolol para disminuir el tamaño del infarto, así como las peculiares propiedades de la nifedipina para alterar dicha variable y el resultado de un nuevo compuesto en etapa de experimentación, conocida en ese entonces como TR-2985, hoy en día, ropitoina. Este agente mostró propiedades muy superiores al propranolol (fármaco que se empleó como primera elección en el tratamiento del infarto hace unos 10 años), lo que, en vez de aclarar muchas dudas generó más. Esto creó la necesidad de desarrollar más estudios para entender el mecanismo de acción de este compuesto. En efecto, una vez comprobada la acción de una droga es necesario establecer el mecanismo de acción, para ello es imprescindible iniciar los estudios necesarios a nivel celular y subcelular. Esto trae consigo la tarea titánica de estudiar a nivel celular no sólo los efectos de ésta droga, sino también, los del propranolol y la nifedipina, de las cuales tampoco existen estudios sobre el infarto y estos agentes a nivel celular y subcelular (26). En el Sección de Farmacología de la Facultad de Estudios Superiores de Cuautitlán UNAM, se estableció la línea de investigación sobre la farmacología del infarto agudo al miocardio, con la finalidad de

establecer a largo plazo la terapia cardioprotectora más eficaz contra los efectos nocivos de la isquemia aguda en el miocardio.

De tal manera que el presente trabajo sólo representa el inicio de lo que será una gran serie de estudios. En los cuales, con la misma premisa y criterios se buscará completar la investigación hasta las 96 horas post-infarto. Con esto se espera, que el lector comparta la perspectiva que ofrecen los resultados de la presente tesis.

1.8 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Como el rescate del tejido isquémico requiere que el flujo residual se incremente, y ésto se puede lograr por procedimientos quirúrgicos, angioplastia, fibrinólisis o bien, por fármacos que alteren la presión de perfusión o diámetro de vasos coronarios, y en el último de los casos esperar a la formación de nuevo flujo colateral. Este proceso, es el contribuyente más importante para el rescate del tejido isquémico, pero desgraciadamente el tiempo necesario para que esto suceda requiere de dos o más días (14,65).

Se necesita que la estrategia farmacológica busque retardar el ritmo de desarrollo del daño celular para permitir al momento que ocurra la revascularización natural, se encuentre el tejido cardiaco isquémico en condiciones reversibles (14).

A nivel experimental, la nifedipina (dihidropiridina), ha mostrado propiedades capaces de disminuir el tamaño del infarto, a pesar, que en la clínica no ha dado buenos resultados (21). Sin embargo, el efecto de la nifedipina sobre el tamaño del infarto, se considera que es debido de manera importante a su modo de acción más que a su mecanismo (19). Estudios recientes, confirman cada vez más que el bloqueo de los canales de calcio para disminuir el tamaño del infarto, no sólo se efectúa en músculo liso vascular (sobre el que más actúa), sino también, en músculo estriado cardiaco (en menor grado), en donde ofrece grandes perspectivas. Esto plantea la necesidad de estudiar en músculo cardiaco el mecanismo de acción de este agente. Debido a que cada día se desarrollan fármacos nuevos, con la finalidad de retardar el proceso del infarto, y en su gran mayoría derivados de alguna variedad de bloqueador de calcio(19,21,65).

Toda investigación, que pretenda aportar evidencias útiles para dilucidar el mecanismo de acción de algún fármaco, debe iniciarse por el estudio celular y subcelular, de los fenómenos producidos por la administración de éste (6,7).

2. OBJETIVOS

1. USAR A LA RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL PARA PROVOCAR EL INFARTO MIOCARDICO MEDIANTE LA OCLUSION DE LA ARTERIA DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA.

2. ANALIZAR EL DAÑO TISULAR Y CELULAR PROVOCADO POR LA OCLUSION CORONARIA MEDIANTE UN ESTUDIO CUALITATIVO A NIVEL DE MICROSCOPIA OPTICA Y SEMICUANTITATIVO A NIVEL DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET).

3. ANALIZAR LOS EFECTOS QUE PROVOCA LA NIFEDIPINA SOBRE LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES POSTERIORES A LA OCLUSION CORONARIA, MEDIANTE LAS TECNICAS DE M.O. Y M.E.T.

3. MATERIALES Y METODOS.

3.1 MATERIAL

3.1.1. Reactivos y Soluciones.

- Eter etílico.
- solución salina fisiológica (SSF).
- Agua destilada.
- Buffer de fosfatos 0.2M a pH de 7.2.
- Propilenglicol.
- Nifedipina (Bayer).
- Glutaraldehído al 2%.
- Tetróxido de osmio al 1%.
- Alcohol etílico al 40, 50, 60, 70, 80 y 90%.
- Alcohol etílico absoluto.
- Oxido de propileno.
- Resina Epon 812 constituida de:
 - a) Resina base 812.
 - b) Anhídrido dodecenil succínico (DDSA).
 - c) Anhídrido de metil nadic (NMA).
 - d) Tridimetil amino metil fenol (DMP 30).
- solución acuosa saturada de Uranilo de Watson.
- solución de nitrato de Plomo de Reynolds.
- Acetona.
- Formol 10%
- Parafina
- Benceno

3.1.2. Aparatos y Equipo.

- Equipo de venoclisis con punzocat No. 2.
- Baño María.
- Mezclador espiral de Teflón de Talboys.
- Cámara de vacío.
- Parrilla eléctrica Termolyne.
- Horno de Polimerización Reichert-Jung KT100.
- Microscopio estereoscópico Karl Zeiss.
- Piramitón Reichert-Jung TM60.
- Ultramicrotomo Reichert-Jung Ultracut E.
- Ultramicrotomo Ultrame III 8800 LKB Bromma.
- Sonicador Ultrasonic cleaner Cole-Parmer.
- Ultracentrífuga Beckman Microfuge E.
- Microscopio Optico Zeiss.
- Microscopio de Contraste de fase Karl Zeiss.
- Microscopio Electrónico de Transmisión (MET) Jeol JEM 100S.
- Amplificador Fotográfico Beseler Dichro 45.
- Secador eléctrico de fotografías Flipper f 18b.
- Plancha eléctrica de fotografías Dry Mounting Lamiting Press Seal Jumbo 168M.
- Histokinette American Optical Tipo-7326
- Microtomo American Optical Tipo-820
- Material de vidriería.

- Estuche de disección para especies pequeñas.
- Sutura de Seda 0000 Beckton-Dickinson.
- Aguja atraumático No 2.
- Hilo Nylon.
- Lámpara eléctrica.
- Navajas de Doble filo
- Moldes para polimerización de resina.
- Cuchillas de vidrio.
- Rejillas de cobre.
- Pinzas de relojero No. 5.
- Filtro Milipore Swinnex-25.
- Película Kodak Plus-X Pan 35mm.
- Papel Fotográfico Kodabrome II RC Kodak.

3.1.3. Material Biológico.

- 12 Ratas Wistar Macho de 8 a 10 semanas de edad con un peso de 250 a 300 g.

3.2. METODOS

3.2.1. Distribución de Lotes.

Las ratas se distribuyeron en tres grupos: 1) 4 ratas sin cirugía para establecer las características del tejido cardíaco sano y eliminar todo posible artefacto generado por la manipulación; 2) 4 ratas que se les administró 30 min. antes de la cirugía, únicamente vehículo de fármaco (propilenglicol:SSF 1:2), para tener control infartado y de referencia; 3) 4 ratas que 30 min antes de la cirugía se les administró nifedipina (5mcg/kg de peso), como grupo tratado.

3.2.2. Ligadura Experimental en Rata.

En 12 ratas Wistar de los lotes 2 y 3, previa anestesia por inhalación de éter etílico, se realizó una incisión en el costado izquierdo entre el 4° y 5° espacio intercostal. Se expuso la masa cardíaca y a 2mm del origen de la arteria coronaria ADI se practicó la ligadura permanente, con sutura de seda 0000 (Beckton-Dickinson). Inmediatamente después de regresar la víscera a su sitio, se suturó con hilo nylon y aguja atraumática, los músculos intercostales para reestablecer lo antes posible la presión negativa de la cámara torácica y posteriormente se suturó piel. Dejándose por un período de 4h post-oclusión (fig No 8.).

3.2.3. Procedimiento de Perfusión y Fijación para MET.

En todas las ratas, cumplidas las 4 h post-oclusión, previa anestesia, se realizó toracotomía total para la exposición completa del corazón. Se introdujo un catéter del No 12. en el ventrículo izquierdo vía la aorta y se abrió un ojal en el atrio derecho para establecer un sistema de drenaje aprovechando el latido propio del

músculo cardiaco. Al mismo tiempo que se hizo pasar solución PBS pH 7.2. En cuanto se perfundió el corazón, se puso en circulación una solución fijadora de glutaraldehído al 2%.

Los corazones fueron disecados, extraídos, y mediante cortes transversales hechos aproximadamente cada 5mm, se obtuvieron 7 rebanadas, las que se identificaron como Z-1, Z-2 hasta Z-7; asignandose en todos los casos al ápice como Z-1. Tal como se observa en la figura No 9.

La zona 4 y 5 se destinaron para microscopia óptica y se les dió un tratamiento diferente. El ápice o bien Z-1, fué seccionado nuevamente en cubos de aproximadamente 2 milímetros cúbicos, usando hojas de afeitar de doble filo (nuevas) con la técnica de navajas encontradas. Posteriormente, los cubos obtenidos se fijaron en glutaraldehído al 2% durante 2h. Al cabo de ese tiempo se lavaron con PBS pH 7.4 por tres ocasiones y se hizo una fijación profunda con tetróxido de osmio al 1% durante 1h.

3.2.4. Deshidratación e Inclusión en Resina para MET.

Al terminar la fijación profunda, los cubos de tejido se deshidrataron en series de alcohol de concentración crecientes de 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% hasta alcohol absoluto. En cada concentración de alcohol se dejaron durante 10 minutos, excepto en alcohol del 70% que fué de 12 a 24 hrs. Finalmente, las muestras se dejaron en óxido de propileno como intermedio para la inclusión en resina.

La inclusión en resina, se efectuó mediante pases del tejido por mezclas graduales de óxido de propileno-resina (Epon-180), hasta

resina pura. Al terminar se colocó un cubo de tejido por cada molde y se dejó polimerizar.

3.2.5 Corte y tinción de muestras para MET

Se obtuvieron cortes semifinos de 1 a 2 micrómetros de las muestras encapsuladas en resina, con un ultra microtomo LKB. Estos cortes se tiñeron con azul de toluidina y se observaron al microscopio de luz. Se observó la disposición del tejido y se orientó el bloque para obtener cortes longitudinales.

Una vez orientado el tejido, se obtuvieron cortes ultrafinos de 80-70nm los cuales se colocaron en rejillas de cobre.

Tinción de Cortes Ultra Finos.

Para teñir los cortes ultrafinos se utilizó la técnica de tinción electroconductiva doble.

Se filtró una gota de la solución de acetato de uranilo de Watson colocándola sobre papel parafilm dentro de una caja de Petri. Las rejillas se colocaron en la gota de acetato de uranilo por un tiempo de 15 min. Posterior a esto se realizaron tres lavados con agua destilada de 5 min. cada uno y en diferentes recipientes. Se eliminó el exceso de agua con papel filtro cuidando siempre el lado de la muestra.

Por otra parte, se colocaron hojuelas de NaOH y algunas gotas de agua destilada en una caja de Petri. Se tapó la caja para así eliminar el dióxido de carbono y contaminantes de carbonato de plomo.

Se filtró una gota de citrato de plomo de Reynolds colocándola sobre papel parafilm dentro de la caja de petri previamente indicada. Se pusieron las rejillas sobre la gota de citrato de plomo durante 15 min. Se enjuagaron las rejillas con tres diferentes lavados en agua

destilada (hervida) por 5 minutos cada uno. Las rejillas se secaron, ubicándolas sobre papel filtro por 24 horas para luego ser observadas al microscopio electrónico de transmisión Jeol Jem 100S.

3.2.6 Fijación, Deshidratación e Inclusión en Parafina para MO

En el caso de las zonas 2 y 5 se fijaron con formol al 10% y se deshidrataron de igual forma que se realizó para microscopia electrónica, se realizaron dos pases en benceno (para ocupar el lugar de el etanol en el tejido).

Estas muestras (Z-2 y Z-5), se colocaron en 2 recipientes con parafina fundida a 56 grados centígrados por 2 horas en cada uno se incluyeron en bloques de parafina.

3.2.7 Cortes Finos y Tinción Tricrómica de Masson para Microscopia Optica.

Para microscopia óptica se obtuvieron cortes de 4 micrómetros de espesor de la Z-2 y Z-5. Los que fueron extendidos sobre un baño de flotación de tejidos, constituido de grenetina fundida en agua destilada de 40 a 50 grados centígrados. Y posteriormente se adhirió a porta objetos. Calentando la muestra sobre la laminilla a una temperatura de 40 a 50 grados centígrados, durante 15 minutos como mínimo (con el objeto de fundir la parafina incluida en el corte y garantizar una buena adhesión al portaobjetos) y se dejó enfriar.

Tinción Tricrómica de Masson.

Las muestras fueron sumergidas en dos ocasiones en xilol por 5 minutos cada uno. Para después pasar por un tren de alcohol absoluto, 96% y al 70% durante 5 minutos en cada caso. Se lavaron con agua destilada por 2 minutos y se tiñeron con hematoxilina de

Weigert por 10 minutos y se enjuagaron con agua corriente y posteriormente con agua destilada. Luego se tiñeron con fucsina de Biebrich durante 5 minutos, posteriormente se sumergieron en ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico de 10 a 15 minutos. Se tiñió además con azul de anilina de 10 a 15 minutos y se pasaron por una solución de ácido acético al 1% de 3 a 5 minutos. Se hicieron dos pases en alcohol 96%, dos en alcohol absoluto y dos en xilol, en todos los casos, durante 5 minutos cada uno. Finalmente se colocó sobre los objetos con resina sintética y se observaron al microscopio óptico Karl Zeiss modelo 2098.

3.2.8. Estudios Cualitativos.

El daño del tejido miocárdico se definió por diferentes evidencias histológicas celulares y subcelulares para distinguir las fases más importantes para la valoración del daño isquémico (26,27).

El daño irreversible se definió por criterios biológicos. Seguido a la isquemia en el infarto, la muerte celular se reconoció por la evidencia de necrosis coagulativa y cariólisis. Por microscopia electrónica, las células dañadas irreversiblemente se reconocieron por la presencia de largos corpúsculos densos en la mitocondria y por grandes defectos en la membrana celular. Se ha establecido un método sencillo para graduar el daño isquémico, en microscopia óptica y electrónica, y se fundamenta en toda la información acumulada de los estudios histopatológicos desarrollados en más de veinte años de investigación. Resulta una clasificación sencilla pero básicamente apreciativa, además no se considera que el daño celular varía de una célula a otra en su tiempo de aparición. Pero aún así, resulta ser una forma cualitativa de resumir en términos

generales el estado histológico del área infartada (35). (Ver tabla. Kida Fujiwara)

3.2.9. Estudios Semi-Cuantitativos.

Los fundamentos de la morfometría son notables por sus simplicidad. Se tomaron muestras representativas de dos dimensiones, y con una cuadrícula transparente superimpuesta con puntos de prueba y segmentos lineares, se determinaron el área superficial y tanto el número como tamaño de componentes reconocibles con sólo contar.

El poder de estos estudios radica, en que los procesos que ocurren a nivel celular, sólo se pueden detectar por la diferencia en las alteraciones ultraestructurales, por el cambio absoluto que ocurre en el número de estructuras sanas o dañadas por unidad de área; hipercontracción o relajamiento, por el acortamiento o elongación de la longitud miofibrilar, edema mitocondrial cuando el diámetro promedio de la primera de estas supera estadísticamente el diámetro mitocondrial de muestras control. Aunque debemos tener presente que las alteraciones no son estrictamente intracelulares, también pueden ser intersticiales o de cantidad celular (5,6).

Figura No 8. Diagrama de Trabajo Experimental.

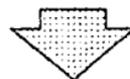
Ratas Wistar Macho de
300g. y 8-10 Semanas.



Administración



Anestesia



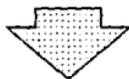
Perfusión



Recuperación



Oclusión Arteria
Coronaria D.A.I.



Fijación



Corte Longitudinal



Infiltración en
Resina o Parafina

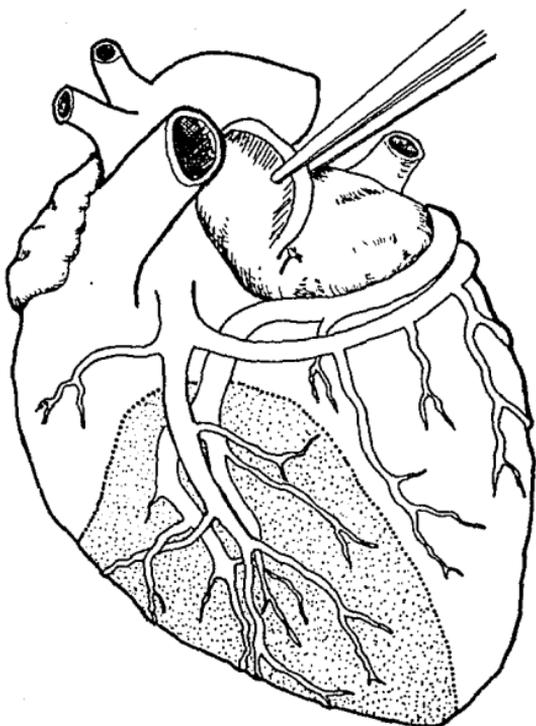
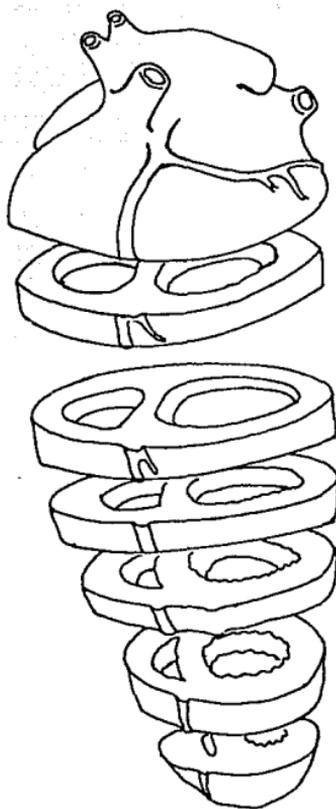


FIGURA N.º9 LIGADURA DE LA ARTERIA CORONARIA
DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA.



Z - 7

Z - 6

Z - 5

Z - 4

Z - 3

Z - 2

Z - 1

FIGURA No. 10
DISECCION DEL CORAZON
DE RATA, PARA EL ESTUDIO
MORFOLOGICO DEL INFARTO.

4. RESULTADOS

4.1 RESULTADOS CUALITATIVOS DE MICROSCOPIA OPTICA Y ELECTRONICA.

En la zona 5 se observó en el ventrículo izquierdo y septum ventricular de un 40 a 60% de tejido infartado (ver figura 12). Dentro del área infartada, la necrosis coagulativa, congestión de capilares y edema (caracterizado por el espacio interfibrilar que lo hace evidente) fueron el común denominador (ver figuras 14, 15, 16 y 19). En algunos casos se apreció infiltración de polimorfonucleares, predominantemente en las regiones cercanas a los vasos capilares.

En la porción del subendocardio, se apreció vacuolización intracelular siempre acompañada de careolisis, con evidente pérdida del arreglo miofibrilar (ver figura 15). De acuerdo con lo reportado en la literatura, el daño observado corresponde al grado 4, de la clasificación de Fujiwara (35).

En el caso de la zona 2 se observaron las mismas alteraciones que en la zona 5, excepto que la porción de tejido infartado fué menor, aproximadamente de un 30 a 50%. Conforme a la clasificación establecida se catalogó como daño grado 4. (Ver tabla No 6). En los grupos tratado, el infarto observado fué de un 20 a 50% abarcando ventrículo izquierdo y 25% del septum ventricular (ver figura 13); apreciándose necrosis coagulativa, congestión edema y vacuolización predominantemente en la región subendocárdica, correspondiendo al grado 4 de daño tisular según lo reportado por Fujiwara (35). (Ver tabla No. 6 y figuras 17 y 18).

En cuanto a lo observado en microscopia electrónica, en el control sano se pudo apreciar mitocondrias íntegras de estructura clara y definida, sarcómeras ordenadas con discos intercalares lineares, conservando el espacio intermiofibrilar reducido; Los núcleos de cara

abierta y cromatina dispersa con membranas intactas y en algunos casos se apreció el nucléolo; en todos los casos el sarcolema conservo la solución de continuidad. (Ver figura 20,23,26 y 28).

Los controles infartados, mostraron desde edema hasta lisis mitocondrial, mostrando en ambos casos ruptura de las membranas internas, únicamente variando en la intensidad del daño interno, de un estadio a otro, predominando la lisis mitocondrial. El espacio intermiofibrilar evidentemente aumentado con pérdida de la organización miofibrilar y en algunos casos hasta despolimerización de éstas, se observaron evidentes alteraciones en los discos intercalares, que fueron desde desorganización hasta ruptura. Los núcleos en su mayoría, mostraron cromatina compacta y marginada, generalmente distribuida en toda la periferia. En base a la clasificación de Fujiwara corresponde al grado 4 a 5 de daño tisular. (Ver tabla No. 7 y figuras 21,24,28 y 29).

En cuanto al grupo tratado, se pudo observar en general las mismas alteraciones excepto que fué sensible la disminución de la frecuencia de mitocondrias lisadas, lo que repercutió, en la disminución del espacio intermiofibrilar característico del miocito dañado. Con fundamento en lo reportado por Kida y Fujiwara le corresponde un grado de daño 4. (Ver figuras 22,25,30 y 31).

TABLA No. 6 DAÑO CELULAR MICROSCOPIA OPTICA

GRADO	CLASIFICACION
GRADO 0	CROMATINA DISPERSA, SUSTANCIAS PERINUCLEARES Y MIOFIBRILAR COMPACTAS.
GRADO 1	CONDENSACION Y MARGINACION MINIMA DE CROMATINA, DISMINUCION EN LA TINCION DE SUST. PERINUCLEAR Y MIOFIBRILAR
GRADO 2	CONDENSACION Y MARGINACION SUAVE DE CROMATINA, TINCION MARCADAMENTE DISMINUIDA DE SUST, PERI-NUCLEARES.
GRADO 3	CONDENSACION Y MARGINACION MODERADA DE CROMATINA, NO SE TIÑEN SUST. PERINUCLEARES Y MIOFIBRILARES, VACUOLIZACION OCASIONAL.
GRADO 4	CONDENSACION Y MARGINACION MARCADA DE CROMATINA, GRANULACION OCASIONAL Y VACUOLIZACION INCREMENTADA
GRADO 5	CROMATINA NUCLEAR CONDENSADA Y MARGINADA, CON MEMBRANAS NUCLEARES OSCURAS, CITOPLASMA GRANULADO Y VACUOLIZADO, PERDIDA DE LA ARQUITECTURA CELULAR.

TABLA No. 7

DAÑO CELULAR

MICROSCOPIA ELECTRONICA

GRADO	CARACTERISTICAS
GRADO 0	GLUCOGENO ABUNDANTE, MITOCONDRIAS Y NUCLEOS INTACTOS.
GRADO 1	CONDENSACION Y MARGINACION MINIMA DE CROMATINA, DISMINUCION DE LA CANT. DE GLUCOGENO, CAMBIOS MINIMOS MITOCONDRIALES
GRADO 2	CONDENSACION Y MARGINACION DE LA CROMATINA, REDUCCION MARCADA DE GLUCOGENO, EDEMA MITCONDRIAL DISCRETO Y MATRIZ RELATIVAMENTE CLARA.
GRADO 3	CONDENSACION Y MARGINACION MODERADA DE CROMATINA ESCAZO GLUCOGENO, EDEMEA MIOFIBRILAR LEVE Y MITOCONDRIAS CON EDEMA MODERADO, MATRIZ CLARA CON CUERPOS DENSOS AMORFOS.
GRADO 4	CONDENSACION Y MARGINACION MARCADA DE CROMATIA, CON DAÑO MIOFIBRILAR Y ALTERACIONES EN LAS BANDAS I, EDEMA MIOFIBRILAR INCREMENTADO, GRANULOS INTRAMITOCONDRIALES DENSOS INCREMENTADO, SEÑALES TEMPORANAS DE DAÑO SARCOLEMICO
GRADO 5	CROMATINA MARGINADA Y CONDENSADA, ROMPIMIENTO DE MIOFIBRILLAS, ESPACIO INTERMIOFIBRILAR ANORMAL, MARCADO EDEMA MITOCONDRIAL, ABUNDANTES CUERPOS DENSOS MITOCONDRIALES, DAÑO SARCOLEMICO SEVERO, AUSENCIA DE GLUCOGENO.

TABLA No. 8

RESULTADOS DE MICROSCOPIA OPTICA

OBSERVACIONES	CONTROL SANO	CONTROL INFARTADO	CONTROL TRATADO
% INFARTO	--	40-60%	20-50%
LOCALIZACION	--	VENTRICULO IZQ. Y 50% DEL SEPTUM VENTRICULAR	VENTRICULO IZQ. Y 25% DEL SEPTUM VENTRICULAR
NECROSIS COAGULATIVA	--	+++	++
CONGESTION	+	+++	++
EDEMA	--	+++	++
HEMORRAGIA	+	+++	++
FIBROBLASTOS	-	+/-	+/-
VACUOLIZACION	--	+++	++
CAREOLISIS	--	++	-

TABLA No. 9
RESULTADOS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA
MORFOLOGIA ULTRAESTRUCTURAL
DETERMINACION CUALITATIVA

ORGANELO	CONTROL SANO	CONTROL INFARTADO	GRUPO TRATADO
MITOCONDRIAS	NORMALES	HINCHAMIENTO, DESORGANIZACION EN CRESTAS, INCREMENTO EN EL ESPACIO DE LA MATRIZ Y LISIS.	SIMILARES AL GRUPO 2 PERO EN MENOR GRADO O PROCION.
SARCOMEROS	NORMALES	SEPARACION DE MIOFILAMENTOS RUPTURA DE LINEA Z, CONTRACCION SEPARACION DE LA MEMBRANA SARCOLEMICA Y DESPOLIMERIZACION.	ZONA SIN APARENTE DAÑO Y OTRAS CON CARAC. SIMILARES AL GRUPO 2 PERO EN MENOR GRADO.
NUCLEO	NORMAL	CROMATINA DISTRIBUIDA EN LA PERIFERIA.	CROMATINA DISPERSA EN EL INTERIOR DEL DEL MISMO.

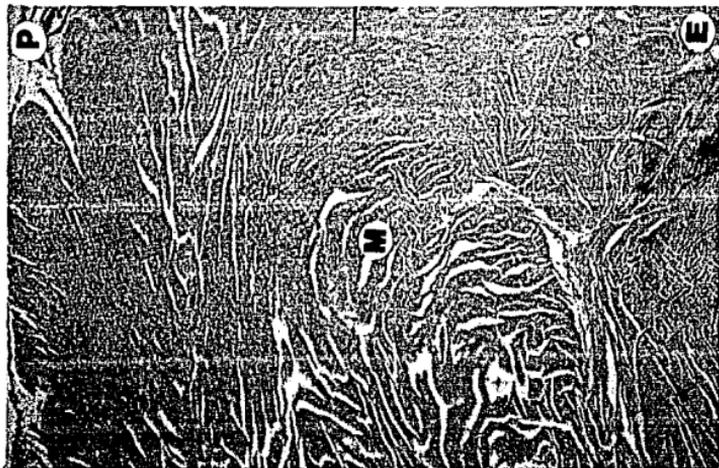


Figura No 11.

Músculo cardiaco de rata del grupo control sano 15X. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo. Se aprecian tres capas características: Pericardio (P), Miocardio (M) y Endocardio (E).

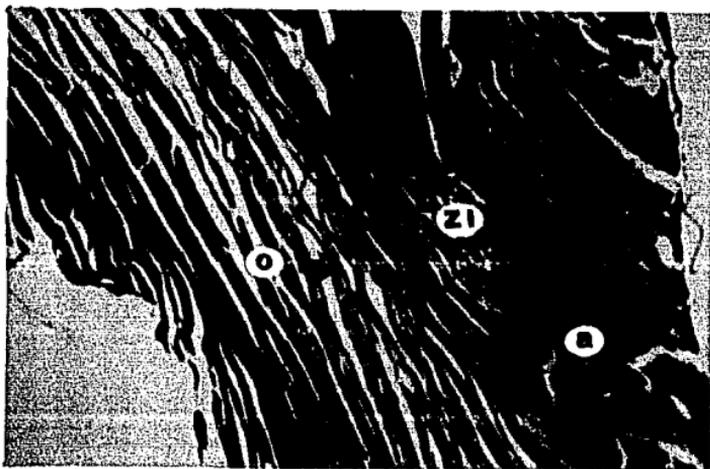


Figura No 12.
Músculo cardíaco de rata del grupo control infartado, Tinción Tricrómica de Masson 15X. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo. Se aprecia zona de infarto (ZI), evidente por la coloración verde que presenta la zona, con adelgazamiento (a) y ondulación (o) de miofibrillas.



Figura No 13.

Músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina, Tinción Tricrómica de Masson 15X. Corte longitudinal de ventrículo izquierdo. Se aprecia zona infarto (ZI) evidente por la coloración azul, con adelgazamiento (a) de miofibrillas y edema (e). En comparación con la figura No 11, se aprecia la disminución en la extensión del tejido infartado.

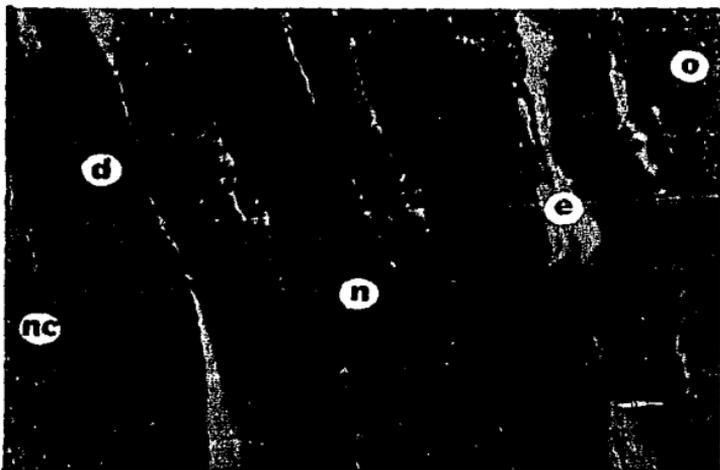


Figura No. 14
Músculo cardíaco de rata del grupo control infartado. Tinción Tricromica de Masson 100X. Corte longitudinal. Se aprecia daño isquémico, edema (e), núcleo (n), necrosis coagulativa (nc), ondulación (o) y despolimerización (d) de miofibrillas.

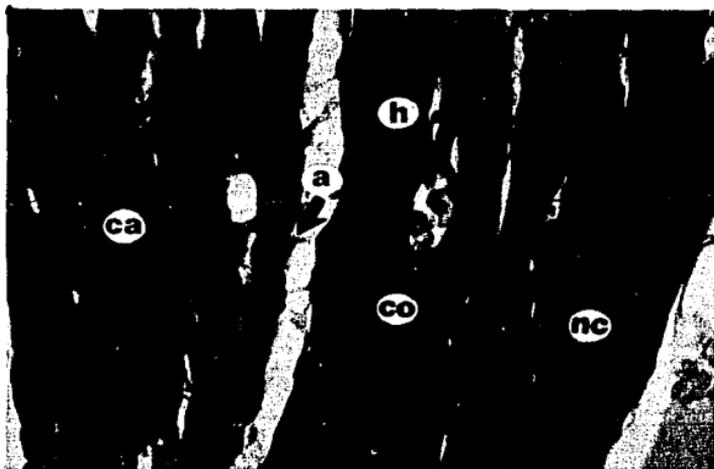


Figura No. 15
Músculo cardíaco de rata del grupo control infartado. Tinción Tricromica de Masson 40X. Corte longitudinal. Se aprecia adelgazamiento de miofibrillas (a), hemorragia (h), necrosis coagulativa (nc), fibras de colagena (co) y careolisis (ca).



Figura No. 16
Músculo cardíaco de rata del grupo control infartado. Tinción Tricromica de Masson 100X. Corte longitudinal. Se aprecia adelgazamiento de miofibrillas (a), necrosis coagulativa (nc) y fibras de colagena (co).

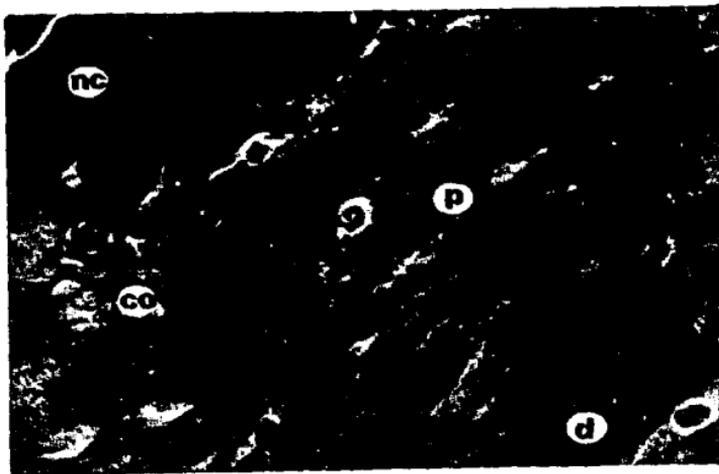


Figura No. 17
Músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina. Tinción Tricromica de Masson 100X . Corte longitudinal. Se aprecia necrosis coagulativa (nc), despolimerización de miofibrillas (d), espacio perimuclar (p) y fibras de colagena (co).

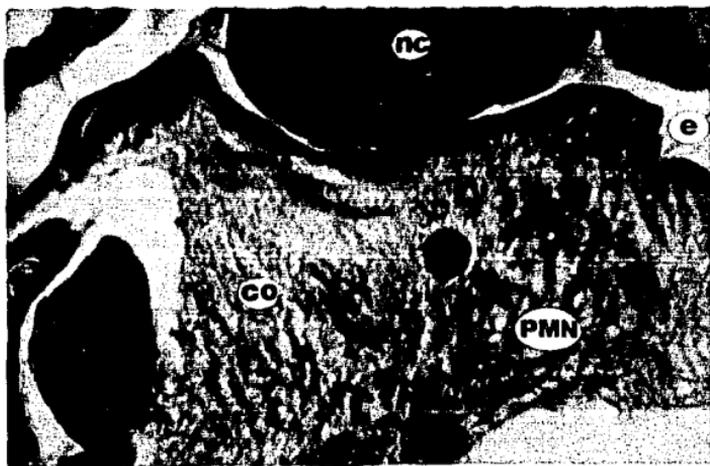


Figura No.18
Músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina. Tincion
Tricromica de Masson 100X. Corte oblicuo. Se aprecia necrosis
coagulativa (nc), edema (e), fibras de colagena (co) y presencia de
PMN's (PMN)

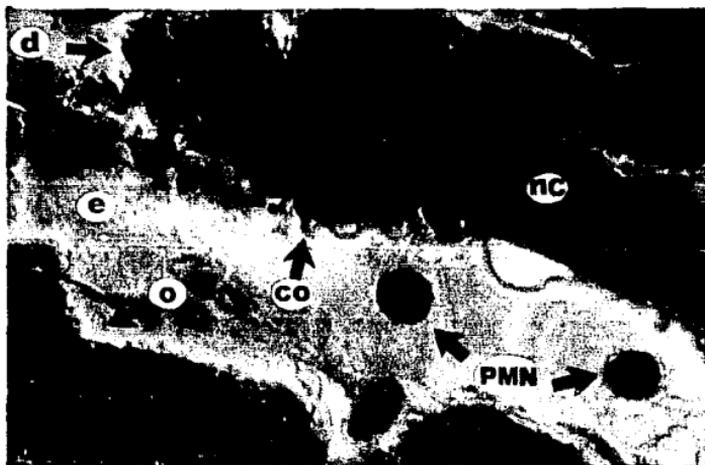


Figura No. 19
Músculo cardiaco de rata del grupo control infartado. Tinción Tricromica de Masson 100X. Corte longitudinal. Se aprecia necrosis coagulativa (nc), ondulación (o) y despolimerización (d) de miofibrillas, hemorragia (h), edema (e), proliferación de colagena (co) y presencia de PMN's (PMN).

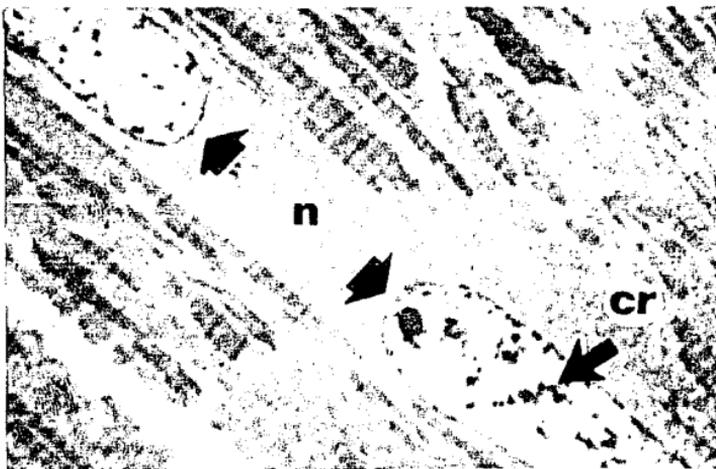


Figura No. 20

Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo control sano
20,000X. Se aprecia núcleo (n) normal que presenta cromatina (c)
dispersa.

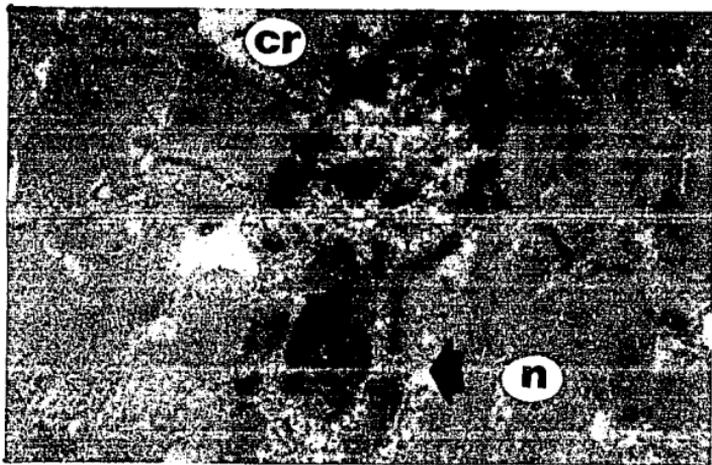


Figura No. 21
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo control infartado,
10,000X. Se aprecia núcleo (n) isquémico, que presenta compactación
de cromatina (cr) y marginación de la misma.

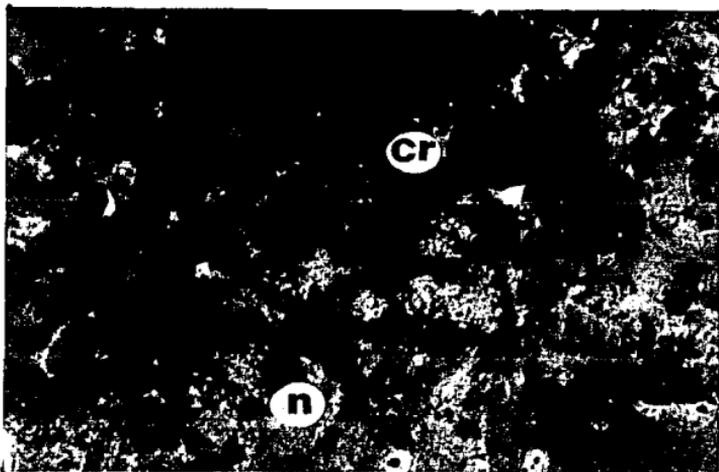


Figura No.22
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina, 6,000X. Se aprecia núcleo (n) isquémico que presenta cromatina (cr) moderadamente compactada y marginada.

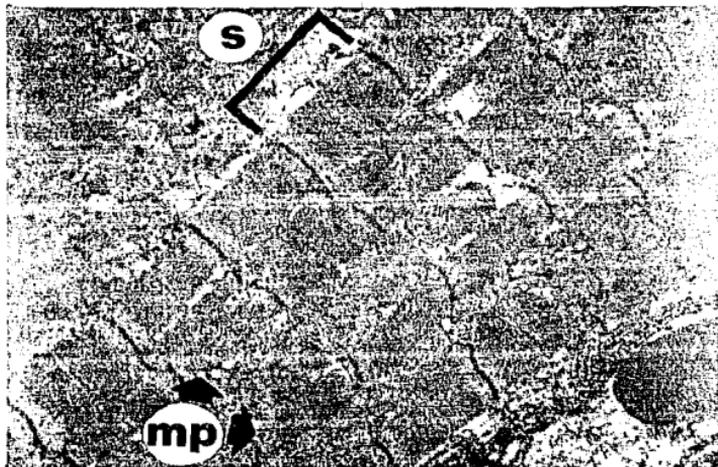


Figura No. 23

Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo control sano, 6,000X. Se aprecia sarcómero (s) relajado, miofibrillas dispuestas paralelamente (mp) y presencia de las cinco bandas características (M, H, A, I, Z).

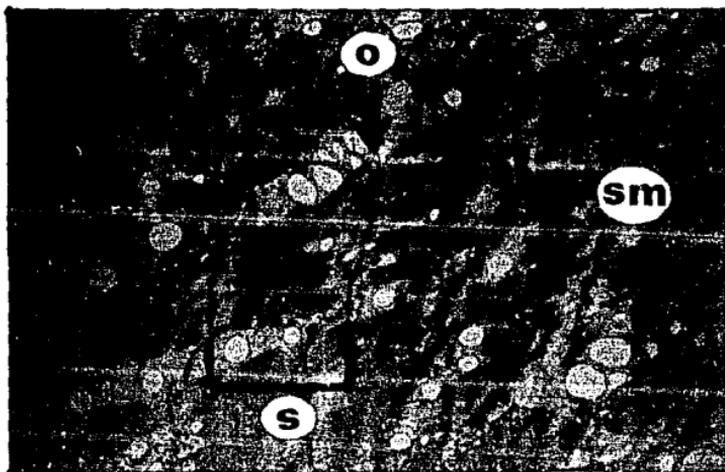


Figura No. 24

Micrografía del músculo cardíaco de rata del grupo control infartado a 6,000X. Se aprecia separación de miofilamentos (sm), ondulación de la banda Z (o), y la evidente contracción de sarcómero (s).

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA



Figura No. 25
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina, 15,000X. Se aprecia moderada separación de miofilamentos (sm), sarcómeros (s) relajados y ligera desalineación de la banda Z (dz).



Figura No. 26

Micrografía de músculo cardíaco de rata del grupo control sano, 20,000X. Se observan mitocondrias (m) normales que presentan crestas mitocondriales (cm) compactas y matriz densa.

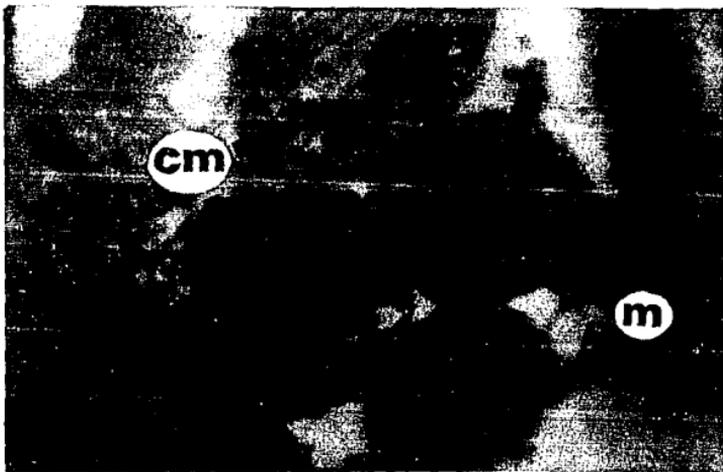


Figura No. 27
Micrografía de músculo cardíaco de rata del grupo control sano, 20,000X. Se observan mitocondrias (m) normales que presentan crestas mitocondriales (cm) compactas y matriz densa.

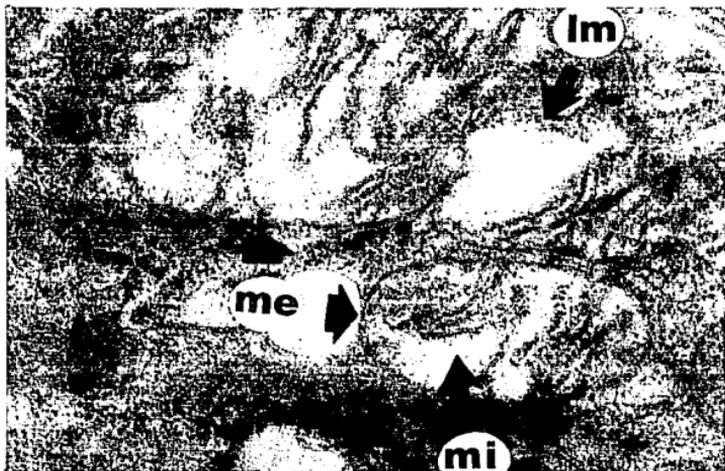


Figura No. 28

Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo control infartado, 20,000X. Se aprecian mitocondrias con edema (me) y destrucción de membrana interna (mi), así como lisis mitocondrial (lm).

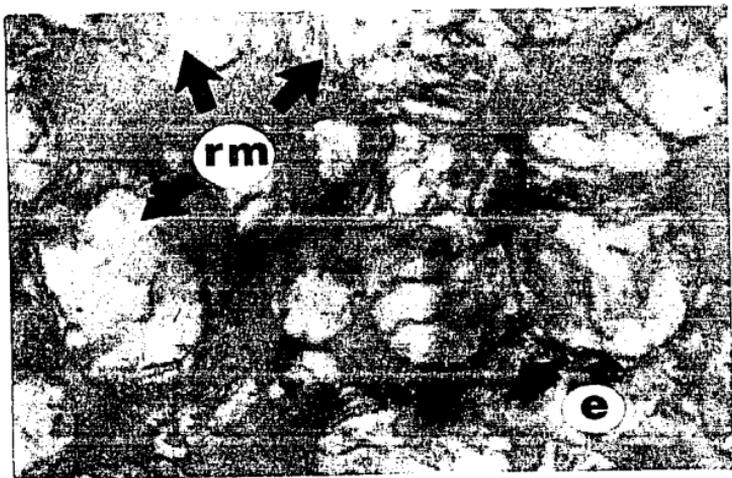


Figura No. 29
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo control infartado,
10,000X. Se aprecia daño mitocondrial severo con edema (e) y ruptura
de membrana interna (rm)

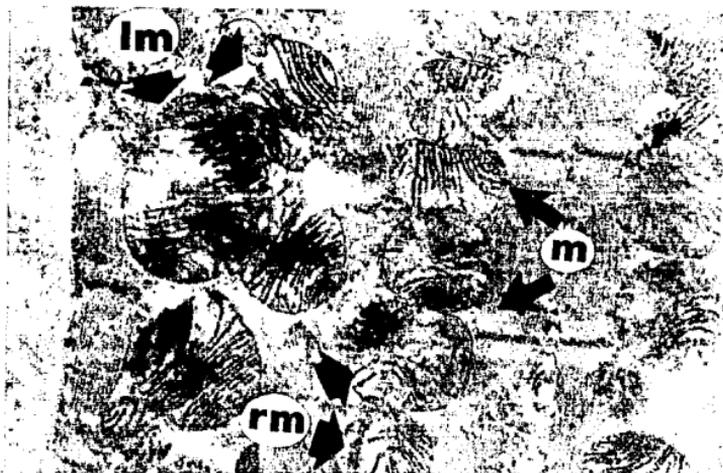


Figura No. 30
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina, 10,000X. Se aprecian mitocondrias (m) con diversos grados de daño, ruptura de membrana interna (rm), así como lisis mitocondrial (lm).

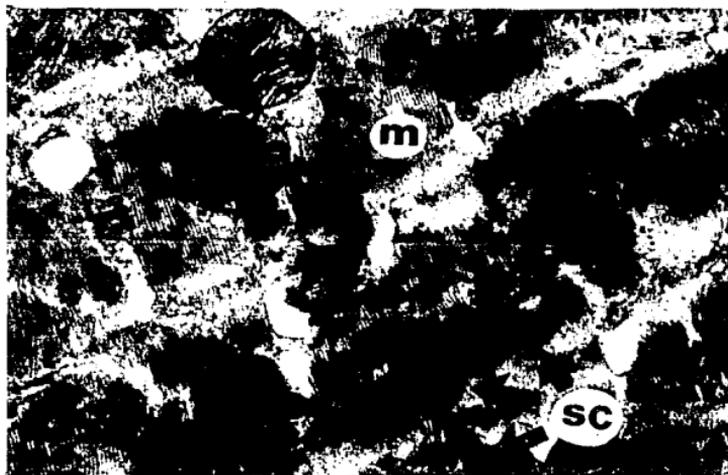


Figura No. 31
Micrografía de músculo cardiaco de rata del grupo tratado con Nifedipina, 10,000X . Se aprecian mitocondrias (m) con aclaramiento de matriz y separación de crestas (sc).

4.2. Estudios Semi-cuantitativos

4.2.1. Morfometría Subcelular.

Se midió el tamaño de mitocondria de control sano resultando de 1.2392 +/-0.2 micras, y el número de mitocondrias por 100micras cuadradas fué de 35.06 +/- 1.6 y el porcentaje de mitocondrias fué del 100% de normales en las muestras de cada control sano (ver figuras 32 y 33).

Se compararon los resultados obtenidos entre cada rata, no observándose ninguna diferencia estadística ($p < 0.05$) entre los ensayos (ratas) y tamaño de mitocondria. Lo mismo sucedió para el número de mitocondrias por 100 micras cuadradas y el por ciento de mitocondrias (sanas, dañadas y lisadas) en cuyo caso sólo se observaron mitocondrias normales.

En cuanto a los controles infartados en los tres parámetros medidos no se observó ninguna diferencia entre los ensayos realizados que resultara estadísticamente significativo $P < 0.01$. Pero al comparar los tamaños de mitocondrias (normales 1.3 +/-0.2micras, dañadas 1.7 +/- 0.6micras, lisadas 1.9 +/-0.6micras), las diferencias resultaron significativas ($p > 0.05$). Así mismo el número y porcentaje respectivamente de mitocondrias (normales 3.9 +/-0.5mito./100micras cuadradas (15.2% +/-0.8%), dañadas 33.9 +/-1.7mito./100micras cuadradas (72.7% +/-0.8%) y lisadas 5.1mito./100micras cuadradas (12.1% +/-1.1%), las diferencias resultaron estadísticamente significativas $P > 0.05$. (ver figuras 34, 35 y 36).

En el grupo tratado tampoco existió diferencia ($P < 0.01$) entre los ensayos realizados, sin embargo, los parámetros determinados de tamaño de mitocondria (normal 1.3 +/- 0.3micras, dañada 1.4 +/-

0.5micras y lisada 1.5 +/-0.6micras)no fueron estadísticamente significativos ($P < 0.05$). (Ver figura 37). El número de mitocondrias por 100 micras cuadradas y sus porcentos respectivos (normales 14.7 +/-0.2mito./100micras cuadradas (34.6% +/-2.4%), dañadas 10.5 +/-0.8mito./100micras cuadradas (50.2% +/-1.1%) y lisadas 4.9 +/-0.4mito./100micras cuadradas, mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$). (Ver figuras 38 y 39).

En forma general, en los tres grupos estudiados (control sano, control infartado y grupo tratado), no existió variación interensayo, es decir que el tamaño de mitocondria normal medido en las muestras obtenidas de una rata del grupo infartado, por ejemplo, no varió con respecto a la segunda rata estudiada del mismo grupo. Pero cuando se comparó los diferentes tamaños obtenidos y número de mitocondrias de cada tipo observada o su porcentaje, fueron estadísticamente diferentes.

4.2.2. Efectos de Nifedipina Sobre la Arquitectura Sub-celular.

Al comparar el tamaño de mitocondria normal del grupo control sano (1.23 +/-0.23 micras), infartado (1.27 +/-0.21 micras) y tratado (1.29 +/-0.33 micras), no existió diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.01$) entre las mitocondrias normales de cada grupo. (ver figura 40).

En control infartado, el tamaño de mitocondria dañada (1.69 +/- 0.60 micras) y lisada (1.89 +/- 0.56 micras) con respecto a las normales (1.27 +/- 0.21 micras) fué significativo ($P > 0.05$). Pero en el caso de el grupo tratado, el tamaño de mitocondria dañada (1.34 +/- 0.48 micras) y el de mitocondria normal (1.29 +/- 0.33 micras) no mostraron diferencia estadísticamente significativa ($P < 0.05$). Y con

respecto del tamaño de mitocondria lisada (1.50 ± 0.57) sí se observó diferencia estadísticamente significativa ($P > 0.05$). (Ver figura No 40).

Cuando se comparó el tamaño de mitocondria dañada de control infartado (1.69 ± 0.60 micras) con el tamaño de mitocondria dañada de grupo tratado (1.34 ± 0.48 micras), se observaron estadísticamente diferentes. El caso de mitocondrias lisadas de controles infartado y tratado no hizo falta hacer la comparación estadística, ya que se discutiran más adelante.

Al comparar el No. de mito. total/100 micras cuadradas, de los controles sano (35.05 ± 1.60), infartado (39.02 ± 0.91) y tratado (30.09 ± 0.81), no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.05$). (Ver figura 41).

Con estos totales, se calculó el porcentaje de mitocondrias normales, dañadas y lisadas para cada control, y al comparar el No de mitocondrias normales/100 micras cuadradas de control sano (35.05 ± 1.60 , 100%), con el No de mitocondrias normales/100 micras cuadradas de control infartado (3.02 ± 0.5 , 15.2% $\pm 0.82\%$), no fué necesario realizar estadística por que la diferencia es totalmente evidente, al comparar el No. de mitocondrias normales de controles infartado con el No. de mitocondrias normales/100 micras cuadradas de control tratado (14.67 ± 0.24 , 34.37% $\pm 2.41\%$) fueron estadísticamente diferentes ($P > 0.05$). Cuando se comparó el No de mitocondrias dañadas/100 micras cuadradas, de controles infartado (33.98 ± 1.74 , 72.71% $\pm 0.83\%$) y grupo tratado con nifedipina (10.51 ± 0.75 , 50.22% $\pm 1.07\%$) fueron significativamente diferentes. Pero al comparar el No. de mitocondrias lisadas/100 micras cuadradas, de controles infartado (5.11 ± 0.55 , 12.09 % $\pm 1.09\%$) y tratado

(4.91 +/- 0.39, 15.41% +/- 2.20%), no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($P < 0.01$) (Ver figuras 41 y 42).

Figura 32. Tamaño de Mitocondria Grupo Control Sano.

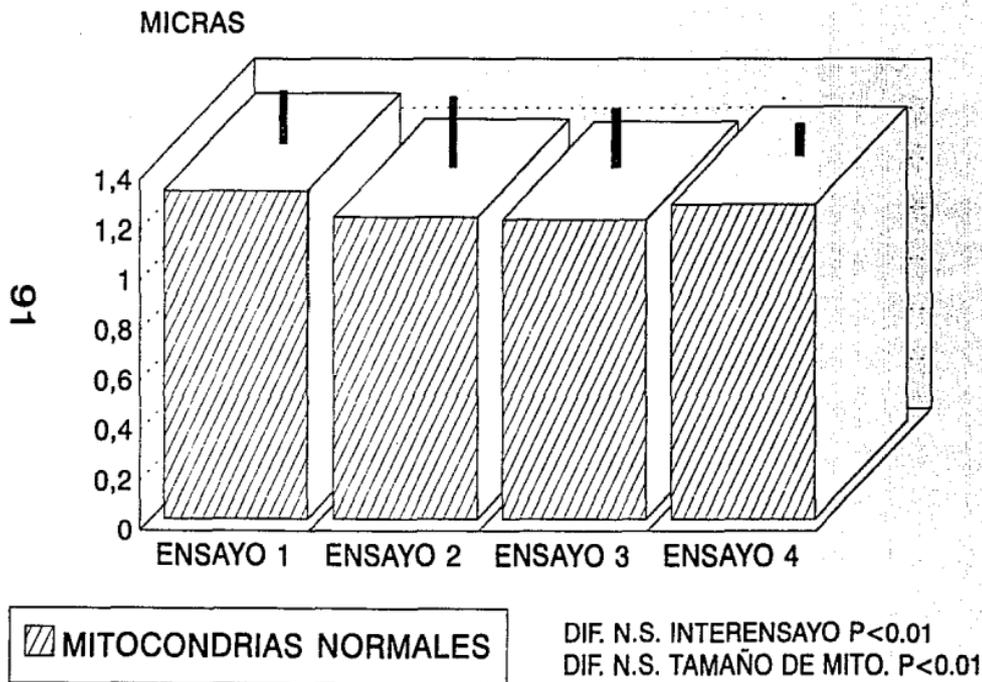


Figura 33. No. de Mitochondrias/100 micras² Grupo Control Sano.

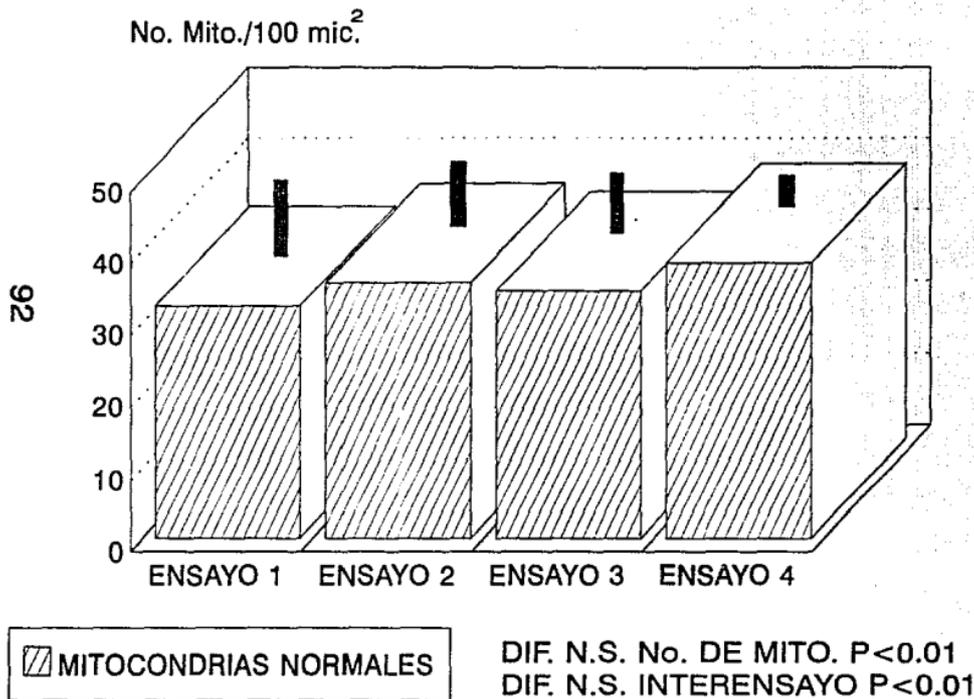
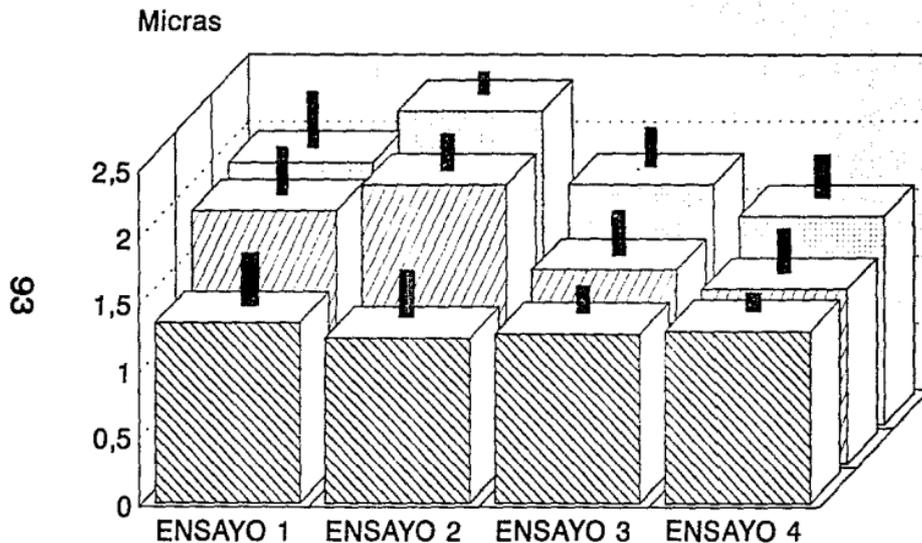


Figura 34. Tamaño de Mitocondria Grupo Control Infartado.



▨ NORMALES ▩ LISADAS □ DAÑADAS

DIF. N.S. INTERENSAYO $P < 0.01$
DIF. SIG. EN TAMAÑO DE MITO.
 $P > 0.05$

Figura 35. No. de Mitocondrias/100 micras² Grupo Control Infartado.

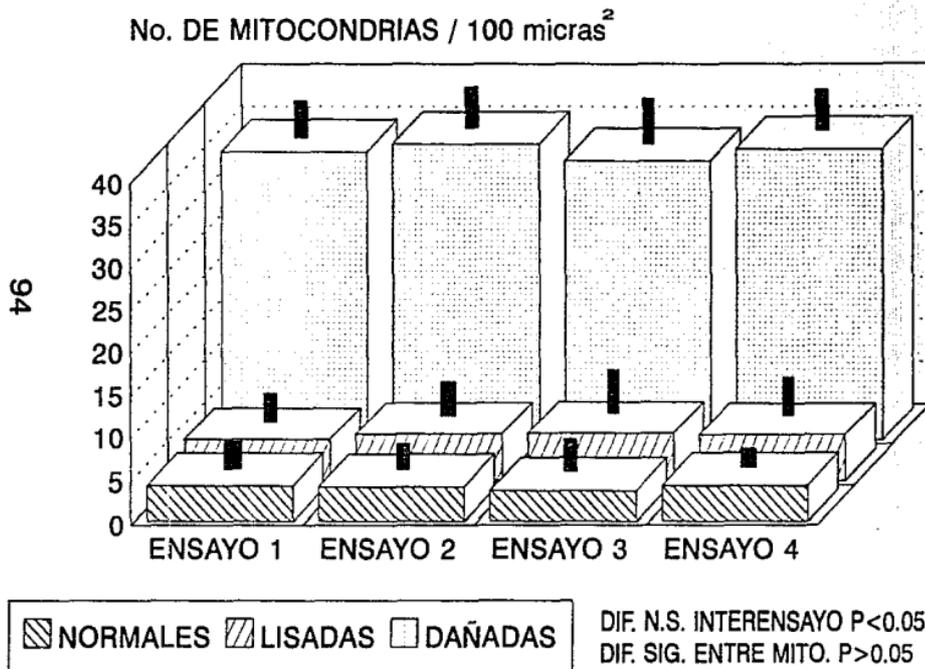


Figura 36. % de Mitochondrias Grupo Control Infartado.

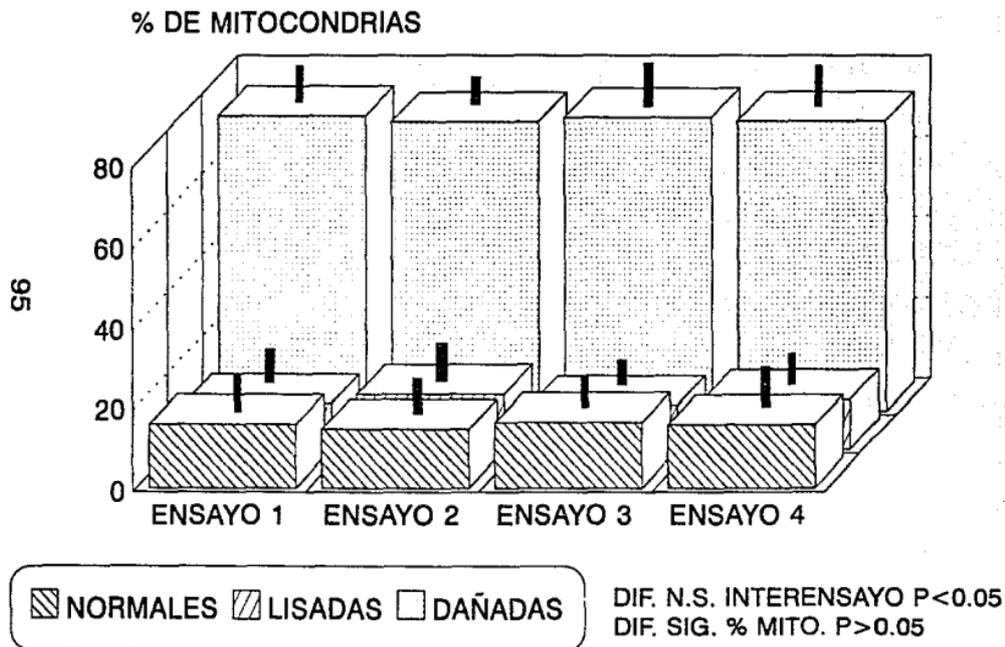
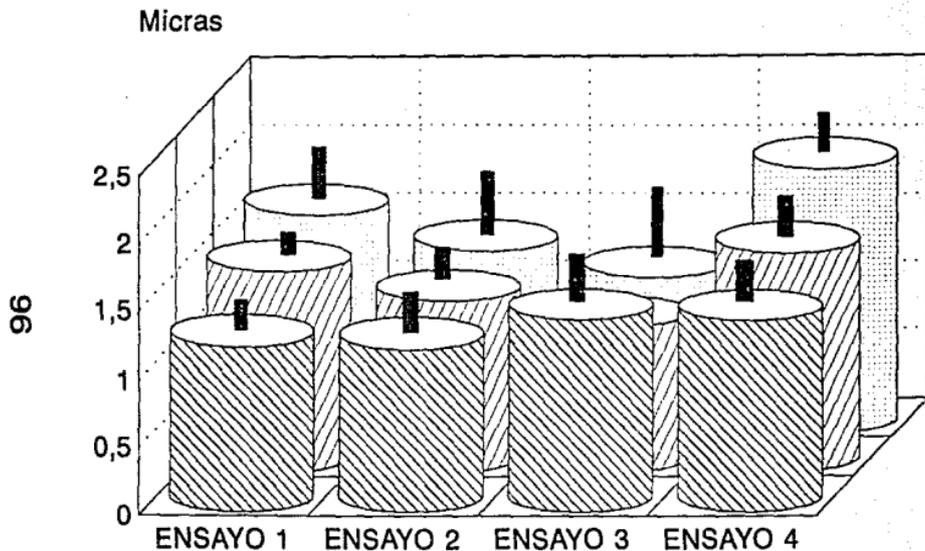


Figura 37. Tamaño de Mitochondria Grupo Tratado con Nifedipina.



▨ NORMALES ▩ DAÑADAS □ LISADAS

DIF. N.S. INTERENSAYO $P < 0.05$
DIF. N.S. EN TAMAÑOS $P < 0.05$

Figura 38. No. de Mitochondrias/100 micras² Grupo Tratado con Nifedipina.

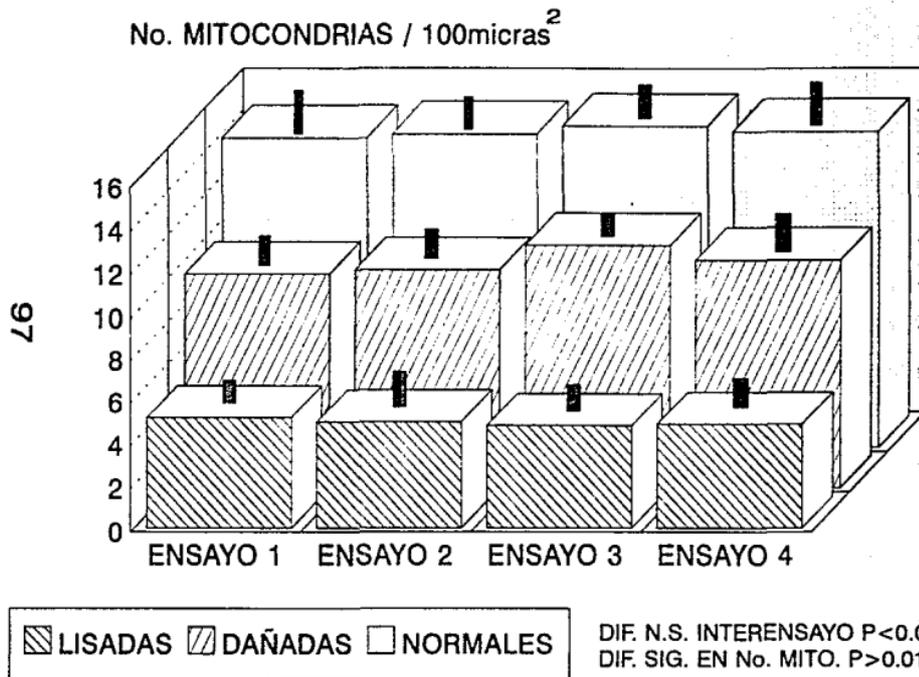


Figura 39. % de Mitochondrias Grupo Tratado con Nifedipina.

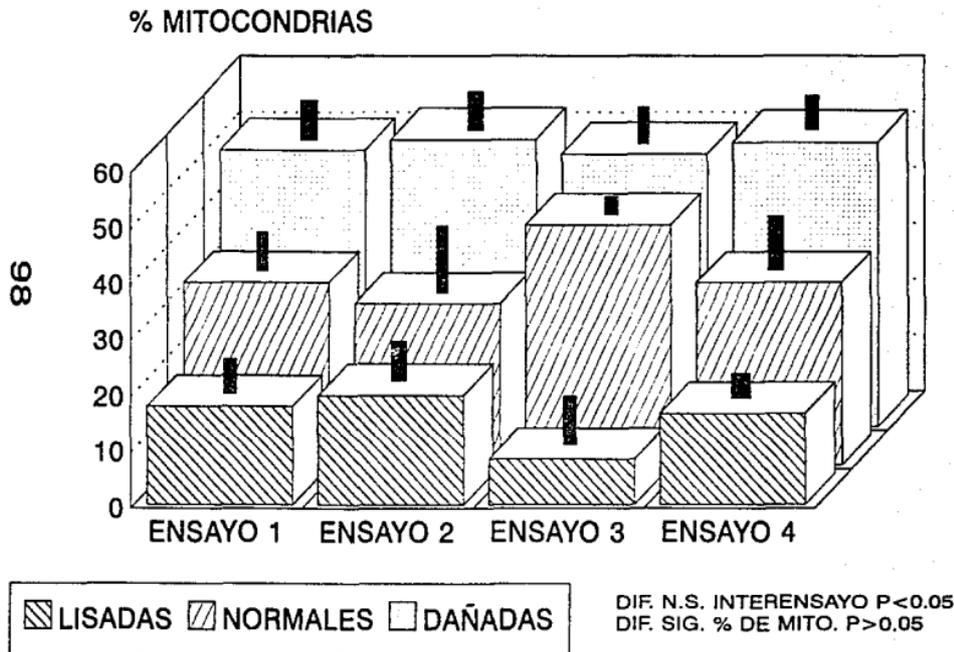


Figura 40. Comparación de Tamaños de Mitocondrias.

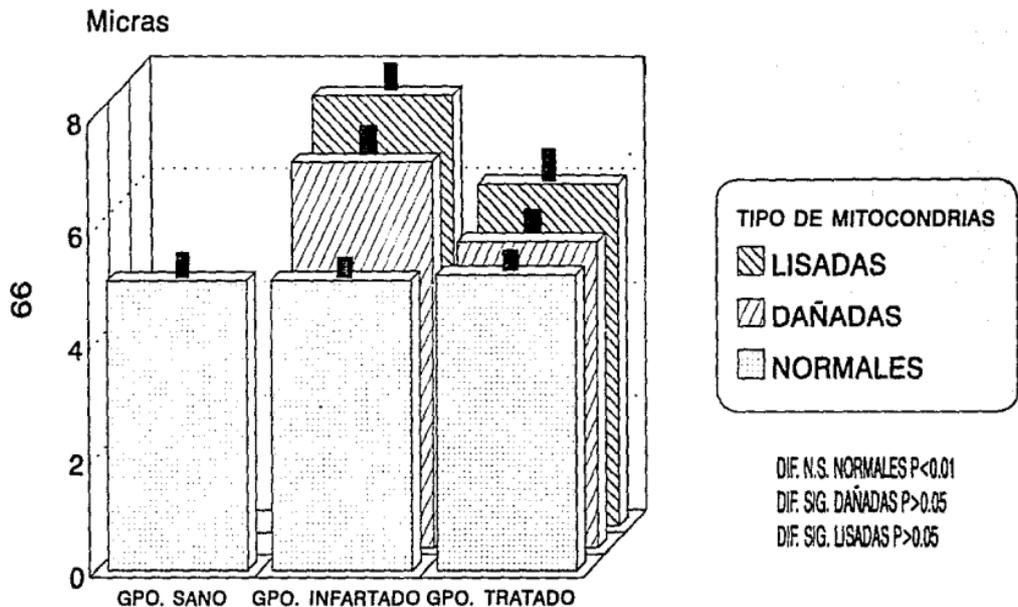


Figura 41. Comparación del No. de Mitocondrias/100micras²

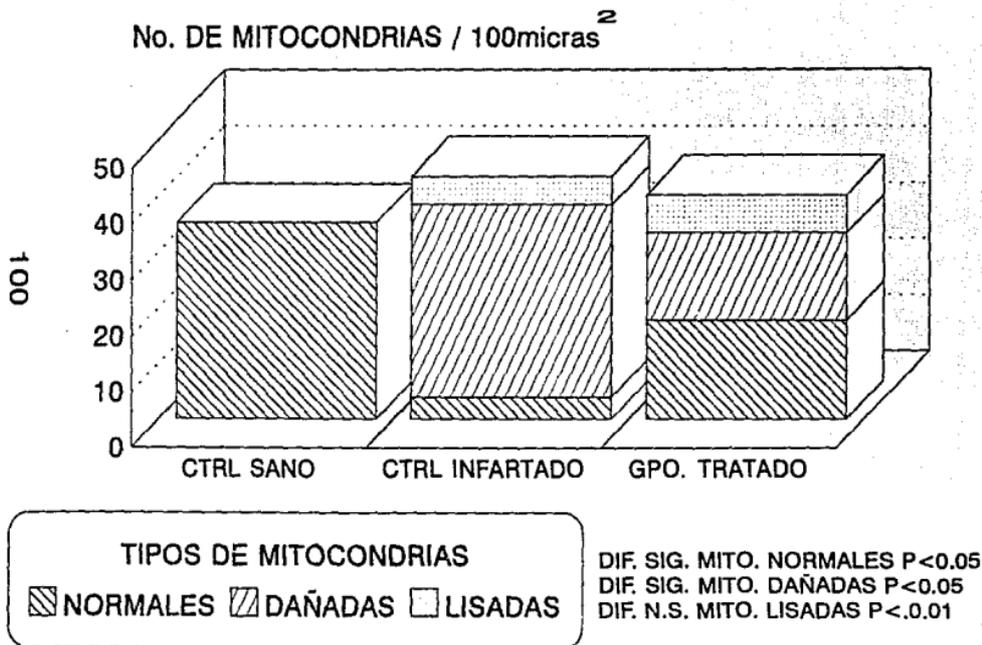
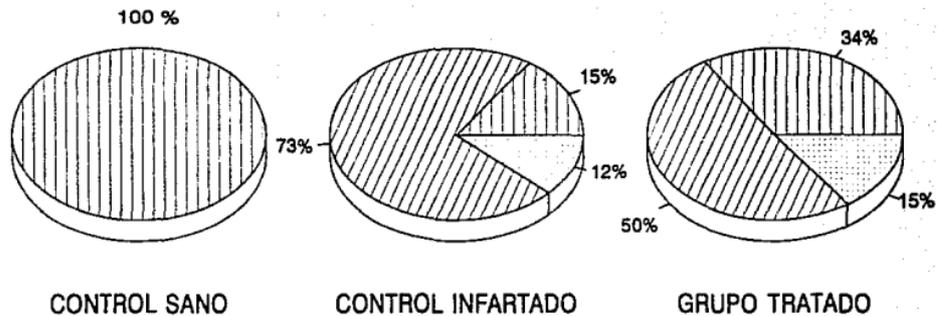


Figura 42. Comparación de Porcientos de Mitocondrias.

101



▭ MITO. SANAS ▨ MITO. DAÑADAS ▤ MITO. LISADAS

DIF. SIG. ENTRE NORMALES $P > 0.05$
DIF. SIG. ENTRE DAÑADAS $P > 0.05$
DIF. NO SIG. ENTRE LISADAS $P > 0.01$

5. DISCUSION.

Al tratar de establecer por morfometría las alteraciones más útiles para valorar el efecto de algún fármaco (en este caso nifedipina), es indispensable validar el modelo experimental utilizado, en otras palabras, determinar que tan variable es (a nivel subcelular) el infarto agudo al miocardio de una rata a otra para determinar su reproductibilidad así como la variación en una misma especie estudiada. Para poder diferenciar el efecto de un fármaco sobre el fenómeno IAM (6).

Con el análisis estadístico realizado para cada uno de los resultados obtenidos de cada una de las ratas del experimento, se pudo comprobar que el modelo de infarto al miocardio por medio de ligadura de la arteria coronaria ADI en rata, resulta ser homogéneo y reproducible, debido a que en cada caso, los controles sano, infartado y grupo control, no existió variación interensayo y el comportamiento por lote fué característico. Por lo tanto, los parámetros estudiados, son comparables entre sí ya que el fenómeno de necrosis tisular observado por microscopía óptica y electrónica de transmisión fué debida a la ligadura permanente de la arteria coronaria ADI, y no a procedimientos ajenos a los desarrollados por esta técnica. Así como las alteraciones en el proceso del infarto son debidas a efectos independientes del tratamiento y procesado de las muestras.

De esta manera, es posible establecer que el tamaño de mitocondria es una medida importante de la arquitectura subcelular, ya que el cambio observado en el tamaño de mitocondria dañada, de control infartado a grupo tratado, es dependiente de la concentración de electrólitos. Durante la isquemia el principal es el calcio y la concentración de

éste es regulada por canales y sistemas de transporte susceptibles de la acción de fármacos (30,39).

En las mitocondrias dañadas, existe un continuo de daño amplio, que es interesante analizar, esto se refiere a que en términos generales se acepta que existe edema mitocondrial cuando el diámetro promedio mitocondrial supera el diámetro promedio de controles sanos (6). En el caso de controles infartados así lo fué, pero en el grupo tratado el tamaño mitocondrial fué muy similar al control sano. Posiblemente, el efecto cardioprotector de la nifedipina consistió en la disminución del edema de las mitocondrias dañadas, pero no detuvo los procesos autolíticos de la mitocondria una vez activados, esto es que no todas las alteraciones durante el infarto son vía el calcio, pero el edema mitocondrial principalmente; es por el exceso de éste ión durante la isquemia.

Si revisamos el tamaño de mitocondrias lisadas, vemos que disminuye en el caso de grupo tratado donde debemos hacer algunas consideraciones; primero el tamaño de mitocondrias lisadas es una medida relativa, ya que se midió la distancia (longitud del eje mayor) entre los residuos de membrana externa de las mitocondrias visibles en la fotografía. Este factor en primer lugar depende tanto de la orientación y profundidad del corte y en segundo del momento del corte, esto es que, en un mismo instante se pueden tener mitocondrias lisadas con pérdida considerable de volumen mitocondrial y mitocondrias en estado de lisis con pérdida poco evidente del contenido mitocondrial; y no sería de sorprender, encontrar mitocondrias lisadas de menor tamaño que las normales. Por lo tanto, el tamaño de mitocondria lisada es un parámetro por demás medido e

inútil, que además no aporta información contundente ya que es susceptible a toda discusión.

El número de mitocondrias (normales, dañadas y lisadas) por 100 micras cuadradas, representa uno de los mejores indicativos del daño tisular así como de la alteración del proceso de infarto, por el cambio en las poblaciones de mitocondrias estudiadas.

En los controles sin oclusión (sanos) la población de mitocondrias fué conformada exclusivamente por mitocondrias normales y los procedimientos histológicos no alteraron este valor, cualquier alteración en esta población es debida a un proceso patológico; en este caso la isquemia post-oclusión.

Cuando se comparó el número de mitocondrias por 100 micras cuadradas, se pudo comprobar que el área fotografiada en todos los casos fué constante ya que no existió diferencia significativa en la cantidad de estructuras por área ($p < 0.05$).

Independientemente de que en este experimento, la población total mitocondrial fué prácticamente la misma para controles sanos, infartados y grupo tratado, es conveniente expresar las diferentes sub-poblaciones de mitocondrias, como por cientos de su respectivo total y la comparación realizada sera en todo caso más factible y reflejo del comportamiento del número mitocondrial por área. En las figuras No 41 y 42. Se aprecia este concepto.

Esto permite comparar las diferentes poblaciones de mitocondrias estudiadas. Con esto se encontró una disminución sensible en la población de mitocondrias dañadas en el grupo tratado respecto al control infartado, lo que establece una primera evidencia de la acción de la nifedipina en este organelo.

Cabe destacar que la población de mitocondrias lisadas del control infartado y grupo tratado, no variaron significativamente. Esto ha sido descrito anteriormente (56), es decir, que durante la fase aguda del infarto hay un % de tejido que inevitablemente sufre daño irreversible durante las primeras horas del infarto, y que es prácticamente imposible recuperarlo. A nivel celular al parecer se manifiesta una situación similar.

En este caso, se hace evidente la influencia definitiva de la nifedipina sobre la arquitectura mitocondrial, que de algún modo, ya sea por vasodilatación (modo de acción), o bien, por el bloqueo de los canales lentos de calcio a nivel de músculo cardíaco (mecanismo de acción), tanto en sarcolema como en sitios intracelulares, ejerza un efecto cardio protector.

En este caso se observó con toda claridad que la nifedipina tiene una acción importante sobre este organelo durante la isquemia. Y que tiene efectos protectores, por que al analizar conjuntamente el tamaño mitocondrial y tanto número como por ciento de las poblaciones mitocondriales, se resume en la disminución de las alteraciones en la arquitectura de la mitocondria (principalmente edema), y reflejando este efecto en la reducción de la población de mitocondrias dañadas con el aumento concomitante de la población normal de este organelo. Esto refuerza la idea de que una manera de disminuir el tamaño del infarto, es retrasar los efectos nocivos de la alta concentración de calcio intracelular que se genera durante la isquemia en el IAM(65). Sin embargo, es necesaria la continuidad del presente trabajo a las 8, 12, 24 y 48 horas post-oclusión, para completar la evolución del infarto agudo al miocardio.

En base a la comparación de los cortes histológicos de grupo control con oclusión (infartado) y grupo con oclusión tratado, con cortes de tejido cardíaco sin oclusión, se pudieron observar las alteraciones más importantes de la isquemia aguda en el corazón de rata, tales como necrosis coagulativa, congestión, edema, hemorragia, proliferación de tejido conectivo, vacuolización y careolisis, entre otras. Así como estimar el tamaño del infarto, en donde al comparar el porcentaje de tejido infartado de los grupos control con oclusión y grupo tratado, se pudo apreciar la disminución de éste. Sin embargo, como los estudios de M.O. son cualitativos, no son del todo contundentes. Por lo que, para el estudio del Infarto por M.O., se sugiere la incorporación de técnicas planimétricas y estadísticas.

6. CONCLUSIONES

1. Por medio del análisis de microscopía óptica se determinó que la oclusión coronaria en ratas después de 4h. Provoca una serie de alteraciones en la célula muscular cardiaca, principalmente: necrosis coagulativa, congestión, lisis celular. Mientras que por medio del análisis MET se observó careólisis, despolimerización de miofibrillas, edema y lisis mitocondrial.

2. El estudio de las alteraciones mitocondriales producidas por la oclusión coronaria (lesión en membrana interna, edema y lisis), resultan útiles para determinar el daño isquémico.

3. En base a los cambios observados en la mitocondria se determinó el daño isquémico ante la oclusión de una arteria coronaria.

4. Mediante el análisis estructural de la mitocondria se establece que el efecto cardioprotector de la nifedipina se basa principalmente en la preservación de éste organelo.

7. BIBLIOGRAFIA: Referencias.

- 1) Anversa P., Beghi C., Mikkawa Y., Olivetti G., "Myocardial Response to Infarction in the Rat", *Am. J. Pathol.*, 118:484-492, 1985.
- 2) Anversa P., Beghi C., Kikkawa Y., Olivetti G., "Myocardial Infarction in Rats", *Circ. Res.*, 58:26-37, 1986.
- 3) Anversa P., Loud A., Levicky V., Guideri G., "Left Ventricular Failure Induced by Myocardial Infarction I", *Am. J. Physiol.*, 248 (Heart Circ. Physiol. 17):H876-H882, 1985.
- 4) Anversa P., Alden L., Levicky V., Guideri G., "Left Ventricular Failure Induced by Myocardial Infarction II", *Am. J. Physiol.*, 248 (Heart Circ. Physiol. 17):H883-H889, 1985.
- 5) Anversa P., Loud A., Giacomelli F., Wiener J., "Absolute Morphometric Study of Myocardial Hypertrophy in Experimental Hypertension I", *Lab. Invest.*, 38(5):586-596, 1978.
- 6) Anversa P., Loud A., "Biology of Disease: Morphometric Analysis of Biologic Processes", 50(3):250-261, 1984.
- 7) Bigger J., "Ventricular Arrhythmias in Ischemic Heart Disease", *Prog. Cardiovasc. Dis.*, 19:255-263, 1977.
- 8) Bernauer W., "Effects of Glucocorticosteroids in Rats with Acute Myocardial Infarction", *Arch. Int. Pharmacodyn.*, 244:86-99, 1980.
- 9) Braunwald E., Maroko P., "Effects of Hyaluronidase and Hydrocortisone on Myocardial Necrosis After Coronary Occlusion", *Am. J. Cardiol.*, 37(31):550-556, 1976.
- 10) Breimer D., Schellens M., Soons A., "Nifedipine: Variability in its Kinetics and Metabolism in Man", *Pharmac. Ther.*, 44:445-454, 1989.
- 11) Byrne J., Appleyard R., Chin Lee C., Couper G., et al., "Controlled Reperfusion of the Regionally Ischemic Myocardium With Leucocyte-Depleted Blood Reduces Stunning, the No-Reflow Phenomenon and Infarct Size", *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 103:66-72, 1992.
- 12) Campbell C., Przyklenk K., Kloner R., "Infarct Size Reduction: A Review of the Clinical Trials", *J. Clin. Pharmacol.*, 26:317-329, 1986.
- 13) Chiarello M., Brevetti G., Ambrosio G., Cataffo A., et al., "Long-Term Protection of Ischemic Myocardium by Nitroglycerin Ointment", *Cardiovasc. Res.*, 18:321-325, 1984.
- 14) Clark R., Christlieb I., Vanderwonde J., Henry P., "Use of Nifedipine to Decrease Ischemic-Reperfusion Injury in the Surgical Setting", *Am. J. Cardiol.*, 55:125B-138B, 1985.

- 15) Conti R., "Large Vessel Coronary Vasospasm: Diagnosis, Natural History and Treatment", *Am. J. Cardiol.*, 55:41B-49B, 1985.
- 16) Diaz F., Rivera A., López G., et al, "Efectos de un Programa de Ejercicio Aeróbico Y Dieta Sobre la Composición Corporal y Función Cardiovascular en Obesos", *Arch. Inst. Cardiol. Mex.* 56:527-533, 1986.
- 17) Espinoza R., Badui E., Narvaez M., Hurtado R., "Infarto del Miocardio con Coronarias Normales", *Arch. Int. Cardiol. Mex.*, 56:481-484, 1986.
- 18) Ferlinz R., "Nifedipine in Myocardial Ischemia, Systemic Hypertension, and Other Cardiovascular Disorders". *Ann. Inter. Med.*, 105:714-729, 1986.
- 19) Fessler H., Brower R., Wise R., Permutt S., "Positive Pleural Pressure Decrease Coronary Perfusion", *Am. J. Physiol.* 258 (Heart Circ. Physiol. 27):H814-H820, 1990.
- 20) Fishbein M., Maclean D., Maroko P., "Experimental Myocardial Infarction in the Rat", *Am. J. Pathol.*, 90:57-70, 1978.
- 21) Flores N., Singharo S., Davies R., Sheridan D., "Effects of Regional Ischaemia on Coronary Artery Calibre in the Rabbit"., *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 23:1015-1029, 1991.
- 22) Fujiwara H., Ashraf M., Sato S., Millard R., "Transmural Cellular Damage and Blood Flow Distribution in Early Ischaemia in Pig Heart", *Circ. Res.* 51:683-693, 1982.
- 23) Fuster V., Badimon L., Badimon J., Chesebro J., "The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes I", *Nw. Eng. J. Med.*, 23:242-250, 1992.
- 24) Fuster V., Badimon L., Badimon J., Chesebro J., "The Pathogenesis of Coronary Artery Disease and the Acute Coronary Syndromes"., *Nw. Eng. J. Med.*, 30:310-318.
- 25) Ganote C., Humphrey S., "Effects of Anoxic Oxygenated Reperfusion in Globally Ischemic, Isovolumic, Perfused Rat Heart", *Am. J. Pathol.*, 120:129-145, 1985.
- 26) Ganote C., Hohl C., Rim D., Heide R., "An in vitro Model of Myocardial Ischaemia Utilizing Isolated Adult Rat Myocytes", *J. Moll. Cell. Cardiol.*, 22:165-181, 1990.
- 27) Ganote C., "Contraction Band Necrosis and Irreversible Myocardial Injury", *J. Moll. Cell. Cardiol.*, 15:67-73, 1983.
- 28) Ganote C., Heide V., "Cytoskeletal Lesions in Anoxic Myocardial Injury", *Am J. Pathol.*, 129:327-344, 1987.

- 29) Hearse D., Richard V., Yellon D., Kingma J., "Evolving Myocardial Infarction in the Rat in vivo: An Inappropriate Model for the Investigation of Drug-Induced Infarct Size Limitation During Sustained Regional Ischaemia", *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 11:701-710, 1988.
- 30) Henry P., Clark R., "Protection of Ischemic Myocardium by Treatment with Nifedipine", *Am. J. Physiol.*, 233:H677-H684, 1979.
- 31) Hutchins G., Bulkley B., "Infarct Expansion Versus Extension: Two Different Complications of Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.*, 41(7): 1127-1132, 1978.
- 32) Itaya T., Hashimoto H., Uematsu T., Nakashima M., "Alterations of Responsiveness to Adrenoceptor Agonists and Calcium of Non-Infarcted Hypertrophied Muscle from Rat With Chronic Myocardial Infarction". *Br. J. Pharmacol.*, 99:572-576, 1990.
- 33) Jennings R., Reimer K., Hill M., Mayer S., "Total Ischaemia in Dog Hearts, In Vitro, I", *Circ. Res.*, 49:892-900, 1981.
- 34) Katz A., "Basic Cellular Mechanisms of Action of The Calcium Channel Blockers", *Am. J. Cardiol.*, 55:2B-9B, 1985.
- 35) Kida M., Fujiwara H., Ischida M., et al., "Protective Effect of Verapamil in Ischemic Porcine Hearts: Analysis of Ultrastructural and Metabolic Changes Using In Vitro P-NMR Spectroscopy", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22:759-769, 1990.
- 36) Kudoh Y., Hearse D., Maxwell M., Yoshida S., et al., "Calcium Antagonist and Evolving Myocardial Infarction: Studies of the Effect of Nifedipine on Tissue ATP, Collateral Flow and Infarct Size in the Closed Chest Dog", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18(Suppl 4): 77-92, 1986.
- 37) Kumar Ch., Singh M., "Pharmacological Intervention and Myocardial Infarct Size in Rat", *Eur. J. Pharmacol.*, 109: 117-120, 1985.
- 38) Martorana P., Linz W., Gobel H., et al., "Effects of Nicainoprol on Reperfusion Arrhythmia in the Isolated Working Rat Heart and on Ischemia and Reperfusion Arrhythmia and Myocardial Infarct Size in the Anesthetized", *Eur. J. Pharmacol.*, 143: 391-401, 1987.
- 39) Manson J., Tosteson H., Ridker P., Satterfield S., et al., "The Primary Preventions Of Myocardial Infarction", *N. Engl. J. Med.*, 21: 1406-1416, 1992.
- 40) Masters T., Harbold N., Hall D., Jackson., et al, "Beneficial Metabolic Effect of Methylprednisolone Sodium Succinate in Acute Myocardial Ischemia", *Am. J. Cardiol.*, 37(31): 557-563, 1976.

- 41) McAllister R., Hamann S., Blouin R., "Pharmacokinetics of Calcium-Entry Blockers", *Am. J. Cardiol.*, 55: 30B-40B, 1985.
- 42) Muñoz J., Zghaib A., Estevez L., "Correlaciones Clínico Angiográficas del Infarto Miocárdico en los Jóvenes", *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, 56: 475-479, 1986.
- 43) Olivetti G., Ricci R., Beghi C., "Response of Border Zone to Myocardial Infarction in Rats", *Am. J. Pathol.*, 125: 476-483, 1986.
- 44) Page D., Caulfield J., Kastor J., et al., "Myocardial Changes Associated with Cardiogenic Shock", *N. Engl. J. Med.*, 285(3): 133-137, 1971.
- 45) Pearle D., "Nifedipine in Acute Myocardial Infarction", *Am. J. Cardiol.* 54: 21E-23E, 1984.
- 46) Przyklenk K., Vivaldi M., Schoen F., Arnold J. "Salvage Of Ischemic Myocardium by Reperfusion", *Cardiovasc. Res.*, 20: 403-414, 1986.
- 47) Reimer K., Jennings R., Hill M., "Total Ischemia in Dog Heart, in vitro, II", *Circ. Res.*, 49:901-911, 1981.
- 48) Reimer K., Jennings R., "Effects of Calcium -Channel Blockers on Myocardial Preservation During Experimental Acute Myocardial Infarction", *Am J Cardiol*, 55:107B-115B, 1985.
- 49) Reimer K., Lowe J., Rasmussen M., Jennings R., "The Wavefront Phenomenon of Ischemic Cell Death", *Circ.*, 56(5):786-793.
- 50) Reimer K., Rasmussen M., Jennings R., "Infarct Size Reduction by Propranolol before and after Coronary Ligation in Dogs.
- 51) Rivera M., "Hipertensión Arterial Sistémica e Isquemia del Miocardio", *Ateroma*, 2(9):105-109.
- 52) Robinson B., "Functional Differences in Blood Vessels Determined from Studies with Calcium-Channel Blocker", *Am. J. Cardiol.*, 55:24B-29B, 1985.
- 53) Saxena p., Duncker D., Verdouw P., "Systemic Haemodynamics of Dihydropyridine Derivates in Conscious Pigs with or without Propranolol", *Eur. J. Pharmacol.*, 157:401-409, 1988.
- 54) Schaper W., "New Experimental Models for the Development of Antianginal Drugs", *Ischemic Myocardium and Antianginal Drugs*". Raven Press New York, 171-176.
- 55) Seymour A., Chatham J., Radda G., "Effects of Repeated Low Calcium Perfusion on the Rat Heart: A Gradual Induction of Calcium Related Damage", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22:131-141, 1990.

- 56) Slish D., Schultz D., Schwartz A., "Molecular Biology of Calcium Antagonist Receptor", *Hypertension*, 19(1):19-23, 1992.
- 57) Smith H., "Infarct Size Pharmacology-Where Next?", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, Supp. 4:105-107, 1986.
- 58) Sonnenblick E., Fein F., Capasso J., Factor S., "Microvascular Spasm as a Cause of Cardiomyopathies and the Calcium-Blocking Agent Verapamil as Potential Primary Therapy", *Am. J. Cardiol.* 55:179B-184B, 1985.
- 59) Takayasu T., "Waste of ATP for Tension Development in Myocardial Acidosis: Chemomechanical Uncoupling at Myofibrillar Level", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22:127-130, 1990.
- 60) Toledo L., "Mecanismos de daño neutrófilo-oxígeno en la lesión de isquemia reperfusión", *G. Med. Mex.*, 127(4):349-356, 1991.
- 61) Urquhart J., Epstein S., Patterson R., "Comparative Effects of Calcium-Channel Blocking Agents on Left Ventricular Function During Acute Ischemia in Dogs With or Without Congestive Heart Failure", *Am. J. Cardiol.*, 55:10B-16B, 1985.
- 62) Vanhoutte P., "Calcium-Entry, Vascular Smooth Muscles and Systemic Hypertension", *Am. J. Cardiol.*, 55:17B-23B, 1985.
- 63) Vracko R., Thorning D., Frederickson R., "Spatial Arrangements of Microfibrils in Myocardial Scars: Application of Antibody to Fibrillin", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 22:749-757, 1990.
- 64) Watts J., "Protection of Ischemic Hearts by Calcium Antagonists", *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 18 (supp. 4): 71-75, 1986.
- 65) Weisman H., Bush D., Mannisi J., et al., "Cellular Mechanism of Myocardial Infarct Expansion", *Circ.* 78:186-201, 1988.
- 66) Weisman H., Healy B., "Myocardial Infarct Expansion, Infarct Extension and Reinfarction: Pathophysiologic Concepts", *Prog. Cardiovasc. Dis.* 30(2):73-110, 1987.
- 67) Winniford M., Willerson J., Hills D., "Calcium Antagonists for Acute Ischemic Heart Disease", *Am. J. Cardiol.*, 55:116B-124B, 1985.
- 68) Wyatt H. Forrester J., Diamond G., "Functional Abnormalities in Nonoccluded Regions of Myocardium After Experimental Coronary Occlusion", *Am. J. Cardiol.*, 37(4):366-372, 1976.
- 69) Yves P., Zannad F., Parisot M., Royer R., "Role of Ancillary Properties of Beta-adrenoceptor Antagonists in Protecting the Heart of Anoxia", *Eur. J. Pharmacol.*, 163:337-343, 1989.