

56  
leje.



" U. N. A. M. "

FACULTAD DE ESTUDIOS  
"FACULTAD DE ESTUDIOS"  
"SUPERIORES DE CUAUTITLAN"



Departamento de  
Exámenes Profesionales

"EFECTO DE LA ROPITONA SOBRE EL INFARTO  
MIOCARDICO INDUCIDO MEDIANTE LA LIGADURA  
CORONARIA EXPERIMENTAL EN LA RATA"  
"ESTUDIO TISULAR Y ULTRAESTRUCTURAL"

TESIS PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

Q u e p r e s e n t a n :

- Leticia Rodríguez Martínez con cuenta No. 8330628-0
- Margarita Vega Contreras con cuenta No. 8754163-0
- Gerardo Navarro Gómez con cuenta No. 8406922-9

Directora de Tesis: M. en C. Luisa Martínez Aguilar  
 Coasesores: M en C. Sofía Gonzales Gallardo  
 M. V. Z. Jorge Torres Martínez  
 PhD. Eliseo Hernandez Baumgarten

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx. 1994

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



## **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.



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

Efecto de la Ropitofna sobre el Infarto miocárdico inducido mediante  
la ligadura coronaria experimental en la rata. "Estudio Tisular y  
Ultraestructural".

que presenta la pasante: Leticia Rodríguez Martínez  
con número de cuenta: 8330628-0 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :  
Navarro Gómez Gerardo y Vega Contreras Margarita.

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .

"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Julio de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

VOCAL M. en C. Luisa Martínez Aguilar

SECRETARIO Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza

PRIMER SUPLENTE Dr. Francisco López Mejía

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Lidia Rangel Trujano



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AVENIDA DE  
MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN  
SECRETARIA ACADEMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES



ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLAN  
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:  
Efecto de la Ropitoina sobre el infarto miocárdico inducido mediante la ligadura coronaria experimental en la rata. "Estudio Tisular y Ultraestructural".

que presenta la pasante: Margarita Vega Contreras  
con número de cuenta: 8754163-0 para obtener el TITULO de:  
Química Farmacéutica Bióloga ; en colaboración con :-  
Navarro Gómez Gerardo y Rodríguez Martínez Leticia

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Julio de 1994

PRESIDENTE Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda  
VOCAL H. en C. Luisa Martínez Agullar  
SECRETARIO Q.F.B. Ma. Eugenia R. Posada Galarza  
PRIMER SUPLENTE Dr. Francisco López Mejía  
SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Lidia Rangel Trujano



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN  
SECRETARÍA ACADÉMICA  
UNIDAD DE LA ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS  
SUPERIORES CUAUTITLÁN



Departamento de  
Exámenes Profesionales

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

DR. JAIME KELLER TORRES  
DIRECTOR DE LA FES-CUAUTITLÁN  
P R E S E N T E .

AT'N: ING. RAFAEL RODRIGUEZ CEBALLOS  
Jefe del Departamento de Exámenes  
Profesionales de la F.E.S. - C.

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS TITULADA:

"Efecto de la Ropitoina sobre el infarto miocárdico inducido mediante la  
ligadura coronaria experimental en la rata. "Estudio risular y  
Ultraestructural".

que presenta el pasante: Gerardo Navarro Gómez  
con número de cuenta: 8406922-9 para obtener el TITULO de:  
Químico Farmacéutico Biólogo ; en colaboración con :  
Rodríguez Martínez Leticia y Vega Contreras Margarita

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

A T E N T A M E N T E .  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 11 de Julio de 1964

PRESIDENTE Q.F.B. Ma. Esther Revuelta Miranda

VOCAL H. en C. Luisa Martínez Aguilar

SECRETARIO Q.F.B. Ma. Eugenia Posada Galarza

PRIMER SUPLENTE Dr. Francisco López Mejía

SEGUNDO SUPLENTE Q.F.B. Lidia Rangel Trujano

*ESM*  
*L. M. A.*  
*E. P. G.*  
*F. L. M.*  
*L. R. T.*

***"El gran arte de enseñar es exclusivo de aquellos que se comprometen consigo mismo para dar todo a cambio de nada.  
Con gran respeto y admiración agradezco a todos mis PROFESORES quienes se esforzaron día con día para lograr  
su objetivo: ENSEÑARME A APRENDER."***

***A ti MAMA por ser esa maravillosa persona que me dió el ser y a quien DIOS encomendo mi enseñanza.***

***A ti BLANCA por ser para mí el complemento de mi vida.***

***Agradezco a mis HERMANOS por su apoyo y comprensión para que yo pudiera concluir esta etapa de mi vida.***

***Agradezco a mi FAMILIA y AMIGOS que hayan compartido conmigo triunfos y fracasos.***

**GERARDO**

*La parte mas dificil e importante, de este trabajo es aquella en la tenemos el pretexto para mencionar a la gente que ha estado ahí siempre que la necesitamos y que estará cuando la necesitemos. Agradesco a todos los que en cada momento dificil de mi vida han estado a mi lado y a todos con los que he compartido la felicidad de existir.*

*A ti Mamá por los esfuerzos, el cariño, la confianza, el valor, el apoyo y la vida. A ti Papá por que crees en mi. A Nacho, Arturo, Dani, Agustín y Mis sobrinos por compartir nuestra familia a Edi, Jai, Beti, Claus y Ale por aguantarme y quererme siempre y por que con ustedes lo he tenido todo.*

*A los amigos de cada una de las etapas de mi vida con los que he disfrutado tanto que no cambiaría casi nada si las volviera a vivir.*

*A todos mis maestros sobre todo los que se han comprometido con su profesión y que han logrado enseñarme a aprender.*

LETICIA

**DE LA FES-C**

**A Mis Asesores de Tesis:**

**Dir. Luisa Aguilar, Jorge Torres, Sofía Gonzales, Eliseo Hernandez B.**

**Del Laboratorio de Microscopía : Al Señor Rodolfo.**

**A Mis Amigas y Amigos:**

**Gaby, Margara, Elvia, Rocío, Edith, Gaby, Jova, Dulce, Andres, Quique,  
Luis, Abelardo, Julio, Hector, Rich, Rafa, al 1152 de los primeros tiempos  
y al resto de la mejor generación la " 14<sup>ma</sup> de QFB "**

**Y finalmente**

**A todas las personas que se han cruzado en mi vida y que han influido en mi  
para ser lo que soy.**

**GRACIAS  
M A R G A R I T A**

AGRADECIMIENTOS

A MIS PADRES:

OFELIA CONTRERAS LANZAGORTA  
ROBERTO VEGA MORENO

A MIS HERMANOS:

ALEJANDRA VEGA CONTRERAS  
ROBERTO VEGA CONTRERAS  
FELIX VEGA CONTRERAS  
MIGUEL A. VEGA CONTRERAS  
MA. ELENA VEGA CONTRERAS  
VERONICA VEGA CONTRERAS  
LUIS VEGA CONTRERAS

A MIS TIOS:

FRANCISCO CONTRERAS LANZAGORTA  
G. VALENTINA CONTRERAS LANZAGORTA

A MIS AMIGOS:

ROBERTO CARLOS GONZALEZ CORTES  
ROBERTO ROMERO OSNAYA  
ISABEL CONTRERAS GUTIERREZ  
JOSE REYES GUERRERO O.  
LETICIA RODRIGUEZ MARTINEZ

SIN CUYA AMISTAD, COMPRENSION Y ALIENTO NO HUBIERA  
LOGRADO TERMINAR MI CARRERA.

LOS QUIERE MARGARA

DEDICADO

A LA MEMORIA DE MI ABUELO LUIS VEGA MARTINEZ.

A JORGE ROJAS AGUIRRE, POR SU APOYO, AMOR Y COMPRENSION.  
GRACIAS JORGE POR TODO LO QUE HAS QUERIDO COMPARTIR CONMIGO.

A RICARDO Y ALEJANDRO DANIEL GONZALEZ VEGA.

A SIMON, POR SU ADMIRABLE AMISTAD Y POR SU GRAN  
SABIDURIA ANTE LO EXTRAÑO DE ESTE MUNDO.

CON MUCHO CARIÑO SIMON

G R A C I A S M A R G A R I T A

## INDICE

<b>1. RESUMEN</b> .....	5
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	7
<b>3. INTRODUCCION</b>	
<b>3.1 LA ENFERMEDAD MIOCARDICA</b>	
3.1.1 Infarto al miocardio .....	8
3.1.2 Incidencia .....	8
3.1.3 Prevalencia y Mortalidad .....	9
<b>3.2 ANATOMIA Y FISILOGIA NORMAL DEL CORAZON</b>	
3.2.1 Generalidades del Sistema circulatorio .....	10
3.2.2 El músculo cardíaco .....	12
3.2.3 La mitocondria, organelo formador de energía .....	17
3.2.4 Sistema de Conducción .....	19
3.2.5 Propiedades del Músculo Cardíaco .....	21
3.2.6 Interacción Actina-Miosina en la contracción muscular .....	23
3.2.7 Acoplamiento Excitación-Constracción .....	25
3.2.8 Los cinco subsistemas Cardíacos .....	26
<b>3.3 PATOLOGIA DEL INFARTO MIOCARDICO</b>	
3.3.1 Causas .....	29
3.3.2 Síntomas, Signos y Diagnóstico del Infarto .....	32
<b>3.4 TRATAMIENTO DURANTE EL INFARTO MIOCARDICO</b>	
3.4.1 Generalidades y Tipos de Fármacos .....	36

<b>3.5 ANTIARRITMICOS</b>	
3.5.1 Generalidades y Mecanismo de acción . . . . .	37
3.5.2 Clasificación de Antiarrítmicos . . . . .	39
3.5.3 ROPITOINA . . . . .	40
3.5.4 DFH . . . . .	43
<b>4. ANTECEDENTES DE LA EXPERIMENTACION . . . . .</b>	<b>44</b>
<b>5. DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	
5.1 MATERIAL Y REACTIVOS . . . . .	46
5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL . . . . .	47
5.3 METODOLOGIA . . . . .	49
<b>6. RESULTADOS</b>	
<b>6.1 MICROSCOPIA OPTICA</b>	
6.1.1 Aspectos Cualitativos . . . . .	54
<b>6.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA</b>	
6.2.1 Aspectos Cualitativos . . . . .	72
6.2.2 Aspectos Cuantitativos . . . . .	91

**7. DISCUSION COMPARACION E INTEGRACION DE RESULTADOS****DE MO Y MET**

<b>7.1 ASPECTOS CUALITATIVOS</b> .....	<b>100</b>
<b>7.2 ASPECTOS CUANTITATIVOS</b> .....	<b>103</b>

**8. CONCLUSIONES**

<b>APENDICE I: TECNICA DE PERFUSION DEL CORAZON "IN SITU"</b> ...	<b>109</b>
---	------------

<b>APENDICE II: TECNICAS DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MET</b>	
--	--

1) Fijación y Postfijación .....	113
2) Deshidratación .....	115
3) Inclusión .....	116

<b>APENDICE III: TECNICAS DE OBTENCION DE CORTE FINO</b> .....	<b>121</b>
--	------------

<b>APENDICE IV: TECNICA DE TINCION DOBLE ELECTROCONDUCTIVA</b>	<b>132</b>
--	------------

<b>APENDICE V: PREPARACION DE SOLUCIONES</b> .....	<b>134</b>
--	------------

<b>APENDICE VI: MANEJO DE DATOS DE TAMAÑO EN FOTO A TAMAÑO REAL</b> .....	<b>136</b>
---	------------

<b>INDICE DE FIGURAS</b> .....	<b>137</b>
--------------------------------	------------

<b>INDICE DE FOTOS</b> .....	<b>138</b>
------------------------------	------------

<b>INDICE DE MICROGRAFIAS</b> .....	<b>138</b>
-------------------------------------	------------

<b>INDICE DE TABLAS</b> .....	<b>139</b>
-------------------------------	------------

<b>INDICE DE GRAFICOS</b> .....	<b>139</b>
---------------------------------	------------

<b>9.REFERENCIAS</b> .....	<b>140</b>
----------------------------	------------

"EFECTO DE LA ROPITOLINA  
SOBRE EL INFARTO MIOCARDICO  
INDUCIDO MEDIANTE LA LIGADURA  
CORONARIA EXPERIMENTAL  
EN LA RATA"  
"ESTUDIO TISULAR Y  
ULTRAESTRUCTURAL"

## 1 . RESUMEN

Se ha demostrado que la Ropitofna (nuevo antiarrítmico), evita la extensión del infarto en el modelo de oclusión coronaria en la rata. Con la finalidad de conocer aún mas sobre el mecanismo de acción de este compuesto , en este trabajo se analizan los efectos de la Ropitofna a nivel tisular y ultraestructural.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 8 semanas y de 250-300 g de peso. Se distribuyeron en tres grupos, el primero: grupo control sano (sin oclusión); el segundo grupo: con administración del vehículo (propilenglicol al 50%) y oclusión; el tercero: administrado con Ropitofna (1mg/kg/0.1 ml de propilenglicol al 50%) y oclusión. Tanto el vehículo como el fármaco fueron administrados 30 minutos antes de la oclusión coronaria. Después de 4 horas de oclusión fueron sacrificados los animales fijándose el corazón "in situ" por perfusión, posteriormente se obtuvieron muestras de ápice y se procesaron siguiendo técnicas convencionales de microscopía óptica y microscopía electrónica de transmisión.

A nivel de MO se determinó cualitativamente la presencia de alteraciones, las cuales, son: adelgazamiento, despolimerización, ondulamiento y necrosis coagulativa en fibras cardíacas. Presencia de hemorragia, congestión, edema y espacio intercelular aumentado. Infiltración leucocitaria especialmente macrófagos y aumento del tejido conjuntivo y característicamente la presencia de fibroblastos. Mediante éste primer análisis se determinó que la estructura miofásica es útil para calificar el daño cardíaco.

A nivel de MET se obtuvieron resultados cualitativos y cuantitativos. Comparando el grupo 1 con el grupo 2 se observó cualitativamente: aumento en el espacio subsarcolémico, desprendimiento de la membrana miofásica, migración de la cromatina nuclear hacia la periferia, desarreglo de los sarcómeros, despolimerización de miofibrillas, aumento en tamaño

y cantidad de mitocondrias así como daño en diversos grados hasta llegar a la lisis mitocondrial; al comparar el grupo 1 con el 3 se observaron las mismas alteraciones estructurales pero en menor grado que en el grupo 2.

Cuantitativamente se encontró diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el número de mitocondrias presentes en el grupo 1, 2 y 3; siendo la cantidad de mitocondrias en  $1 > 2$  y  $2 < 3$ .

Hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el porcentaje de daño mitocondrial entre los tres grupos, siendo en  $1 < 2$  y  $2 > 3$ .

No hay diferencia significativa ( $P < 0.05$ ) en el tamaño de las mitocondrias normales y dañadas de los tres grupos.

Para los tres grupos no hay diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) en el diámetro mitocondrial (mitocondrias normales) ni en el tamaño del sarcómero.

Con estos resultados, podemos decir que la Ropitóna presenta efectos benéficos sobre los miocitos por la oclusión coronaria experimental y especialmente en la integridad de la estructura mitocondrial.

## **2 . OBJETIVOS**

**1.- CARACTERIZAR LA FORMA Y ESTRUCTURA NORMALES DEL TEJIDO CARDIACO DE RATA MEDIANTE TECNICAS DE MICROSCOPIA OPTICA (MO) Y A NIVEL ULTRAESTRUCTURAL MEDIANTE TECNICAS DE MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION (MET).**

**2.- DETERMINAR LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES QUE SE PRESENTAN AL INDUCIR EL INFARTO MIOCARDICO MEDIANTE LA OCLUSION DE LA RAMA DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA DE LA ARTERIA CORONARIA EN LA RATA.**

**3.- ELEGIR PARAMETROS ULTRAESTRUCTURALES UTILES PARA CUANTIFICAR EL DAÑO DEBIDO A LA OCLUSION CORONARIA EN EL MODELO EXPERIMENTAL PROBADO.**

**4.- DETERMINAR MEDIANTE UN ANALISIS POR MO Y MET EL EFECTO DE LA ROPITOINA SOBRE EL INFARTO MIOCARDICO INDUCIDO EXPERIMENTALMENTE EN LA RATA.**

### **3 . INTRODUCCION**

#### **3.1 LA ENFERMEDAD MIOCARDICA.**

##### **3.1.1 INFARTO AL MIOCARDIO**

La enfermedad isquémica es aquella en la que el aporte de oxígeno está disminuido por un riego sanguíneo insuficiente, si el volumen de sangre que llega al miocárdio, aunque este disminuido, es suficiente para cubrir las demandas tisulares, la enfermedad es de curso clínico silencioso, y sólo aparecen manifestaciones clínicas cuando el aporte es insuficiente o cuando por cualquier causa (taquicardia, ejercicio, etc.), se produce un aumento de los requerimientos tisulares de oxígeno que la arteria coronaria no puede satisfacer por incapacidad de aumentar el flujo de sangre que la atraviesa. En estas condiciones aparecen síntomas, habitualmente el dolor precordial, que tiene la característica de ser fugaz y aparecer sólo en condiciones de esfuerzo para desaparecer en reposo, cuando se alivia el exceso de demanda de oxígeno. Si el déficit de oxígeno se prolonga excesivamente, ya sea por que la arteria sufrió un proceso de trombosis que ocluyó por completo su luz, o por el exagerado aumento de trabajo cardíaco, la zona miocárdica anóxica experimenta un proceso degenerativo irreparable conocido como infarto miocárdico(40).

##### **3.1.2 INCIDENCIA.**

Los estudios realizados en sujetos con enfermedad coronaria aterosclerosa, han permitido reconocer ciertos factores de riesgo que combinados favorecen el desarrollo de la arteroesclerosis. Los factores que predisponen de alguna manera la instalación de la enfermedad coronaria son: hiperlipidemia, hipertensión arterial sistémica, Diabetes mellitus,

embolias y factores relacionados con hábitos, como por ejemplo la vida sedentaria, la tensión emocional, el tabaquismo (24,83) el alcoholismo (18,77,81) la adicción a cocaína (9,23) y marihuana (14), el uso de anticonceptivos orales (70,71), la edad (74,75), sexo (79,81), obesidad, ocupación (18,79) y herencia (28,30).

La mayoría de estos factores constituyen situaciones características de la forma de vida de las grandes ciudades, por lo que son individuos que residen en los grandes circuitos urbanos, quienes manifiestan la mayor cantidad y severidad de los problemas consecuentes a la aterosclerosis (8,24).

### 3.1.3 PREVALENCIA Y MORTALIDAD

En los últimos años, las enfermedades del corazón han representado el foco de atención de muchas investigaciones, ya que, el tipo de enfermedades isquémicas son un grave problema de salud tanto en los países industrializados como en aquellos que no lo son, incluyendo a México.

En los países desarrollados el infarto agudo al miocardio es la causa más frecuente de mortalidad, ya que en un 30 a 50% de los pacientes que fallecen por esta enfermedad los decesos suelen presentarse durante las primeras 24 a 48 horas después de la presentación del infarto (10). De las arritmias ventriculares presentes postoclusión la más grave es la fibrilación ventricular y ésta es la que a menudo conduce a la muerte. En más del 75% de los casos la arritmia ventricular es la responsable del paro cardíaco y muerte súbita (79).

Se ha encontrado que la muerte cardíaca súbita es la causa más común de muerte en hombres americanos entre 20 y 64 años de edad y una causa importante de mortalidad en personas de todas edades (79).

Por lo anterior, el estudio de la enfermedad cardíaca es de gran importancia y requiere del conocimiento morfofuncional del sistema circulatorio y especialmente del corazón como órgano central del mismo.

## 3.2 ANATOMIA Y FISIOLOGIA NORMAL DEL CORAZON.

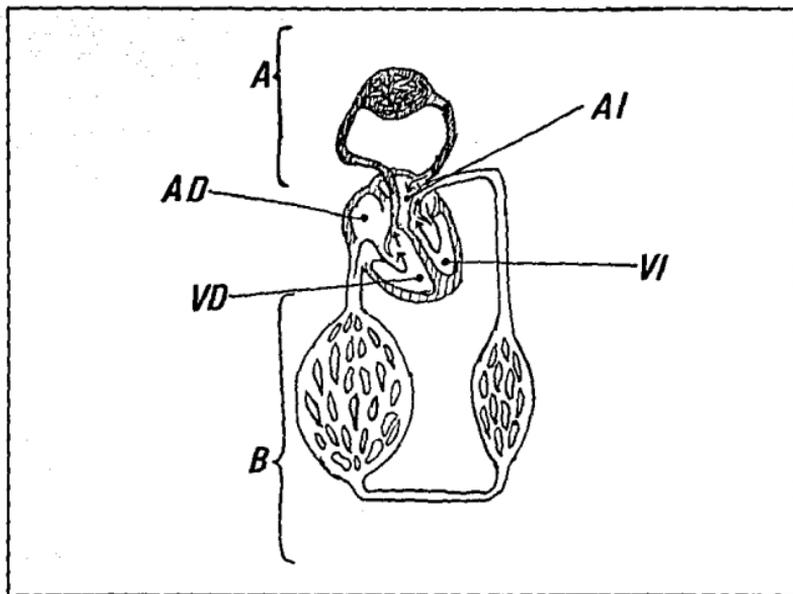
### **3.2.1 GENERALIDADES DEL SISTEMA CIRCULATORIO**

Fundamentalmente, el aparato circulatorio constituye un sistema de transporte e intercambio. Los vasos sanguíneos de gran calibre del circuito proporcionan las vías de distribución y recolección de los materiales transportados por la sangre. El corazón proporciona la energía para movilizar la sangre por el circuito, y en los diferentes órganos se produce el intercambio de oxígeno, dióxido de carbono y otros metabolitos a través de las paredes de los capilares (91).

El corazón es un órgano muscular hueco, que al contraerse y relajarse rítmicamente, funciona como bomba, y asegura el movimiento de la sangre por los vasos sanguíneos (arterias, arteriolas, capilares, vénulas y venas).

Está constituido por un tipo especial de músculo, denominado estriado cardíaco involuntario, éste, es una red de fibras (células) anastomosadas, formando un sincitio. Está constituido por 4 cavidades: dos auriculares y dos ventriculares. La aurícula derecha, que recibe la sangre de las venas cavas, se comunica con el ventrículo derecho por la válvula tricúspide; a su vez el ventrículo derecho está en comunicación con la circulación pulmonar. La aurícula izquierda, que recibe la sangre a través de las venas pulmonares, se comunica con el ventrículo izquierdo mediante la válvula mitral (bicúspide).

El ventrículo izquierdo está en comunicación con la circulación general mediante la aorta, de esta manera en el organismo existen dos circuitos importantes y separadas, vinculadas en serie, de modo tal que la sangre pasa por todo el cuerpo y luego a los pulmones, constituyendo esto la llamada circulación mayor y menor respectivamente (Fig.1) (93).



**Fig. 1:** Sistema circulatorio. La sangre procedente de los tejidos del organismo, entra en la aurícula derecha (AD) y de aquí pasa al ventrículo derecho (VD), desde donde es impulsada a los pulmones, en ellos se efectúa el intercambio de gases para oxigenarse. La sangre procedente de los pulmones, llega a la aurícula izquierda y pasa al ventrículo izquierdo (circulación menor A) Del ventrículo izquierdo (VI) es impulsada a través de la aorta a todos los órganos del cuerpo y de ahí vuelve al corazón (Circulación mayor B). Modif. 93.

### 3.2.2 EL MUSCULO CARDIACO

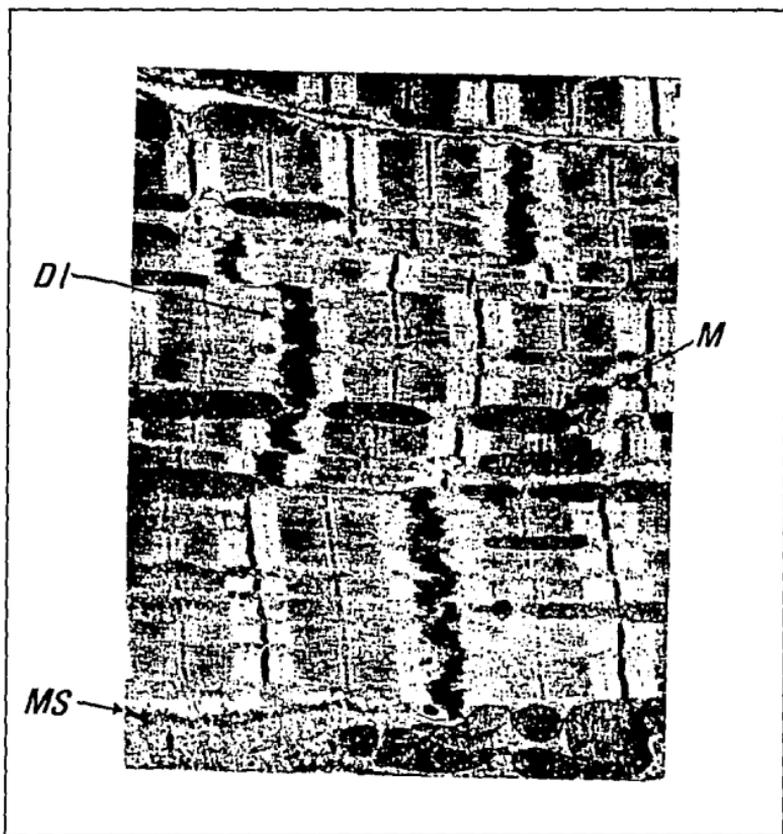
El músculo cardíaco está formado por tres tipos celulares, las fibras musculares o miocitos y los miocardiocitos conducentes, denominado tejido especializado (93) y las células nodales. Las características tisulares del músculo cardíaco son claras aún a nivel de microscopía óptica. En la foto 1, se puede observar la disposición clásica de las fibras musculares en forma de red, también existen zonas sombreadas que limitan a las fibras formando líneas angulares que reciben el nombre de discos intercalares, los cuales, son, especializaciones de las membranas plasmáticas que separan a las células musculares cardíacas conectándolas entre sí, a través de estas estructuras los iones fluyen con mayor facilidad que en las membranas externas de manera que los potenciales de acción pasan de un miocito a otro a través de los discos intercalares sin dificultad por lo que el músculo cardíaco es un sincitio, en el cual el potencial de acción se difunde a todas las células a través de estas interconexiones en forma de red (88).

Las fibras musculares desarrollan el trabajo mecánico de propulsión, éstas poseen un citoplasma diferenciado por completo (ver micrografía 1), el cual está constituido por largas miofibrillas caracterizadas por una estriación transversal, entre ellas se encuentran dispuestas paralelamente abundantes mitocondrias, lo cual está determinado por la gran necesidad de ATP requerido para la contracción (37,101).

En el sarcoplasma (sustancia en la que están contenidos dentro de la fibra muscular las miofibrillas y organelos), se observa el retículo sarcoplásmico liso que presenta una organización especial de gran importancia para la realización de la contracción muscular. Otra característica importante, es la presencia de núcleos de forma oval con un carioplasma denso en el cual está presente cromatina dispersa lo que denota una actividad celular intensa (95).



*Foto 1 | Corte longitudinal de músculo cardíaco. El núcleo (N) se encuentra en posición paracentral en las fibras, las cuales presentan estrias transversales. Algunas miofibrillas se separan al aproximarse al núcleo por lo cual dejan una región cónica de sarcoplasma en cada polo nuclear. Las uniones celulares tipo disco intercalar (DI) se denotan por zonas densas en forma escalonada que se extienden a través de los límites de las fibras, generalmente a la altura de la línea Z. (H&E) X 1,200. Tomada de 97 pp 273.*



*Micrografía 1 | Corte longitudinal de músculo cardíaco, se muestra la disposición de las miofibrillas que dan el aspecto estriado a este tejido, la disposición de las mitocondrias (M) es paralela a las fibras, los discos intercalares (DI) y membrana sarcoplásmica (MS). X 12,000. Tomada de 92 pp 295.*

A nivel ultraestructural, ha sido posible observar que cada fibrilla está envuelta por un complejo sistema canalicular perteneciente al retículo sarcoplásmico, que se ha diferenciado con el fin de responder tanto a las exigencias tróficas de las miofibrillas, como a la necesidad de conducir y propagar rápidamente el impulso eléctrico en el interior de la fibra. El retículo sarcoplásmico está constituido por una serie de cavidades tubulares o laminares rodeadas por una membrana, cuyo aspecto se repite periódicamente, en relación a la estriación periódica de las miofibrillas uniéndose mediante tubulos (T) a la línea z.

Cada miofibrilla tiene un diámetro aproximado de 1 micra, y la misma longitud de la fibra muscular. Se observa también la membrana celular llamada sarcolema. La estriación del músculo cardíaco está determinada por las miofibrillas que contienen filamentos de actina y miosina, éstos se intercalan a manera de interdigitaciones y por lo tanto, las miofibrillas debido a un fenómeno óptico presentan bandas alternas claras y oscuras (ver Fig. 2). La porción de una miofibrilla situada entre dos líneas sucesivas se llama sarcómero y tiene una longitud aproximadamente de 2 micras en reposo (67,90,98).

La representación del complejo sistema celular del tejido cardíaco se observa en la Fig.2.

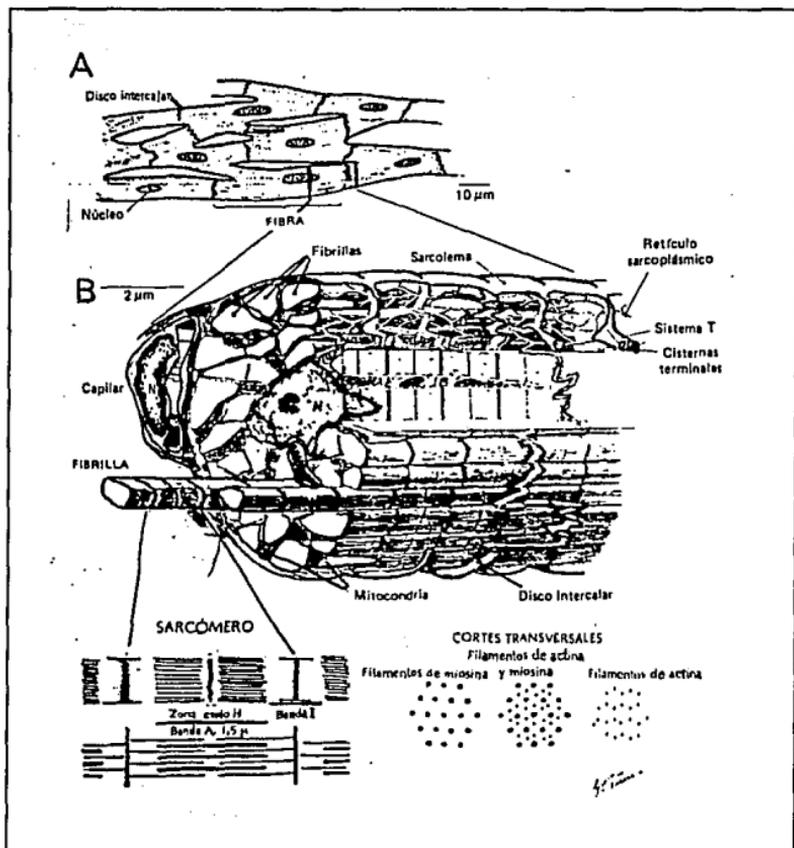


Fig 2: Diagrama del músculo cardíaco como se observa a) con microscopio óptico (MO) y b) con microscopio electrónico de transmisión (MET). Modif. de 94 pp 62.

### 3.2.3 LA MITOCONDRIA, ORGANELO FORMADOR DE ENERGIA

Fundamentalmente, una mitocondria consiste en un organelo de doble membrana, y estas dos membranas definen dos espacios, el intermembranario y el de la matriz. La membrana externa es generalmente lisa, aunque micrograffas electrónicas de muy alta resolución sugieren la presencia de fosas y poros de 25 a 30 amstrongs de diámetro. La membrana interna que tiende a seguir el contorno de la membrana externa en algunos lugares se invagina para formar las crestas mitocondriales (37,101).

Los espacios entre las membranas y las crestas parecen no tener alguna estructura, con pocas o ninguna inclusión granular. La membrana interna y sus invaginaciones rodean el espacio de la matriz, que generalmente tiene aspecto granular. Aunque la naturaleza de los gránulos no está claramente establecida, es posible que sean sitios de depósito de calcio. Hay alguna evidencia de que la liberación de grandes cantidades de calcio por las mitocondrias, pueda ser un mecanismo regulador importante para el metabolismo celular (37,101).

Otros elementos importantes de la matriz mitocondrial son los ribosomas y se encuentran estrechamente asociados con la superficie de la membrana interna. La matriz también contiene DNA, que, por lo común está adherido a la membrana interna en un pequeño número de puntos (101).

En la membrana interna de las mitocondrias, se sintetizan enzimas importantes tanto del ciclo del citrato como, de la cadena respiratoria y de la fosforilación oxidativa (formación de ATP con consumo de oxígeno). Desempeñan un papel esencial y central para muchas vías metabólicas incluyendo la desintegración y síntesis de carbohidrato, grasas y aminoácidos (33,101).

Los primeros citólogos observaron la división de algunas células que sólo contenían dos o tres mitocondrias. Observaron que podrían surgir mitocondrias nuevas de la división de las preexistentes. Observaciones similares se han efectuado en fechas recientes empleando algas para el estudio con microscopía electrónica (26).

Existen otras evidencias que sugieren la división mitocondrial aún en el interior de células que no se están dividiendo (101).

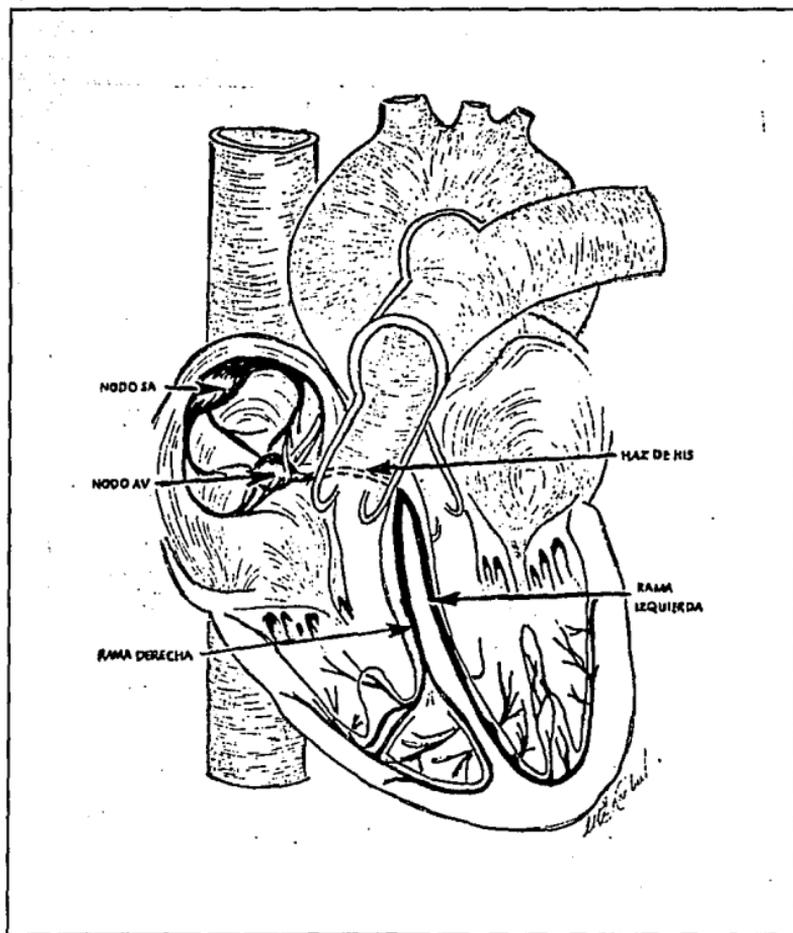
Las variaciones en la forma de las mitocondrias expresa también la pluralidad en sus funciones, según el tipo y el estado celular son: esféricas, basiliformes, filamentosas o ramificadas. En relación con los procesos de transporte (en especial la acumulación de iones), pueden hincharse o arrugarse. Mitocondrias aisladas adoptan la configuración ortodoxa cuando el medio se vacía de ADP, de manera que se interrumpen la fosforilación y la respiración acoplada. Si se añade ADP, vuelven a producir respiración y fosforilación, y la mitocondria muestra la configuración condensada. Algunos investigadores sospechan que el estado normal de las mitocondrias se halla entre estos extremos, y que las mitocondrias frecuentemente aparecen en la configuración ortodoxa en el microscopio electrónico debido a inactivación del metabolismo durante la fijación de las células para examen microscópico (micrografía 2 tomada de 104).



*Micrografía 2: Conformación mitocondrial ortodoxa, probablemente debida al tratamiento del tejido para MET. Tomada de 104*

### 3.2.4 SISTEMA DE CONDUCCION (103)

Son estructuras específicas, constituidas por grandes fibras con escasas miofibrillas periféricas, sarcoplasma abundante y núcleo central, tiene la función de generar impulsos rítmicos y de transmitir estos impulsos. Este presenta algunas masas anatómicamente diferenciadas: a) Nódulo sinusal, denominado marcapaso del corazón, b) Nódulo auriculoventricular, c) Fascículo de His, éste se divide en las ramas derecha e izquierda, las cuales acaban en la red de Purkinje, que representa la última terminación de las ramas del fascículo. Esta red une al sistema de conducción con las miofibrillas ventriculares (Fig.3).



**Fig 3:** Esquema del marcapaso eléctrico y el sistema de conducción del corazón. Nodo sinoauricular (SA) y nodo auriculoventricular (AV). Tomado de 103 pp 143.

### 3.2.5 PROPIEDADES DEL MUSCULO CARDIACO

#### 1) Automatismo o Propiedad cronotrópica

Esta es denominada ritmicidad, es la facultad del corazón para iniciar su propio impulso. Normalmente dicho impulso nace en el nodo sinoauricular (ver Fig.3).

#### 2) Excitabilidad o Propiedad Batmotrópica

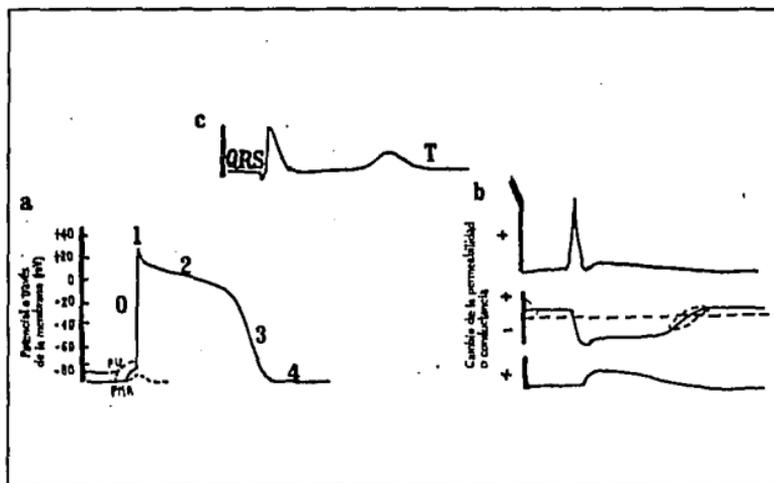
Esta propiedad es también llamada irritabilidad, es la facultad del corazón de responder a un estímulo y tiene varias características: a) periodo refractario efectivo o funcional (PRE). Se designa así al tiempo requerido para que el miocardio se restablezca lo suficiente para responder y transmitir una onda propagada a una distancia medible; b)Potencial de acción, es un potencial transmembrana o de membrana que puede registrarse colocando un microelectrodo dentro de una fibra cardíaca y otro fuera de ella.

Durante la diástole el interior de la célula miocárdica es negativo con respecto al exterior (90 mv) y se dice que la membrana está polarizada; esta diferencia de potencial se denomina potencial de reposo. Cuando se estimula la célula (excitación) se produce el potencial de acción que comprende 5 fases (Fig.4a). Estos cambios de potencial se deben a movimientos iónicos ( $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ) a través de la membrana celular (Fig. 4b).

#### 3) Conductibilidad o Propiedad Dromotrópica.

Esta propiedad es la facultad del miocardio de transmitir el impulso. Normalmente dicho impulso u onda de excitación nace en el nodo sinoauricular, se propaga rápidamente a las aurículas y a los haces internodales, llega al nodo auriculoventricular donde pasa con lentitud, recorre entonces el haz de His con suma rapidez, sus ramas y la red de Purkinje para

propagarse finalmente a la musculatura de los ventrículos (ver fig.3). El impulso u onda de excitación, durante su propagación, se acompaña de variaciones eléctricas como se ha mencionado, éstas pueden registrarse a través de la piel por medio de electrodos, y dicho trazado constituye el Electrocardiograma (ECG) normal. Por lo tanto, el ECG es la manifestación en la superficie del cuerpo de las ondas de despolarización y repolarización del corazón (Fig.4c) (91).



**Fig 4:** a) Fases del potencial de acción en la célula cardíaca. b) Movimientos de  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  que provocan cambios en los potenciales de membrana durante la excitación celular. Abrev. PU, potencial umbral. PRM, Potencial de membrana en reposo. c) Electrocardiograma (ECG) de superficie. Modif. de 91.

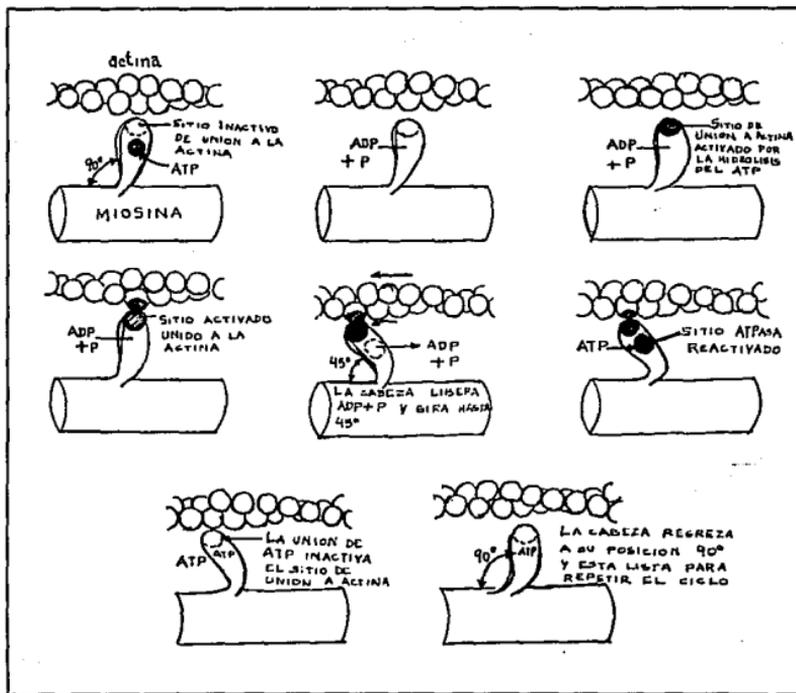
#### **4) Contractibilidad o Propiedad Inotrópica**

Esta propiedad es la facultad del miocardio de responder a un estímulo contrayéndose, o sea, desarrollando una fuerza o tensión. La fuerza de contracción o tensión de los miocitos está sometida a la Ley del corazón de Starling que establece dentro de ciertos límites, cuanto mayor sea la longitud inicial de las citadas fibras y al final de la diástole, mayor será la fuerza de contracción, mas allá de dicho límite (límite fisiológico), las fibras están sobredistendidas y la fuerza de contracción disminuye. A diferencia del músculo esquelético, en el corazón, siempre hay una contracción máxima, es decir, según la ley del todo o nada. El músculo cardíaco se comporta de este modo a causa de la continuidad morfofuncional existente entre todas las fibras musculares. La capacidad de contracción se debe al arreglo específico de las proteínas constituyentes de las miofibrillas.

### **3.2.6 INTERACCION ACTINA MIOSINA DURANTE LA CONTRACCION MUSCULAR**

Durante la contracción muscular los filamentos delgados de actina se deslizan progresivamente sobre los filamentos gruesos de miosina, provocando la contracción de los sarcómeros del músculo. De acuerdo con Huxley las cabezas de miosina se unen a los filamentos delgados, recorren una corta distancia y provocan un movimiento.

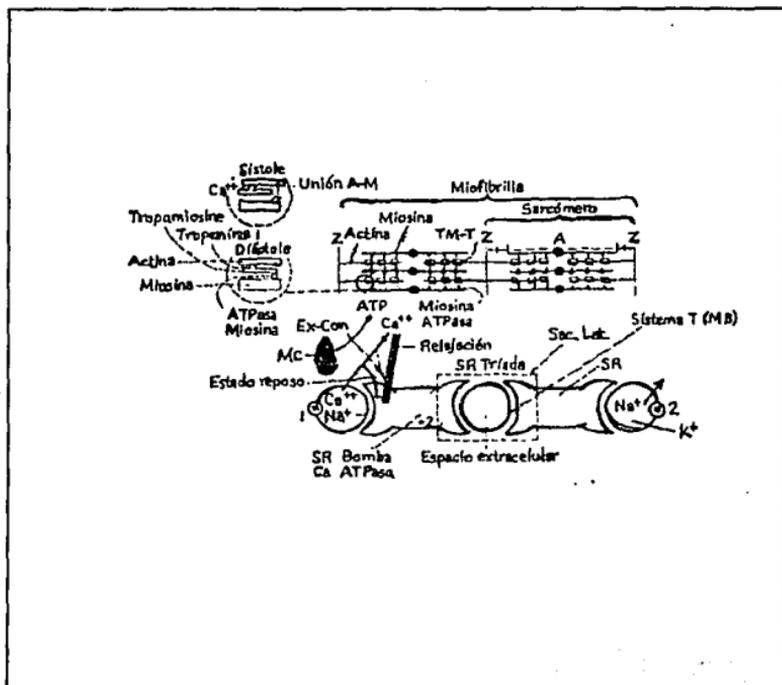
Este proceso de unión-liberación es repetido rápida y continuamente provocando un continuo deslizamiento entre los filamentos de las miofibrillas. En 1970 R.W. Lyman y Edwin W. Taylor propusieron el modelo que explica lo anterior y que esta representado en la figura 5 (97).



**Fig 5:** Modelo del mecanismo de deslizamiento entre los miofilamentos de actina y miosina para llevar a cabo la contracción muscular según Lyman y Taylor 1970. La fuerza contráctil es generada por un ciclo de inserción, desinserción y reinserción de las cabezas de miosina, lo cual hace que los filamentos se deslicen uno sobre otro. Este proceso requiere energía que proviene de la degradación de ATP en ADP y fosfato, en el cual cada cabeza de miosina tiene un sitio activo que actúa como adenosintrifosfatasa. Durante la relajación, las cabezas de miosina se despegan de los filamentos de actina y los dos conjuntos de filamentos se deslizan a la posición inicial (89). Tomada de 97.

### 3.2.7 ACOPLAMIENTO EXCITACION-CONTRACCION

Basado en estudios efectuados con el microscopio electrónico y el uso de iones fisiológicos radioactivos "in vitro" con las proteínas contráctiles y moduladoras se ha llegado a la formulación de la explicación bioquímica del acoplamiento excitación-contracción cardíaca. Esta se esquematiza en la Figura 6 (103).



**Fig 6:** Acoplamiento de los procesos de excitación y contracción cardíaca. MC, mitocondria; TM-T, tropomiosina y troponina; Sac Lat, saco lateral; A-M, actina y miosina; SR, retículo sarcoplásmico. Tomada de 103.

### 3.2.8 LOS CINCO SUBSISTEMAS CARDIACOS (103)

Se puede considerar al corazón como un órgano compuesto por cinco subsistemas, por tanto los fármacos cardioactivos y diversos procesos patológicos afectan a cada uno de los sistemas de modo relativamente diferente.

#### 1) El marcapaso eléctrico

Como se muestra en la Figura 3, el marcapaso de autodescarga del corazón (nodo sinoauricular), está situado en la aurícula derecha; el impulso eléctrico que genera se propaga a las dos aurículas, que son estimuladas a contraerse y luego a un sistema de conducción especializado, compuesto por el nodo auriculoventricular que retarda el impulso; éste se desplaza por un sistema de conducción rápida (ramas del haz de His) hacia los dos ventrículos haciendo que éstos se contraigan.

El marcapaso y las estructuras especializadas de conducción están regidos por la innervación intrínseca del corazón (sistema autónomo) que controla la frecuencia cardíaca y la velocidad con que son conducidos los impulsos por el sistema especializado.

El marcapaso se caracteriza por poseer un potencial de membrana inestable. En lugar de tener un valor sostenido entre los impulsos, el potencial de membrana disminuye continuamente después de cada potencial de acción hasta que alcanza el valor de descarga y dispara otro potencial de acción (94).

#### 2) El músculo cardíaco

El músculo del corazón (miocardio), está compuesto por fibras musculares columnares alargadas ramificadas e interconectadas (Micrografía No.1). Las paredes de las dos aurículas son delgadas, luego, el ventrículo derecho es más grueso en pared muscular y finalmente el ventrículo izquierdo posee mayor grosor y por tanto es el que posee mayor masa, tal diferencia está relacionada con la presión que debe generar cada ventrículo.

### **3) Válvulas Cardiacas**

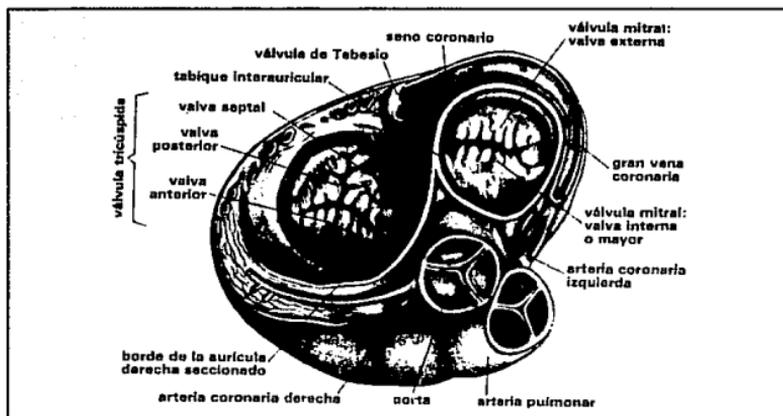
En el corazón existen 4 válvulas unidireccionales, dos de ellas se encuentran entre los ventrículos y las grandes arterias (semilunar aórtica y pulmonar) y dos de ellas entre los ventrículos y las aurículas, denominadas auriculoventriculares (mitral y tricúspide) (Fig 7). Los dos pares de válvulas semilunares y auriculoventriculares actúan en forma alterna, es decir, cuando un par de ellas está abierto el otro se cierra.

### **4) Circulación Coronaria**

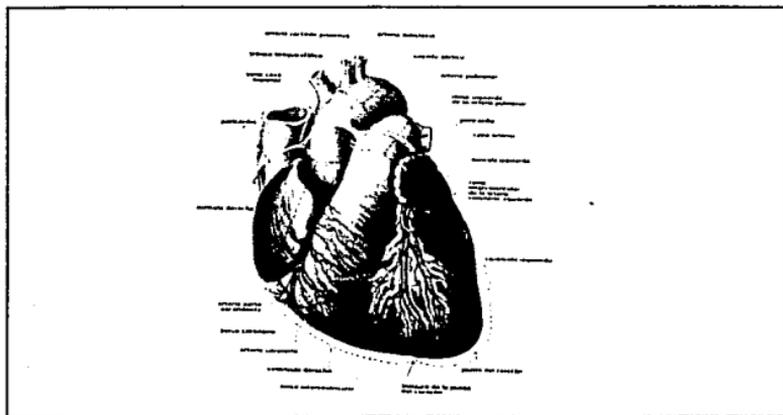
Las arterias coronarias son las primeras ramificaciones de la aorta y el flujo sanguíneo que pasa por éstos vasos, suministra oxígeno y nutrientes al propio corazón (Fig 8).

### **5) Inervación Autónoma del Corazón**

Las fibras nerviosas simpáticas (terminaciones nerviosas adrenérgicas que contienen noradrenalina,) se ramifican en el músculo cardíaco de las aurículas y los ventrículos, así como en el nodo sinusal y la unión auriculoventricular. El estímulo de este sistema acelera el marcapaso eléctrico, facilita la conducción a través del sistema de conducción especializado y aumenta la fuerza de contracción del miocardio. Las fibras parasimpáticas (terminales nerviosas colinérgicas que contienen acetilcolina), se ramifican en el marcapaso, en la unión auriculoventricular y en el músculo de las dos aurículas, la inervación colinérgica de los ventrículos es escasa. El estímulo del parasimpático retarda el marcapaso, demora la conducción a través del sistema de conducción especializado y reduce la fuerza de contracción de las aurículas.



*Fig. 7: Válvulas del corazón. Durante la diástole, las válvulas mitral y tricúspide están abiertas, durante la sístole, las válvulas semilunares aórtica y pulmonar se encuentran abiertas. Tomada de 95.*



*Fig. 8: Circulación coronaria, La arteria coronaria izquierda, se divide en dos ramas la coronaria descendente anterior (interventricular) y la circunfleja. Tomada de 103.*

### **3.3 PATOLOGIA DEL INFARTO MIOCARDICO**

En condiciones normales, podemos decir que la capacidad del organismo para desarrollar un trabajo o un ejercicio depende en última instancia de la posibilidad del aporte de oxígeno a los tejidos, siendo mayor la demanda en estas circunstancias. Uno de los principales mecanismos para cumplir con estas exigencias, es la capacidad del corazón de aumentar su trabajo útil en términos de aumentos del volumen de sangre descargado en los vasos arteriales. A su vez el corazón, debe estar suficientemente provisto de oxígeno y sustancias metabólicas para cumplir eficazmente con las demandas propias.

El mayor aporte de oxígeno a la fibra miocárdica sólo ocurre por el aumento del flujo arterial coronario, por esta razón, es fácil comprender que en el último caso, la tolerancia al ejercicio, la reserva cardíaca y la adaptación del organismo a las condiciones de mayor trabajo dependen de la capacidad para aumentar el flujo coronario y de la integridad de los mecanismos que lo hacen posible. Cuando existe desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno en el músculo cardíaco se dice que existe insuficiencia coronaria (Fig 9)

#### **3.3.1 CAUSAS DEL INFARTO MIOCARDICO (99,100,94)**

La disminución del aporte de oxígeno al miocardio puede deberse a diferentes causas:

- a) Por disminución del flujo sanguíneo al corazón , como sucede en la insuficiencia cardíaca.
- b) Por disminución del volumen de sangre circulante (anemia, colapso o shock).
- c) Por disminución del caudal sanguíneo coronario (lesiones obstructivas coronarias, ciertas enfermedades de las válvulas del corazón, embolia, trombosis coronaria, anomalías congénitas coronarias etc.)
- d) Por disminución de la presión parcial del oxígeno, aunque el flujo sanguíneo sea normal (lo que tiene lugar en la intoxicación por CO<sub>2</sub>, la altura, la asfixia, etc.).



Los procesos ateroscleróticos son los de mayor importancia ya que se caracterizan por un engrosamiento, acompañado de un endurecimiento de la pared arterial. Esta situación provoca una lesión del endotelio lo cual promueve la agregación plaquetaria, la formación de trombos y la calcificación de las mismas. De igual forma la lesión endotelial promueve el depósito de lípidos, especialmente colesterol y calcio, además de una precipitación de fibrina en la capa íntima de la pared arterial.

Los diversos padecimientos que causan de manera directa la obstrucción total o parcial de las arterias coronarias son:

- 1) Hiperlipidemia, especialmente hipercolesterolemia.
- 2) Hipertensión arterial sistémica, la cual lesiona mecánicamente la pared de los vasos, en especial al endotelio además de favorecer la formación de placas ateromatosas principalmente en los sitios de bifurcación de las arterias.
- 3) Diabetes mellitus, la cual causa daño en la microvasculatura.

Otra causa posible de obstrucción coronaria son las embolias.

El aumento de las demandas de oxígeno del músculo cardíaco es el otro factor básico susceptible de conducir a la insuficiencia coronaria, y puede obedecer a causas múltiples:

- a) Por reducción de la eficiencia miocárdica, como acontece, por ejemplo, cuando existe taquicardia de alta frecuencia.
- b) Por aumento del trabajo cardíaco, en forma de un incremento del vigor contráctil (cuando existe hipertensión arterial) o un aumento del volumen minuto cardíaco (hipertiroidismo).

El sitio y la extensión del infarto dependen de la distribución anatómica de los vasos, el sitio de la obstrucción actual y de las oclusiones previas y de la eficiencia de la circulación colateral. El sitio más frecuente de trombosis es en la rama descendente anterior de la coronaria izquierda, dando por resultado infarto de cara anterior de ventrículo izquierdo.

### 3.3.2 SINTOMAS, SIGNOS Y DIAGNOSTICO DEL INFARTO

La isquemia miocárdica causada por la oclusión de una de las ramas de la arteria coronaria, trae consigo múltiples alteraciones enzimáticas, humorales y bioquímicas, que se manifiestan en mas o menos tiempo y que son de utilidad, cuando los signos electrocardiográficos no son muy manifiestos.

Los datos clínicos hemodinámicos se relacionan directamente con la extensión de la necrosis o de la cicatrización del miocardio. En el infarto leve, la hemodinámica puede ser normal. Con enfermedad mas grave, puede haber elevación de la presión ventricular izquierda telediastólica, asociada con el aumento en la presión diastólica en la arteria pulmonar y disminución del gasto cardíaco y también de la fracción de eyección (99).

#### 1) Síntomas

1) Dolor premonitorio, sensación de malestar en tórax semejante al de la indigestión. Puede producir arritmias, hipotensión, choque o insuficiencia cardíaca.

2) Dolor de infarto, puede empezar durante el reposo o con el ejercicio. El dolor es intenso y no cede con el reposo y aumenta en intensidad progresivamente y en ondas en unos cuantos minutos o un poco más. El paciente presenta súbitamente sudoración fría, se siente débil y aprensivo, se mueve buscando una posición que le calme el dolor. Pueden acompañar al cuadro, mareos, síncope, disnea, ortopnea, tos, respiración silbante, náusea y vómito o distensión abdominal.

3) Infarto sin dolor, del 5 al 15 % de los casos ocurren sin dolor, simulando insuficiencia cardíaca aguda, síncope, trombosis cerebral o choque sin causa aparente (100).

## 2) Signos

Los datos físicos son muy variables; la presencia de estertores, ritmo de galope, taquicardia, arritmias, bradicardia e hipotensión, se correlacionan bien con las evidencias clínicas y hemodinámicas de la gravedad del ataque y la extensión del miocardio necrosado.

1) Choque, se le puede describir como un cuadro con presión arterial sistólica menor de 80 mmHg, tez grisácea (cianosis periférica), confusión mental, piel fría y húmeda, disminución del gasto urinario, taquicardia o bradicardia y pulso débil.

2) Efectos cardíacos, frecuentemente hay ritmo de galope, ingurgitación yugular y estertores basales. El edema pulmonar agudo o la insuficiencia cardíaca congestiva de curso rápido pueden ser las manifestaciones más aparentes.

3) No existe fiebre al iniciarse, ni durante el choque prolongado. Generalmente la temperatura corporal, se eleva a 37.8-39.4° C, rara vez alcanza los 40.6° C, en las primeras 24 horas, y persiste durante 3-7 días (100).

## 3) Diagnóstico (100)

Por diversos estudios se han podido caracterizar ciertos cambios que ocurren durante el infarto miocárdico los cuales pueden ser útiles para el diagnóstico de la enfermedad, entre ellos se encuentra que:

- Las cifras del colesterol disminuyen.
- Hay hiperglucemia e hiperazoemia transitoria.
- Globulinas aumentadas especialmente la alfa-2.
- Proteína C reactiva positiva.
- Glucosuria inconstante y acetoneuria pasajera.

-Datos tempranos de anomalías segmentarias localizadas en el movimiento de la pared mediante la radioangiografía o ecocardiografía bidimensional.

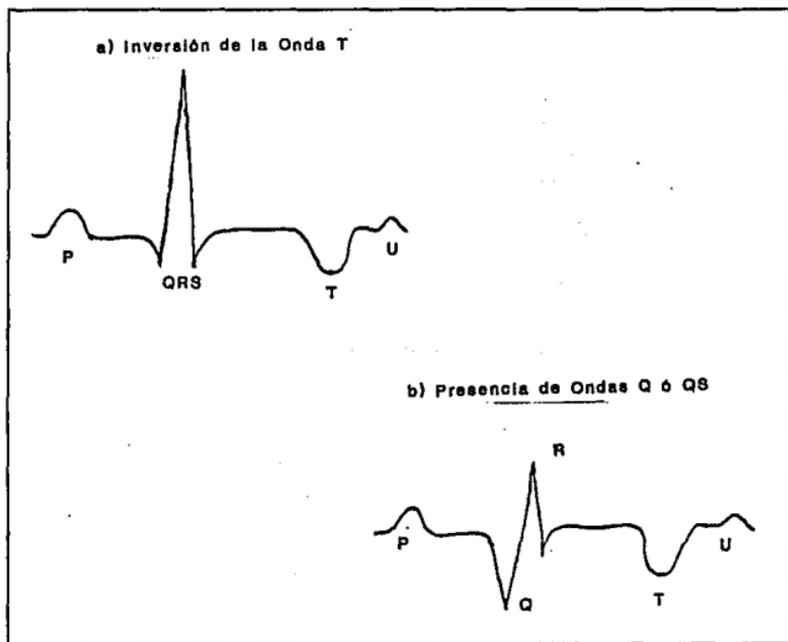
-Variaciones enzimáticas mostradas en la tabla 1.

**TABLA 1 : VARIACIONES ENZIMATICAS DURANTE INFARTO  
MIOCARDICO**

LDH	TGO	C <sub>K-MM</sub>	C <sub>K-MB</sub>	C <sub>K-BB</sub>
Aumenta al máximo al 5º día después del infarto	Aumenta al máximo al 3º día después del infarto	10	80	0
Aumenta el 1º día después del infarto				

Los datos electrocardiográficos no necesariamente van de acuerdo con la intensidad del cuadro clínico del infarto. El patrón característico promedio consiste en cambios específicos que siguen una evolución estereotipada en un lapso de varias semanas. Al principio aparece elevación del segmento ST y de T y ondas Q anormales; el segmento ST vuelve paulatinamente a la línea basal a medida que la onda T se invierte y se hace simétrica. El diagnóstico electrocardiográfico definitivo del infarto del miocardio sólo puede hacerse cuando coexisten estas tres alteraciones. (Fig. 10 ECG alterado).

Los cambios seriados ST-T son compatibles se presentan en caso de infarto, pero no son definitivos para el diagnóstico del mismo. El cuadro característico no aparece en presencia de bloqueo de la rama izquierda o cuando un infarto previo ha alterado permanentemente el ECG. Aún en estos casos si el ECG se toma al principio del ataque, es frecuente observar desniveles de ST.



*Fig 10: ECG alterado durante a) isquemia y b) infarto miocárdico.*

### 3.4 TRATAMIENTO DURANTE EL INFARTO MIOCARDICO

#### 3.4.1 GENERALIDADES Y TIPOS DE FARMACOS USADOS DURANTE EL INFARTO

Existen muchos fármacos de acción cardíaca o cardioactivos, que de alguna forma pueden ayudar a prevenir, disminuir o retardar los daños provocados por anoxia, actuando a diferentes niveles sobre cada uno de los subsistemas cardíacos.

**TABLA No.2: GRUPOS DE FARMACOS USADOS PARA REDUCIR EL  
TAMAÑO DEL INFARTO**

GRUPO	FARMACOS
BLOQUEADORES B-ADRENERGICOS	atenolol, metoprolol, propranolol, timolol
BLOQUEADORES DEL CANAL LENTO DEL CALCIO	verapamil, nifedipina
NITRATOS	nitroglicerina, nitroprusiato
ESTEROIDES	hidrocortisona, metilprednisolona
ANTIINFLAMATORIOS NO ESTEROIDES	aspirina, dipiridamol, ibuprofen
AGENTES TROMBOLITICOS	estreptoquinasa, uroquinasa, plasminógeno tisular
ENZIMAS	hialuronidasa
AGENTES ATRAPADORES DE RADICALES LIBRES	alopurinol, catalasa, manitol, superóxido dismutasa <sup>3</sup>

*Estos fármacos son de uso común en la clínica. Tomado de 53.*

Siendo la propiedad inotrópica (capacidad de desarrollar fuerza) la más evidente de las funciones cardíacas. el efecto más importante de los fármacos cardioactivos es el de modificar dicha propiedad ya sea aumentándola o disminuyéndola. En este sentido, los fármacos que disminuyen la fuerza de contracción son denominados depresores cardíacos, dentro de ellos se encuentran los antiarrítmicos pues su actividad antiarrítmica tiene un efecto inotrópico negativo.

### **3.5 ANTIARRITMICOS**

#### **3.5.1 GENERALIDADES Y MECANISMO DE ACCION.**

Las arritmias cardíacas son un grave problema en la práctica clínica, produciéndose en un 25% de los pacientes tratados con digital, 50% de los enfermos anestesiados y en más de 80% de las personas con infarto agudo al miocardio (102).

Las arritmias cardíacas se definen como los trastornos de la frecuencia cardíaca, el ritmo y el origen o conducción de impulsos en el corazón. Estos cambios pueden ser desencadenados por diferentes factores entre los que se cuentan principalmente la isquemia por hipoxia y anomalías de pH y electrolitos resultantes, estiramiento excesivo de la fibra cardíaca, descarga excesiva o hipersensibilidad a sustancias reguladoras del sistema autónomo; además de la exposición a sustancias extrínsecas como digitálicos y otros productos que pueden ser tóxicos (100).

Las arritmias pueden requerir tratamiento debido a que las contracciones demasiado rápidas, demasiado lentas o asincrónicas, reducen el gasto cardíaco, y lo que es aún más importante, algunas arritmias pueden precipitar trastornos graves del ritmo o ser aún mortales, esto es por la despolarización ventricular prematura temprana que puede precipitar la fibrilación ventricular, la cual, es la principal causa de muerte de pacientes que presentan arritmias ventriculares.

Aunque el factor que desencadene las arritmias puede ser diverso, éstas son producidas por alteraciones en la automaticidad, en la conducción o en ambas; es decir, por una actividad anormal del marcapaso o por la propagación de impulsos anormales. Así el propósito de la terapéutica antiarrítmica, es reducir la actividad de marcapaso y modificar la conducción alterada de manera crítica. El último objetivo puede comprender una mejoría de la conducción en la región deprimida o suprimirla en forma conjunta. Los principales mecanismos para alcanzar estas metas son: 1) bloqueo del canal del sodio, 2) bloqueo del canal del calcio 3) prolongación del período refractario efectivo y 4) bloqueo de los efectos del sistema autónomo simpático en el corazón.

Los medicamentos antiarrítmicos reducen la automaticidad, conducción, excitabilidad y prolongan el período refractario en el tejido despolarizado más que en el tejido normalmente polarizado. Esto se logra principalmente por bloqueo selectivo de los canales de sodio o de calcio de las células despolarizadas (102).

### 3.5.2 CLASIFICACION DE LOS AGENTES ANTIARRITMICOS

Vaughan Williams en 1978 divide a los fármacos antiarrítmicos en 4 clases (96).

- Clase I: Estabilizantes de Membrana.
- a) con alargamiento de la duración del potencial de acción (DPA) y del periodo refractario efectivo (PRE).
  - b) con acortamiento del DPA y el PRE.
- Clase II: Inhibidores Simpáticos.
- Clase III: Aquellas cuya acción primordial es la de aumentar la duración del potencial de acción.
- Clase IV: Inhibidores del canal lento del calcio.

**TABLA No.3: FARMACOS ANTIARRITMICOS**

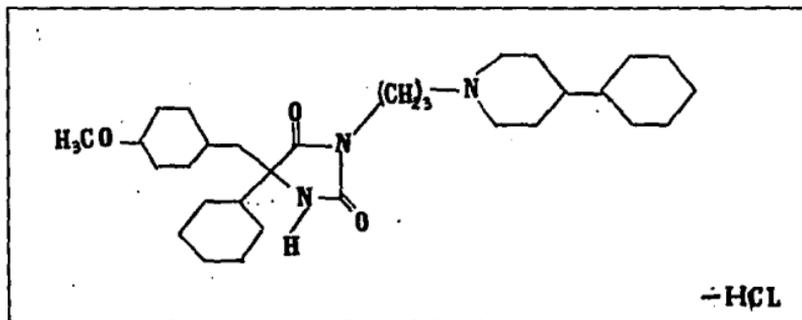
CLASE	GRUPO	PROTOTIPO
Ia	ALCALOIDES	Quinidina
	PARAMINOBENZAMIDA	Procainamina
	PIRIDILFENILAMIDAS	Disopiramida
Ib	XILIDIDAS	Lidocafna
	FENOXIAMINOALCANOS	Mexiletina
	HIDANTOINAS	Fenitofna
II	BETA-BLOQUEADORES	Propranolol
III	BENZOFURANOS	Amidaroná
IV	DER. HOMOVERATRILICOS	Verapamilo

*Clasificación de antiarrítmicos según Vaughan. Modif. de 96.*

### 3.5.3 ROPITOINA

La ropitofna es un fármaco nuevo, derivado básico de la difenilhidantofna (fenitofna), se tiene como el clorhidrato del 3-[-(4-fenil-1-piperidil)-propil]-5-(4-metoxifenil)-5-fenilhidantofna, esta estructura se presenta en la Fig. 11, sus siglas son TR-2985.

En 1980 Vidrio y col. (87), valoraron este compuesto encontrando que posee un efecto antiarrítmico significativo, además lo compararon con la fenitofna y otros antiarrítmicos encontrando que posee un efecto más potente (51).



*Fig. 11: Estructura de la Ropitofna*

La Ropitofna ha sido probada en diferentes modelos experimentales antiarrítmicos principalmente en rata y perro (41,66,83) encontrándose que presenta dicho efecto porque retarda la aparición y disminuye los episodios arrítmicos (51).

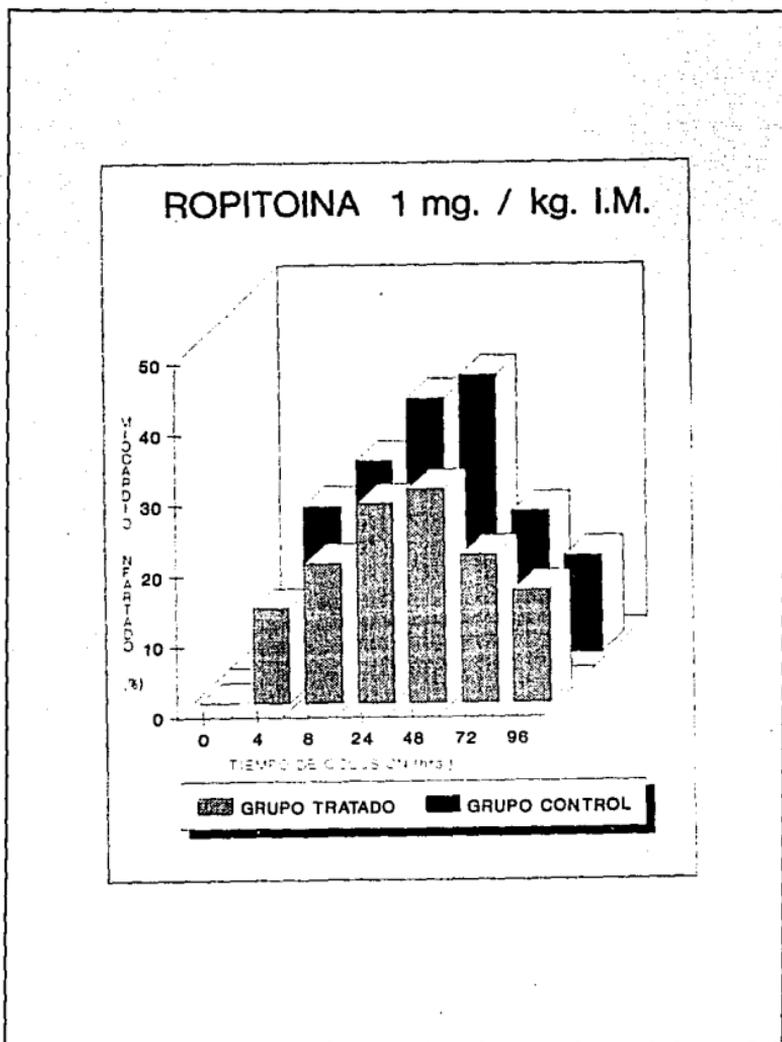
En el estudio realizado por Martínez A.L. en 1991, se demuestra que la Ropitofna tiene efecto en la disminución del tamaño del infarto. La disminución de la extensión del infarto fue significativa estadísticamente en los tiempos 4, 8, 24 y 40 h. postoclusión verificando que a los tiempos de 72 y 96 h. no presenta efecto significativo sobre la disminución del tejido lesionado.

En la tabla No.4 se presentan los resultados del estudio realizado por Martínez en 1991 y la representación gráfica se presenta en el gráfico No.1 el cual describe el efecto de la Ropitofina en la evolución temporal del tamaño del infarto miocárdico en rata (53).

**TABLA No.4: EFECTO DE LA ROPITOINA EN LA EVOLUCION DEL INFARTO INDUCIDO EXPERIMENTALMENTE**

TIEMPO DE OCLUSION	4	8	24	48	72	96
Grupo control	20.77%	27.16%	35.91%	39.19%	19.96%	13.85%
e.t.m.	1.07	2.14	2.08	1.02	0.09	1.07
Grupo tratado	13.42%	19.70%	28.12%	30.11%	20.86%	15.87
e.t.m.	1.27	1.30	0.88	1.19	1.68	1.49
<b>GRUPO</b>	<b>PORCENTAJE DE MIOCARDIO INFARTADO</b>					

*Al grupo control se le administró propilenglicol 0.33ml/kg; al grupo tratado Ropitofina 1mg/kg; n=5 para los dos grupos. Modif. 53.*



*Gráfica No.1: Efecto de la Ropitoina en la evolución del infarto inducido experimentalmente. Modif. de 53.*

### 3.5.4 DIFENILHIDANTOINA "DFH"

Aunque aún no se conoce con exactitud el mecanismo de acción de la Ropitofna se le atribuye el de su precursor químico, es decir la DFH (Difenilhidantofna o Fenitofna), el cual consiste en una estabilización de la membrana (102) que interfiere con los intercambios catiónicos, sobre todo del flujo de sodio, que explica la disminución de la pendiente de despolarización de la fase 4 de las fibras automáticas. En esta forma la estabilización de la membrana junto con la disminución de la duración del potencial de acción colocan a la fenitofna en la clase Ib.

Hoffman B. F. y Bigger T.J. clasifican a la DFH junto con la lidocafna y la procainamida como excelente en su eficacia contra las arritmias en comparación con la quinidina y propranolol calificados como regularmente eficaces (102).

En la tabla 5 se presentan algunos efectos de la DFH con respecto a otros fármacos.

**TABLA No.5: CARACTERISTICAS ELECTROFISIOLOGICAS DE VARIOS ANTIARRITMICOS**

CAMBIOS EN LAS FIBRAS DE PURKINJE	PROCAINAMIDA	PROPRANOLOL	DFH
Automaticidad	D	D	D
Capacidad de respuesta	D	D	SC,A
PRE en relación con DPA	A	A	A
Exitabilidad	D	D	SC
Tiempo de conducción AV	SC,A	SC,A	SC,D
Arritmias experimentales inducidas por ligadura coronaria	++	+	++?

*DFH, Difenilhidantofna; PRE, Periodo refractario efectivo; DPA, duración del potencial de acción; +, moderadamente eficaz; ++, eficaz; +++, sumamente eficaz; A, aumentado; D, disminuido; SC, sin cambio. Modif. de 102 pp 821.*

#### **4 . ANTECEDENTES PARA LA EXPERIMENTACION**

En la gran mayoría de los casos una de las causas y mecanismos capaces de provocar insuficiencia cardíaca, es la oclusión parcial o completa de una rama más o menos importante de las arterias coronarias de etiología aterosclerótica.

Cabe mencionar que los mecanismos celulares y las alteraciones involucradas y operativas en estos factores no se han clarificado totalmente, pero los altos índices de correlación entre los factores mencionados y la aparición de la enfermedad coronaria en sus expresiones más importantes la angina de pecho y el infarto del miocardio, son indudables.

Por lo tanto, para estudios sobre esta enfermedad se debe considerar, la importancia funcional de las arterias ya que mientras la coronaria derecha irriga principalmente tejido específico del sistema de conducción (el nodo sinusal, el aurículoventricular y parcialmente la rama derecha del haz de His), la coronaria izquierda nutre básicamente tejido muscular (todo el ventrículo izquierdo y los dos tercios anteriores del tabique interventricular). Se admite que la coronaria izquierda se distribuye en las tres cuartas partes del corazón y la coronaria derecha sólo lo hace en la parte restante.

De hecho la oclusión de la arteria coronaria derecha rara vez provoca la muerte del enfermo y sólo da lugar a la aparición de arritmias de diversas importancias, mientras que la interrupción de la circulación en la arteria coronaria izquierda, afecta al corazón en su función de bomba por compromiso de la masa muscular contráctil y en muchos casos, lleva a la muerte súbita o a la insuficiencia cardíaca.

Es clara entonces la gran importancia de establecer modelos experimentales de infarto miocárdico que provean de información concerniente a la morfología, bioquímica, electrofisiología, y propiedades mecánicas del miocardio infartado, así como los cambios hemodinámicos que ocurren siguiendo la oclusión de la arteria coronaria.

Los modelos experimentales usados para cada estudio requieren de animales en los cuales el infarto puede ser producido y cuantificado fácilmente, consistente y económicamente (17,31).

El animal más usado es el perro, pero la ligación de la arteria coronaria causa muchas dificultades en el laboratorio y requiere procedimientos quirúrgicos laboriosos. El infarto resultante de la ligación en sitios similares de algunas arterias puede variar grandemente en tamaño, así que un gran número de estos animales relativamente costosos, son requeridos para conseguir resultados estadísticamente significativos (17).

Las técnicas disponibles para la oclusión de la arteria coronaria en animales pequeños tales como la rata (41), presentan ventajas, por que la oclusión quirúrgica es fácil de realizar y no se requiere de equipo especializado, la compra y mantenimiento de estos animales es mas económica, los corazones de rata son pequeños y por lo tanto pueden ser muestreados ampliamente en pocas secciones histológicas y la cuantificación del infarto es más fácil.

El modelo de infarto miocárdico en rata, ha sido utilizado para estudiar las características morfológicas de evolución del mismo (13,16) y para evaluar el efecto de varios agentes farmacológicos sobre el tamaño del infarto (24). Desde entonces, este modelo muestra grandes promesas para el estudio de intervenciones que modifiquen la evolución del infarto (31).

## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

### 5.1 MATERIAL Y REACTIVOS

#### BIOLOGICO

Ratas Wistar macho de 8 semanas de edad y 240-300 g de peso

#### SOLUCIONES

Oclusión: Solución Salina Isotónica

Eter (anestésico)

Propilenglicol al 50 %

Perfusión: Solución Salina Isotónica

Buffer pH 7.2

Glutaraldehido al 2 %

Microscopía Electrónica:

Glutaraldehido al 2%

Alcohol (40,50,60,70,80,90 y 100 %)

Tetróxido de Osmio al 1%

Buffer pH 7.2

Oxido de Propileno

EPON (resina para inclusión)

Solución Reynolds

Tungstanato de Magnesio

Azul de Metileno

**EQUIPO:**

Material Quirúrgico

Aparato de Perfusión

Ultramicrotomo

Microscopio de Luz

Microscopio Electrónico de Transmisión JPS-100

Aparato de Vacío

**5.2 DISEÑO EXPERIMENTAL**

	GRUPO	n.	ADMINISTRACION
1	Control sano	6	ninguna
2	Control con Oclusión	6	vehículo = 0.1 ml Propilenglicól/SSF 1:1
3	Tratado con Ropitofna	6	1 mg/kg peso/0.1 ml vehículo

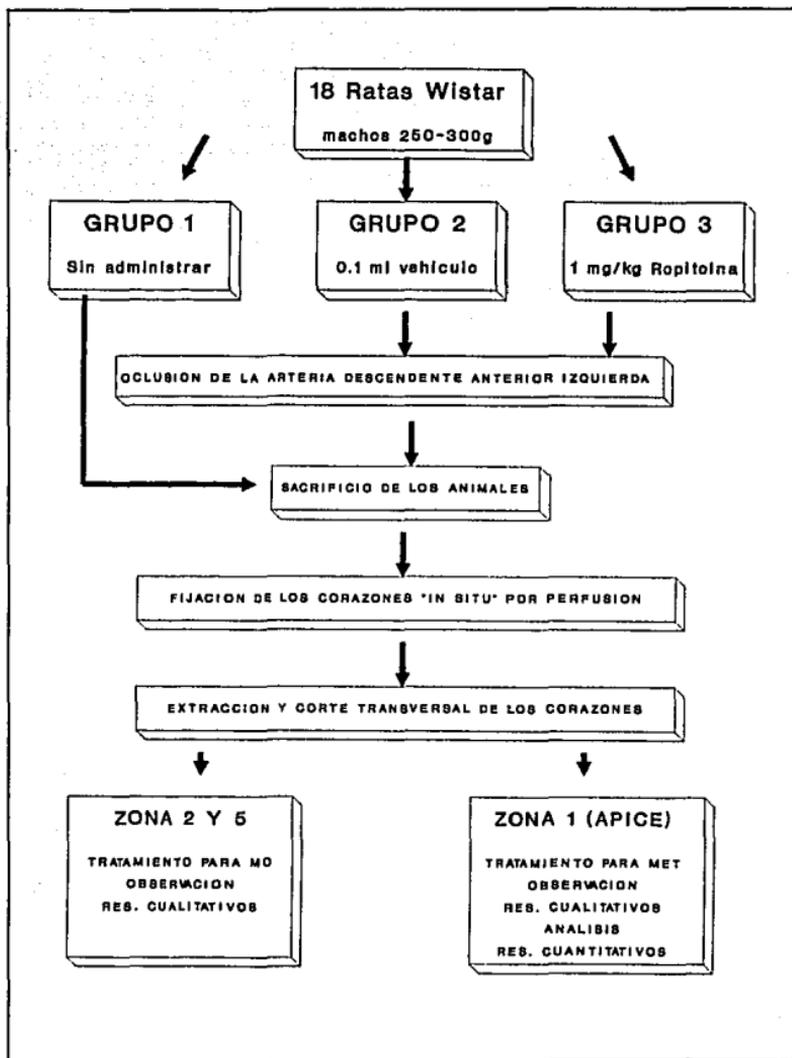


Fig. 12: Diagrama de flujo del diseño experimental.

### 5.3 METODOLOGIA

La técnica para inducir el infarto miocárdico en la rata, está basado en los reportes descritos por Johns y Olson (41) y sucesivamente por Seyle y col. (80).

El fármaco utilizado en este trabajo fue la ROPITOINA, derivado básico de la Difenilhidantoina, valorado por Vidrio y col. en 1990, ellos encontraron que posee efecto antiarrítmico.

**Administración:** Al grupo control sano (1) no se le administra. Al grupo control con oclusión (2), se le administra 0.1 ml de vehículo (propilenglicol/SSI 1:1). Al grupo tratado con fármaco se le administra ROPITOINA en dosis de 1 mg/kg de peso /0.1 ml de vehículo por vía I.M.

**Oclusión:** 30 minutos después de la administración se anestesia cada rata con éter etílico y se procede a ocluir la arteria coronaria descendente anterior izquierda, para ello se realiza una incisión en el costado izquierdo a nivel torácico entre la 4ª y 5ª costilla para exteriorizar al corazón, se liga la arteria coronaria izquierda con hilo seda de 4/0 utilizando una aguja traumática, se regresa el corazón a la cavidad y se sutura la herida, de ser necesario es posible asistir la respiración con una bombilla de hule para insuflar los pulmones y restaurar la presión negativa intratorácica, permitiendo la recuperación de la rata (41)

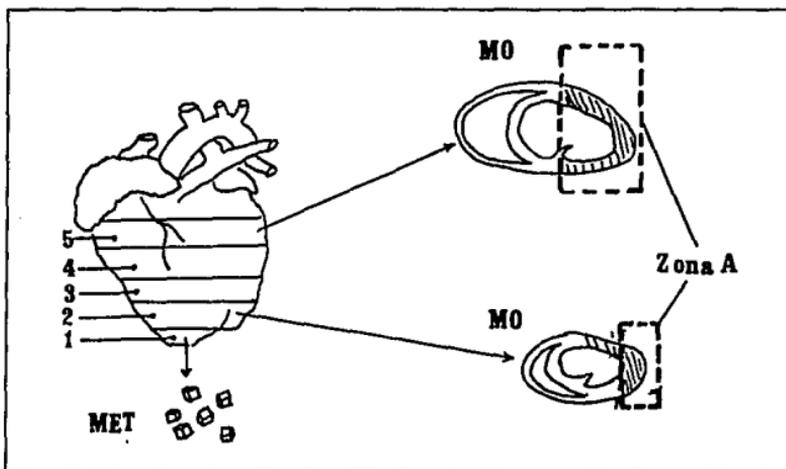
**Perfusión:** Después de 4 h. de haber realizado la oclusión se lleva a cabo la perfusión del corazón. Para ello, la rata, se anestesia nuevamente con éter, se sujeta a una mesa de operación, se abre el tórax y se localiza la aorta, esta arteria se bloquea con unas pinzas de hemostasis y por abajo de la ligadura se introduce un punzocot número 19 previamente heparinizado, por medio del cuál se lava el corazón con Buffer de fosfatos pH 7.2, al mismo tiempo se cortan las venas pulmonares para permitir la circulación del amortiguador, finalmente se introducen 10 ml de glutaraldehído al 2% para llevar a cabo la fijación "in situ", tomando en cuenta las precauciones descritas en el Apéndice I.



*Foto 2: Oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. (ver texto pag.49).*

**Tratamiento de los corazones:** Se extrae el corazón y se corta en rebanadas transversales asignándoles número en orden ascendente del ápice hacia arriba como se muestra en la figura 13. Posteriormente, las rebanadas 2 y 5 se separan para microscopía óptica y se colocan completas en un frasco bial que contiene glutaraldehído al 2 % tomando en cuenta las precauciones necesarias durante la fijación de un tejido (ver punto 1 del Apéndice II). Dichas muestras se deshidratan y se incluyen en parafina obteniendo cortes para microscopía óptica los cuales se tiñen por la técnica Tricrómica de Massón.

El estudio cualitativo realizado en estas muestras se centró en una zona de cada corte transversal obtenido para las zonas 2 y 5 correspondiente a la zona miocárdica del ventrículo izquierdo marcada como Zona A en la figura 13.



*Fig. 13: Procesamiento de las muestras. La rebanada 1 fue procesada para MET, las rebanadas 2 y 5 fueron procesadas para MO y la Zona A es el área en la que se centró el estudio de MO para las zonas 2 y 5.*

En cuanto las muestras para MET, se procede de la siguiente forma: la rebanada 1 se corta en cubos de 1mm mediante la técnica de navajas encontradas, se colocan los trozos de tejido en un frasco bial con fijador al 2% durante 2 horas, posteriormente se realizan 3 lavados con solución buffer pH 7.2 durante 10 minutos cada uno, se efectúa una postfijación con tetróxido de osmio al 1% durante 2 horas, se lavan nuevamente las muestras 3 veces por períodos de 10 minutos, continuando con la deshidratación del tejido en alcoholes de 40,50,60, 70 80, 90 y 100% con intervalos de 10 minutos cada cambio. Una vez deshidratadas las muestras se realiza la infiltración, en esta experimentación el solvente utilizado fue el óxido de propileno y la resina Epon-812.

La técnica es la siguiente:

Oxido de propileno                      2 cambios/10 minutos cada uno

Oxido de propileno-resina 2:1    1 cambio /30 minutos.

Oxido de propileno-resina 1:1    1 cambio /60 minutos.

Oxido de propileno-resina 1:2    1 cambio /toda la noche.

Resina 100%                              1 cambio /3 horas.

Las muestras se colocan en contenedores especiales y se rellenan con resina para formar bloques que serán utilizados para obtener cortes finos observables en MET, el tejido debe de colocarse en la punta del contenedor y debe procurarse evitar la formación de burbujas de aire (ver Apéndice II punto 3), los contenedores se colocan en la estufa a 30°C, la temperatura se aumenta gradualmente durante dos días hasta llegar a 60°C para permitir una polimerización adecuada.

Cuando los bloques han polimerizado se lleva acabo la formación de pirámides necesarias para la obtención de cortes finos (ver Apéndice III). Los cortes finos útiles se contrastan por la técnica de tinción doble electroconductiva (ver Apéndice IV). Las muestras se observan al microscopio electrónico de transmisión (JPS-100).

Basándose inicialmente en las observaciones de MO, se hizo el análisis cualitativo de los grupos eligiendo los parámetros a evaluar por MET, los cuales podrían ser útiles para evaluar el daño causado por la oclusión así como los cambios debidos al uso del fármaco probado.

Para realizar el análisis cuantitativo se tomaron fotos de manera aleatoria en cada corte obtenido de cada muestra y se determino el número total de mitocondrias, número de mitocondrias normales y dañadas por cien micras cuadradas de tejido, el tamaño del sarcómero y el diámetro mitocondrial para cada grupo estudiado.

## 6 . RESULTADOS

### 6.1 MICROSCOPIA OPTICA

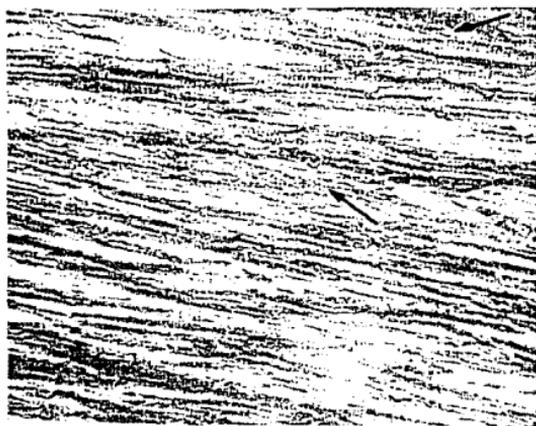
#### 6.1.1 Aspectos Cualitativos

Se compararán cualitativamente las características celulares y tisulares entre el grupo control con oclusión (2) y el grupo con previo tratamiento de Ropitofna (3) encontrando claras diferencias entre ambos grupos, entre las que se pueden mencionar: Adelgazamiento de fibras, presencia de fibroblastos, edema, hemorragia, congestión, infiltración leucocitaria, presencia de macrófagos, despolimerización, espacio intercelular aumentado, presencia de vacuolas intracitoplasmáticas, fibras onduladas y necrosis coagulativa (8,21).

Las fotos 3 y 4 muestran dos cortes de músculo cardíaco tomadas de muestras de miocardio de ratas del grupo 1 (sanas), estas presentan características normales en cuanto al acomodo de las fibras dispuestas regularmente y unidas por los discos intercalares característicos, su forma es columnar alargada ramificada y se presenta una proporción considerablemente mayor de fibras musculares en relación al tejido conjuntivo colágeno laxo, el cual presenta los elementos estructurales propios de este tejido, las fibras musculares presentan un grosor característico evaluado en la zona A del miocardio (ver pag.51) y aunque se pueden apreciar fibras con cierto ondulado, este no es excesivo ni muy notorio. Los núcleos presentan forma oval o redonda dependiendo de la proyección del corte, la estructura de las miofibrillas se aprecia totalmente íntegra y continua en el arreglo intercalado de actina y miosina cosa que se evidencia por la apariencia normal de estrias transversales. En general la estructura de este tejido es comparable con la de la foto 1 (ver pag. 13) en la que se muestra un corte longitudinal de músculo cardíaco (por MO).



*Foto 3: Corte transversal de ventrículo izquierdo del grupo I (control sano). En esta foto se puede apreciar la estructura normal del músculo cardíaco, se observan los núcleos (N) en posición paracentral (H & E) 16 X.*



*Foto 4: Corte transversal de corazón de rata del grupo I (control sano) en donde se puede apreciar que el arreglo de las miofibrillas provoca el efecto óptico de estriación. (H & E). 16 X.*

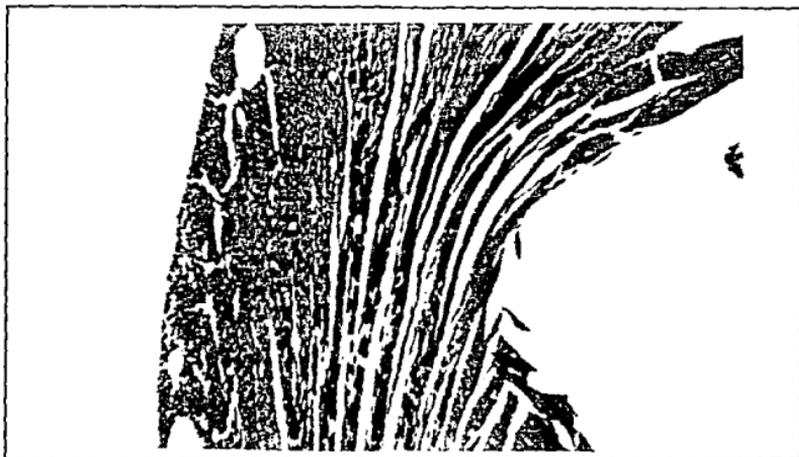
Las fotografías 5 y 6 muestran la forma y disposición característica de las células del miocardio en ventrículo izquierdo para los grupos 2 (control con oclusión y sin tratamiento) y 3 (con oclusión y tratamiento de ropitoina)

La imagen de la foto 5 nos muestra un corte transversal del corazón del grupo 2 donde se puede apreciar marcadas diferencias con la morfología normal y característica del miocardio sano (ver fotos 3 y 4). Inicialmente se puede apreciar un cambio en la aptencia tintorial de las fibras cardíacas presentes en la zona afectada extendiéndose a veces hasta el septo interventricular (séptum) y la pared del ventrículo derecho, ya que las miofibrillas en lugar de captar el color rojo escarlata que debe tomar con la técnica utilizada (tricromica de Masson) se tiñeron de un color que va desde el azul intenso hasta un tono lila o violeta, lo que sugiere un cambio bioquímico en las células afectadas por la isquemia. En la técnica de Masson las fibras musculares y eritrocitos se tiñen de rojo, el tejido conectivo de azul y núcleos de morado a negro, evidenciando esta primer situación una diferencia morfofuncional entre el tejido sano y el sometido a la oclusión coronaria.

La foto 6 fue tomada de un corte histológico del corazón en la misma zona que la foto anterior (número 5 en la pared del ventrículo izquierdo). También en esta foto se aprecia un cambio en la aptencia tintorial de las fibras miocárdicas, aunque, cabe señalar que la zona afectada es menor en extensión así como en intensidad de la coloración azul presente en las fibras.



*Foto 5: Corte transversal de miocardio del ventriculo izquierdo del grupo 2 (control con oclusión). En esta foto se puede apreciar el cambio de apetencia tintorial del tejido afectado por la oclusión. (Tricrómica de Masson) 16 X.*



*Foto 6: Corte transversal de corazón de rata del grupo 3 (tratado con ropitoina en donde se puede apreciar que la extensión de la zona afectada por la oclusión es menor que en la foto 5. 3.2 X.*

La foto 7 corresponde al grupo 2 fué tomada en una zona correspondiente al límite de la zona infartada. Se observa la diferencia estructural existente entre fibras adyacentes con diferentes grados de afección debido probablemente a los diferentes niveles de isquemia. Arriba están presentes fibras que están teñidas debilmente(tono azulado), además estas fibras presentan una reducción en su diámetro y en consecuencia el espacio intersticial se ve aumentado. Abajo la mayoría de las fibras muestran un color rojo escarlata intenso, diámetro mayor y menos espacio intersticial correspondiendo estas a fibras aparentemente normales.



*Foto 7: Corte transversal de corazón del grupo 2. Se aprecia la diferencia de tinción y diámetro de las fibras musculares entre fibras adyacentes de la zona cercana al borde del infarto. (Tricrómita de Masson). 16 X.*

En la foto 8 se muestran dos cambios importantes ocurridos en el grupo 2 en comparación con el 3, donde observamos un claro adelgazamiento de los miocitos evidenciado por el aumento en el espacio intercelular que corresponde a los espacios blancos en la foto, además dichos espacios intercelulares están ahora invadidos por gran cantidad de tejido conjuntivo evidenciado por la presencia de núcleos de fibroblastos.

En la foto 9 correspondiente a un corte del corazón de la misma zona estudiada pero del grupo 3, se puede apreciar que aunque existen lesiones provocadas por la isquemia, tales como adelgazamiento de fibras, aumento del espacio intersticial, desnaturalización de fibras etc., sin embargo, estas lesiones son significativamente menores que en el grupo no tratado, cabe señalar que inclusive la arquitectura general se ve mas estable.



*Foto 8: Esta foto del grupo 2, nos ofrece un detalle en donde se puede apreciar el adelgazamiento de los miocardiocitos, así como la evidente activación del tejido conectivo que tiende a sustituir al tejido dañado que ha dejado grandes espacios intercelulares. (Tricrómica de Masson). 16 X.*



*Foto 9: Esta toma es del grupo 3, se puede apreciar en ella una disminución significativa en los daños presentes en el tejido en comparación con la foto 7. (Tricrómica de Masson). 16 X.*

Las fotos 10 y 11 muestran el ondulamiento presente en fibras cardíacas, del grupo 2 y 3 respectivamente. Y aunque este, a sido reportado como un daño no debido a la isquemia (80), en nuestro trabajo el ondulamiento fué notoriamente mayor en las ratas no tratadas que en las que recibieron el fármaco.

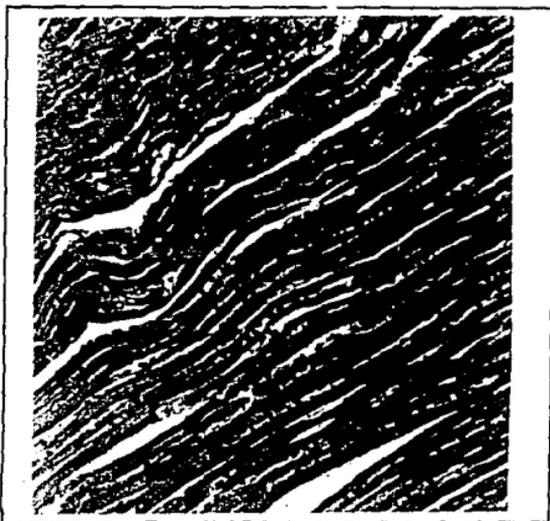
En la foto 12 se muestran otros cambios tisulares encontrados y que fueron tomados como parámetros de daño miocárdico los cuales son:

- 1.- Hemorragia evidenciada por la presencia de eritrocitos fuera del lecho vascular sin ruptura notoria del vaso sanguíneo.
- 2.- Congestionamiento caracterizado por que normalmente en los capilares promedio no es común encontrar eritrocitos aglomerados.
- 3.- Infiltración linfocitaria que no es normal en el lecho vascular (pavimentación), así como fuera del mismo. La coloración azul en la foto está dada por las fibras de colágena, que son las mas abundantes del tejido conectivo.

En la foto 13, se muestra un detalle de la abundante infiltración leucocitaria así como de la desnaturalización de las miofibrillas.



*Foto 10: Nos muestra el ondulamiento presente en las fibras de muestras del grupo 2, la cual, es aún mayor en la zona de fibras dañadas. (Tricrónica de Masson). 16 X.*



*Foto 11: Nos muestra el ondulamiento presente en fibras de muestras del grupo 3, el cual es menor que el que se observa en la foto 9. (Tricrónica de Masson). 16 X.*



Foto 12: Tomada del grupo 2, se muestra abundante hemorragia (H), congestión e infiltración leucocitaria. Se denota el fenómeno de pavimentación de células blancas (P), en el cual los leucos viajan cerca de la pared vascular. (Tricrómica de Masson). 16 X.



Foto 13: Toma del grupo 2, muestra a detalle despolimerización (D) e infiltración leucocitaria, se observan neurófilos (N), macrófagos (M) y Linfocitos (L). (Tricrómica de Masson). 16 X.

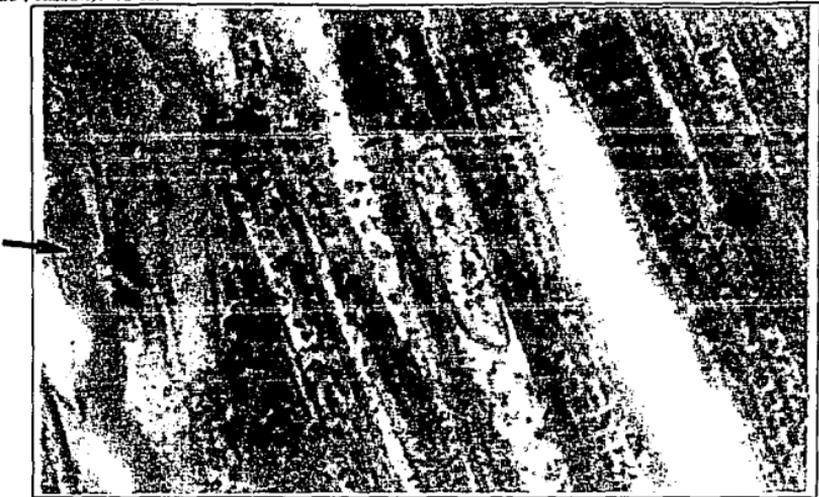
A continuación se muestran dos fotos del grupo 2 (sin tratamiento) en la 14a se nota perfectamente a detalle las sarcómeras así mismo aparece señalada con una flecha una miofibrilla en la que se aprecia claramente que está sufriendo un proceso de despolimerización, por otro lado hacia la izquierda de la foto las proteínas despolimerizadas (producto de la muerte celular) dejan una especie de saco azul que conserva parcialmente la forma de fibra muscular pero que obviamente no permanece íntegra, esta desorganización estructural y funcional evidentemente es lo que causa la diferente aptencia tintorial presente en las muestras observadas.

La foto 14b corresponde a otra zona de la misma muestra y presenta el mismo aspecto. En el lado izquierdo es evidente la acumulación de material amorfo teñido de azul.

A diferencia de las dos anteriores la foto 15 se aprecian fibras miocárdicas de muestras con tratamiento de ropitóna y en ella es evidente la diferencia en la afección de la estructura miofibrilar que si bien presenta alguna irregularidad en las estriaciones esta no es tan marcada, además de que ésta como otras muestras del mismo grupo no presenta la variación en la aptencia tintorial que se presentó en las muestras no tratadas.



*Foto 14a: Detalle de la desnaturalización proteica que sufren las fibras afectadas por la isquemia. La fibra señalada con una flecha muestra claramente dicho proceso. (Tricrómica de Masson). 40 X.*



*Foto 14b: Otro detalle de la desnaturalización proteica. Las dos fotos fueron tomadas del grupo 2 (con oclusión y sin tratamiento) (Tricrómica de Masson). 40 X.*



*Foto 15: Aspecto de la despolimerización presente en el grupo tratado con ropitoina previamente a la oclusión de la coronaria ascendente anterior izquierda . (Tricrómica de Masson). 40 X.*

Aunque la necrosis coagulativa no es muy evidente en preparaciones histológicas antes de 8 hrs (1,21) nosotros observamos que en cuatro de seis muestras del grupo control con oclusión sí se presentó este tipo de lesión en grado moderado, esto se muestra en la foto 16 marcada con flechas donde están presentes zonas opacas con aspecto de vidrio esmerilado y que se identifican como zonas de necrosis coagulativa.

Además en el grupo con tratamiento también se presentó esta lesión pero en menor grado de daño, esto se demuestra en la foto 17, donde la apariencia de vidrio esmerilado es menor que la de las zonas señaladas en la foto 16.



Foto 16: Evidencias de necrosis coagulativa 4 h. postoclusión en el grupo 2, este grado de daño se identifica como moderado. (Tricrómica de Masson). 40 X.

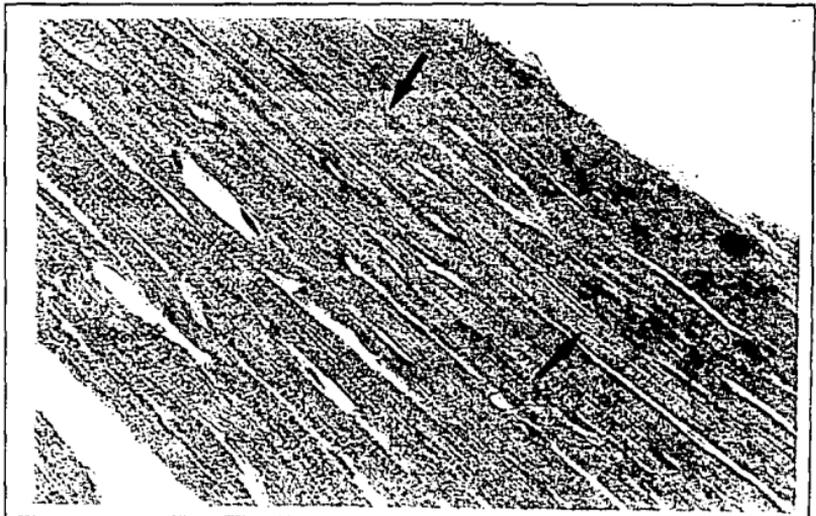


Foto 17: Evidencias de necrosis coagulativa 4 h. postoclusión en el grupo 3 donde se identificó como de grado leve. (Tricrómica de Masson) 40 X.

A continuación se presentan las tablas acumulativas de frecuencia con la que se observó cada tipo de daño evaluado y el grado del mismo en la rebanada 2 y 5, representando dichos resultados en las gráficas 2 y 3, en ellos se muestra claramente las diferencias entre el porcentaje de muestras en cada grupo que presentan los diferentes tipos de lesiones.

**TABLA No.6: COMPARACION DE LA FRECUENCIA EN EL GRUPO 2 Y 3 DE CADA TIPO DE LESION EN LA ZONA 2**

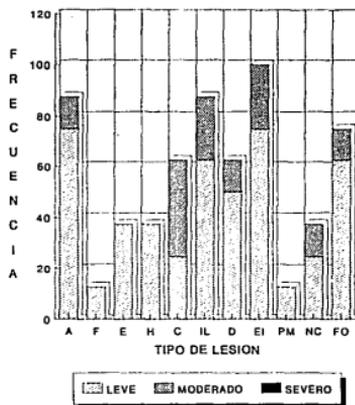
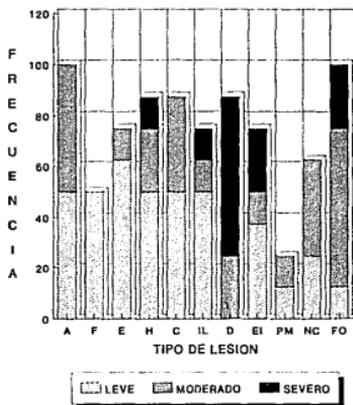
TIPO DE LESION	Gr	GRUPO 2 (%)	GRUPO 3 (%)
ADELGAZAMIENTO	L	50.0	75.0
	M	50.0	12.5
	S	0.0	0.0
FIBROBLASTOS	L	50.0	12.5
	M	0.0	0.0
	S	0.0	0.0
EDEMA	L	62.5	37.5
	M	12.5	0.0
	S	0.0	0.0
HEMORRAGIA	L	50.0	37.5
	M	25.0	37.5
	S	12.5	0.0
CONGESTIONAMIENTO	L	50.0	25.0
	M	37.5	25.0
	S	0.0	0.0
INFILTRACION LEUCOCITARIA	L	50.0	62.5
	M	12.5	12.5
	S	12.5	0.0
DESPOLIMERIZACION	L	0.0	50.0
	M	25.0	25.0
	S	62.5	0.0
ESPACIO INTERCELULAR	L	37.5	75.0
	M	12.5	0.0
	S	25.0	0.0
PRESENCIA DE MACROFAGOS	L	12.5	12.5
	M	12.5	0.0
	S	0.0	0.0
NECROSIS COAGULATIVA	L	25.0	25.0
	M	37.5	12.5
	S	0.0	0.0
FIBRAS ONDULADAS	L	12.5	62.5
	M	62.5	12.5
	S	25.0	0.0

Gr, grado de la lesión; L,leve; M,moderada; S,severa. Grupo 2= Control con oclusión; Grupo 3 = Tratado con Ropitolna (1mg/kg) 30 min. previos a la oclusión.  
La frecuencia presentada es porcentual con respecto al número de muestras analizadas.

GRAFICA No.2:FRECUENCIA DE CADA TIPO DE LESION POR GRUPO  
EN LA ZONA 2

A) CONTROL CON OCLUSION

B)TRATADO CON ROPITOINA 1(mg/kg)



A,adelgazamiento; F, fibroblastos; E,edema; H,hemorragia; C,congestionamiento IF,Infiltración leucocitaria; D,despolimerización; EI,espacio Inter celular; PM,presencia de macrólagos; NC,necrosis coagulativa; FO, fibras onduladas.  
Nota: La frecuencia presentada es acumulativa.

**TABLA No.7: COMPARACION DE LA FRECUENCIA EN EL GRUPO 2 Y 3 DE CADA TIPO DE LESION EN LA ZONA 5**

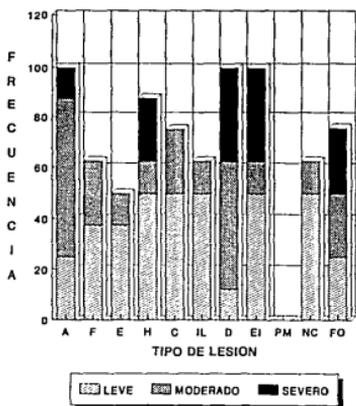
TIPO DE LESION	Gr.	GRUPO 2 (%)	GRUPO 3 (%)
ADELGAZAMIENTO	L	25.0	62.5
	M	62.5	12.5
	S	12.5	0.0
FIBROBLASTOS	L	37.5	50.0
	M	25.0	0.0
	S	0.0	0.0
EDEMA	L	37.5	50.0
	M	12.5	0.0
	S	0.0	0.0
HEMORRAGIA	L	50.0	62.5
	M	12.5	25.0
	S	25.0	0.0
CONGESTIONAMIENTO	L	50.0	0.0
	M	25.0	12.5
	S	0.0	0.0
INFILTRACION LEUCOCITARIA	L	50.0	50.0
	M	12.5	12.5
	S	0.0	0.0
DESPOLIMERIZACION	L	12.5	25.0
	M	50.0	12.5
	S	37.5	12.5
ESPACIO INTERCELULAR	L	50.0	62.5
	M	12.5	12.5
	S	37.5	0.0
PRESENCIA DE MACROFAGOS	L	0.0	12.5
	M	0.0	12.5
	S	0.0	0.0
NECROSIS COAGULATIVA	L	50.0	25.0
	M	12.5	25.0
	S	0.0	0.0
FIBRAS ONDULADAS	L	25.0	50.0
	M	25.0	12.5
	S	25.0	0.0

*Gr.*, grado de la lesión; *L*, leve; *M*, moderada; *S*, severa. Grupo 2= Control con oclusión; Grupo 3 = Tratado con Ropitofna (1mg/kg) 30 min. previos a la oclusión.

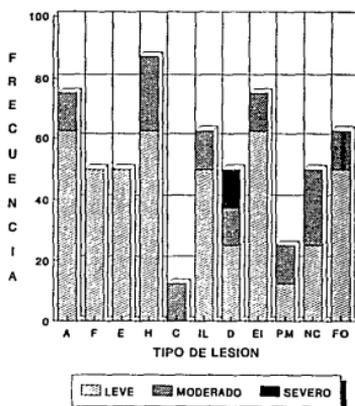
*La frecuencia presentada es porcentual con respecto al número de muestras analizadas.*

GRAFICA No.3: FRECUENCIA DE CADA TIPO DE LESION POR GRUPO EN LA ZONA 5

A) CONTROL CON OCLUSION



B) TRATADO CON ROPITOINA 1(mg/kg)



A, adelgazamiento; F, fibroblastos; E, edema; H, hemorragia; C, congestión; IF, infiltración leucocitaria; D, despolimerización; EI, espacio intercelular; PM, presencia de macrófagos; NC, necrosis coagulative; FO, fibras onduladas.

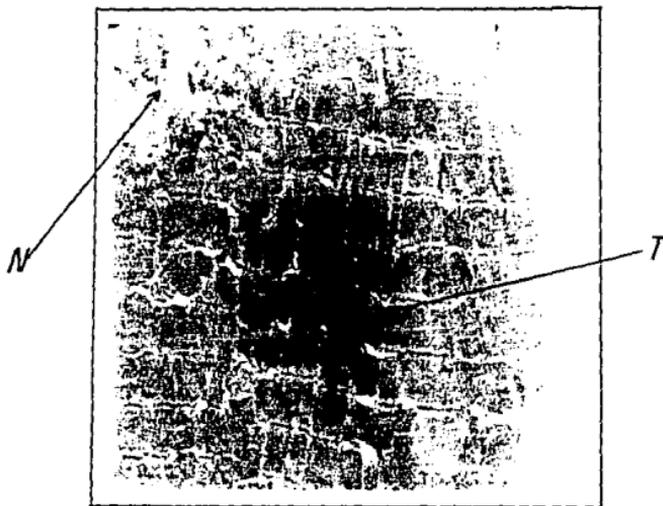
Nota: La frecuencia presentada es acumulativa.

## 6.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

### ASPECTOS CUALITATIVOS

#### A) GRUPO CONTROL SANO (SIN OCLUSION).

Se caracterizó el músculo cardíaco normal de rata a partir de los cortes finos del Grupo Control Sano (sin oclusión) dichas características se ejemplifican y explican detalladamente en las siguientes micrografías:

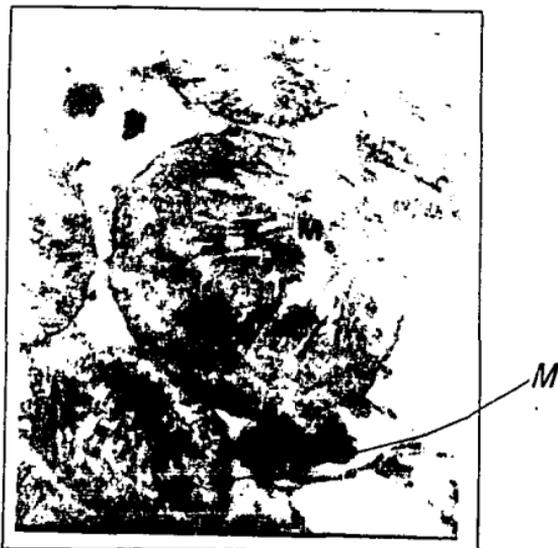


*Micrografía 3: Corte longitudinal de micardiocitos de ratas Wistar. Grupo control sano. 4775 X. N (nucleos), T (tubulos T).*

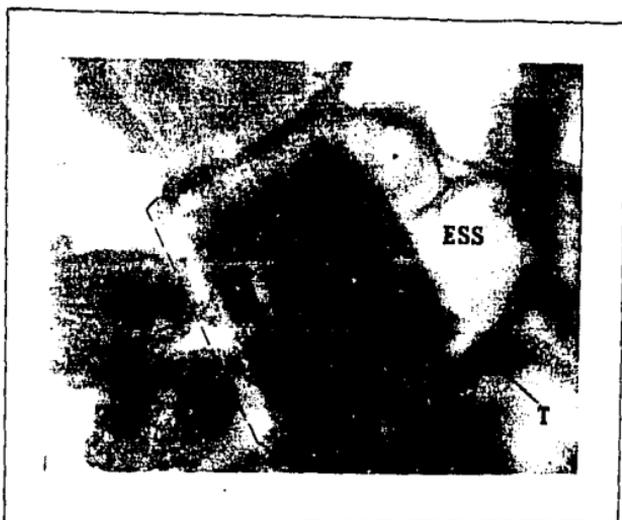
La micrografía 3 nos muestra las características del músculo cardíaco sano, donde, se observa la estriación originada porque los miocardiocitos contienen filamentos de actina y miosina intercalados, por tanto, las miofibrillas tienen bandas alternas claras y oscuras.

Las bandas claras contienen los filamentos de actina, las bandas oscuras contienen los filamentos de miosina, así como los extremos de actina cuando se superponen a la miosina. La línea Z también pasa de una miofibrilla a otra uniendo las miofibrillas entre sí a lo largo del miocito son estas bandas las que dan al músculo cardíaco el aspecto estriado. Se observa la disposición regular de los sarcómeros y gran cantidad de mitocondrias situadas entre las miofibrillas, paralelamente a las mismas, esto está en relación con las grandes cantidades de ATP necesarias para la contracción, además las mitocondrias presentan una conformación característica (ver micrografía 4).

También en la micrografía 3 se observa parte del núcleo (N) con una matriz densa en la cual está presente cromatina dispersa lo que denota una actividad celular normal (6), además es notorio que no están presentes gran cantidad de mitocondrias alrededor del núcleo. Se señalan espacios blancos situados entre las líneas Z, disposición característica de los tubulos del retículo sarcoplásmico llamados tubulos T.



*Micrografía 4: Representativa de las mitocondrias (M) normales en músculo cardíaco, esta fue tomada del grupo control sano y se observa una mitocondria en el centro (M) que presenta forma característica, membrana externa intacta, matriz densa con presencia de crestas internas íntegras y sin acumulaciones extraordinarias de material electroconductor. Se hace hincapié en la presencia de una membrana externa muy bien conservada y continua sin la presencia de desprendimientos ni elongaciones. 32713 X.*



*Micrografía 5: Se muestra el espacio subsarcolémico (ESS). Grupo control 30499 X.*

En la micrografía 5 se ejemplifican las características normales del espacio subsarcolémico y la membrana en su unión con la línea Z a través del túbulo T del cual es posible observar la luz del conducto (T), dicha unión por su apariencia es llamada de olán. Los espacios en blanco son parte del sarcoplásma en el que se encuentran incluidos los organelos, este espacio es mas notorio debido a la magnificación. El sarcómero (S) presente en la misma micrografía, es buen ejemplo de la disposición consecutiva y alternada de filamentos de actina y miosina que forman al superponerse bandas oscuras (M,A y Z) y claras (H e I).



*Micrografía 6: Núcleo (N), grupo control sano. 5400 X.*

En la micrografía 6 se observa claramente un núcleo característico en los miocitos observados en cortes de miocardio del grupo control sin oclusión coronaria.

Se presenta un carioplasma denso con cromatina dispersa, está presente la cubierta nuclear que delimita perfectamente al núcleo. En el centro se encuentran tres porciones de material denso identificados como nucleolos. En ésta micrografía es aún mas notoria la presencia de mitocondrias dispuestas en forma paralela a todo lo largo del miocito entre las miofibrillas. Se observa también la disposición regular en los sarcómeros.



*Micrografía 7: Filamentos de actina y miosina en el sarcómero. Grupo control sano. 53872 X.*

La anterior micrografía muestra un detalle de la unión de los miofilamentos y demuestra que la aparente separación de algunos miofilamentos, es mas bien un efecto óptico pues a un gran aumento como éste se verifica que aunque las miofibrillas se encuentran ligeramente separadas y no totalmente rectas la unión entre los filamentos de actina y miosina aún persisten.

**B)GRUPO CONTROL CON OCLUSION**

Para el Grupo 2 (control con oclusión de la arteria descendente anterior izquierda) se caracterizaron los cambios presentes en la ultraestructura celular con respecto al Grupo 1, ejemplificando dichos cambios en las micrografías siguientes:

*N*

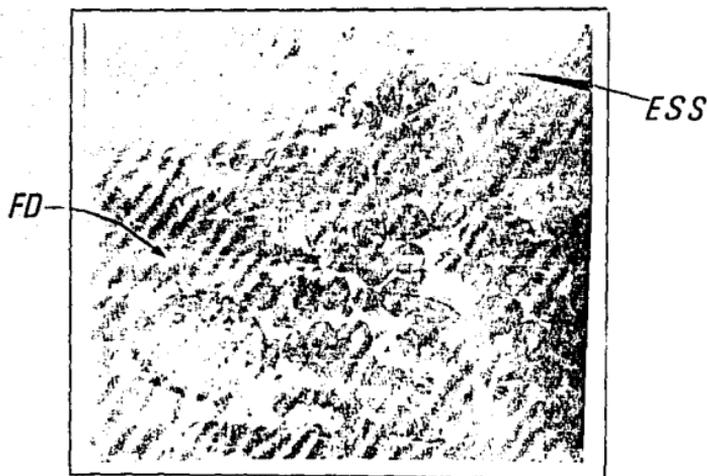
*Micrografía 8: Panorámica de miocardio del grupo control con oclusión. N (núcleo), M (mitocondrias). X 4250*

La micrografía 8 presenta una vista a poco aumento de un corte obtenido del grupo control con oclusión. Aquí se puede apreciar muy claramente, la presencia de daños estructurales específicos entre los que se encuentran: La presencia de un núcleo cuya cromatina está migrada a la periferia, este cambio está evidenciado por un halo interno de material electroconductor, además están presentes condensaciones de heterocromatina que presentan diversas formas irregulares no comparables con los presentes en la micrografía 6 (ver pag. 76).

Se observan abundantes mitocondrias las cuales presentan diversos grados de daño, dichas mitocondrias se aprecian con espacios internos vacíos y más aún, están presentes espacios en blanco los cuales presumiblemente son espacios debidos a la lisis mitocondrial, del lado derecho del núcleo se observa una acumulación de mitocondrias, característica identificada por algunos autores como daño celular debido específicamente a la oclusión (101).

Además de lo anterior las miofibrillas presentes tienen una estructura bastante bien conservada y aún existen miofibrillas en proporción similar a la de un control sano, estas observaciones muestran que el grado de daño en una misma zona es diverso como se verá en la micrografía 9.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**



**Micrografía 9:** Panorámica de miocardio Daño severo. Foco de despolimerización (FD), Espacio subsarcolémico (ESS). Grupo con oclusión, 4591X.

En la micrografía 9, se muestran cambios más severos observados en el grupo con oclusión y sin tratamiento en el cual el arreglo de las miofibrillas no es regular como en el grupo sano (ver micrografía 3), se presentan distintos grados de destrucción y despolimerización de las miofibrillas, de hecho aquí observamos la presencia de dos focos de despolimerización (fd), además está presente un aumento en el espacio intermiofibrilar, abundante sarcoplasma, daño mitocondrial desde hipertrofia hasta lisis, se incrementa el espacio subsarcolémico (ESS) observando la proliferación de mitocondrias en el mismo, en los núcleos se observa la migración de la cromatina hacia la periferia y aparentemente hay aumento en el número de mitocondrias sobre todo en la zona cercana al núcleo como se mencionó en la micrografía anterior.



*Micrografía 10: Daño mitocondrial. Grupo con oclusión. 21614 X.*

La micrografía 10 es representativa del daño mitocondrial en las muestras analizadas para el grupo 2 (control con oclusión y sin tratamiento), en ella se observa un gran incremento en el espacio interno mitocondrial debido a la destrucción de crestas mitocondriales y un aparente "hinchamiento" debido a la lesión, algunos autores mencionan que esta característica puede ser debida a la hipertrofia como respuesta celular ante el proceso de anoxia (34,36,37). Además se notó un aparente aumento en el número de mitocondrias presentes en el tejido cardíaco o al menos en la proporción de mitocondrias con respecto a las miofibrillas presentes en el campo de observación, pues se nota que la mayoría del espacio interno del miocito está ocupado por tales organelos.



*Micrografía 11: Aumento en el espacio subsarcolémico. Foco de despolimerización (FD).*

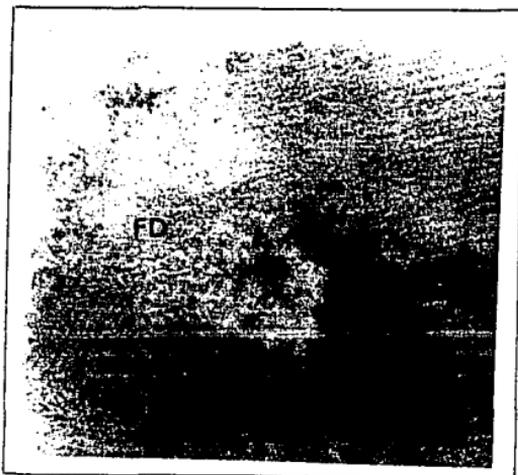
*Grupo control con oclusión 17501 X.*

La micrografía 12 muestra con más detalle el aumento en el espacio subsarcolémico en el que además han proliferado gran número de mitocondrias y se ha perdido la unión entre el sarcolema y la línea Z, está presente una miofibrilla que aparentemente se encuentra en buen estado pero aparece en el extremo superior izquierdo un foco de despolimerización (fd) en el que se nota claramente la discontinuidad de la línea M.



*Micrografía 12: Tipo de núcleos presentes en el Grupo control con oclusión 7272 X.*

En la micrografía 12 aparece un núcleo (N) clásico del grupo con oclusión, donde la cromatina se encuentra evidentemente desplazada a la periferia interna nuclear, se observan abundantes mitocondrias alrededor del núcleo y es notoria la casi ausencia de miofibrillas.



*Micrografía 13: Foco de despolimerización de miofilamentos.  
Grupo control con oclusión 55096 X.*

La micrografía número 13 tomada a gran aumento que muestra a detalle un foco de despolimerización, argumentando que de derecha a izquierda aparecen miofilamentos intactos que se continúan por una serie de puntos en desorden en lugar de continuar el arreglo de unión entre filamentos de actina y miosina.

### C) GRUPO CON OCLUSION Y TRATAMIENTO PREVIO DE ROPITOINA

A continuación se presentan algunas micrografías en las que se ejemplifican los cambios observados en el Grupo con Tratamiento de Ropitoína (1 mg/kg) previo a la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda:



*Micrografía 14: Panorámica de miocardio. Grupo tratado con Ropitoína*

La micrografía 14 es una vista a pequeño aumento en la que se muestran las características del grupo 3 (control con oclusión y tratamiento de ropitoína), en ella se observa menor grado de daño en todos los aspectos establecidos con respecto al grupo con oclusión y sin tratamiento. El arreglo de miofibrillas es más regular y la despolimerización y destrucción de las mismas es evidentemente menor, se presenta daño mitocondrial aunque cualitativamente éste es menor que en el grupo 2 control con oclusión, pues, la matriz mitocondrial aparece mucho más densa y además aparentemente el número de mitocondrias es también mayor que en el grupo 1 control sano. El espacio subsarcolémico se presenta con la apariencia clásica del grupo sano y el sarcolema no presenta desprendimientos.



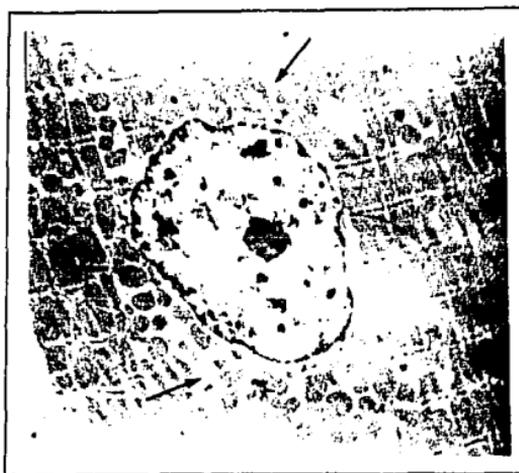
*Micrografía 15: Daño mitocondrial presente en el Grupo control con tratamiento de Ropitóna. 32190 X*

La micrografía 15 muestra las características generales de las mitocondrias presentes en el grupo control con tratamiento de Ropitóna previo a la oclusión observando en ellas características más normales en lo que a morfología se refiere pues se nota en ellas la presencia de la membrana externa bien conservada y aunque están presentes ciertos espacios vacíos en la matriz mitocondrial no llegan al porcentaje cualitativamente observado en el grupo 2 con oclusión y sin tratamiento. Además de que las crestas internas se ven bastante bien conservadas. En este punto diremos que la lisis es más evidente pues las mitocondrias que llegan a máximo de daño, es decir, la ruptura externa es muy notoria, aunque las que persisten se notan más conservadas en lo que a daño interno se refiere.



*Micrografía 16: Cromatina periférica presente en el grupo con tratamiento. 4705 X*

La micrografía 16 muestra uno de los dos tipos de núcleos observados dentro del grupo 3, dicho núcleo presenta nuevamente heterocromatina periférica y acumulos de este tipo de cromatina en el interior nuclear, está presente al centro una acumulación mayor y bien definida en cuanto a su forma por lo que se le identifica como nucléolo, además de las características nucleares queremos hacer evidente la proliferación de mitocondrias a su alrededor lo cual de nuevo implica una respuesta celular para prevenir en cierta forma el daño por anoxia (34,36,37). Por otra parte también es de notarse la presencia de un mayor número de miofibrillas además de que se encuentran mejor conservadas en su estructura en comparación con el grupo 2 en el cual se observaban miofibrillas en menor cantidad y con un grado de daño mayor.



*Micrografía 17: Cromatina dispersa presente en el grupo con tratamiento 4407 X.*

La micrografía 17 muestra un segundo tipo de núcleos observados en las muestras analizadas para el grupo 3 caracterizándolo a éste como un núcleo de apariencia normal en cuanto a que está presente la cromatina dispersa en el interior del núcleo. Por cierto que esta es una toma muy similar a la presentada en la micrografía 6 (ver pag 76) aunque en esta micrografía es evidente lo que se mencionó con respecto a la lisis mitocondrial en cuanto a que es mas evidente en grado pero no en número, se marcan con flechas dos sitios donde se observan restos de mitocondrias lisadas, sin embargo, las demás mitocondrias presentes se encuentran muy poco dañadas en su estructura interna, además hay una clara disminución de la proliferación mitocondrial alrededor del núcleo.



*Micrografía 18: Regularidad en sarcómeros y miofilamentos. Unión sarcoléma-línea Z (flechas). El recuadro muestra el tipo de zona elegida en el miocito para realizar la cuantificación mitocondrial. 3254 X*

Finalmente presentamos la micrografía 18 tomada del grupo con tratamiento de Ropitofna donde es aún más evidente la regularidad de los sarcómeros, la conservación en la proporción de miofibrillas y mitocondrias en el miocito, además en el borde inferior izquierdo es bastante notoria la conservación de la unión característica entre el sarcolema y las miofibrillas en la línea Z del sarcómero (flechas), demostrando la integridad de la membrana sarcolémica.

La forma oval en el extremo derecho de la fibra es el núcleo de un capilar.

En la tabla 8 se resumen las características de las estructuras observadas en cada grupo trabajado y se hace una comparación cualitativa entre ellos.

TABLA No.8: CARACTERISTICAS CUALITATIVAS A NIVEL ULTRAESTRUCTURA PARA LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.

GRUPO	MITOCONDRIA	Espacio subsarcolemico	Membrana miofibrilar	Cromatina nuclear	Sarcómero y miofibrillas
1 Sano	Densas, compactas, con crestas internas íntegras.	Tiene apariencia clásica.	Continua, íntegra y adherida a la superficie del miocito	Dispersa. (eucromatina)	Las bandas son continuas y con arreglo clásico.
2 Con oclusión sin tratamiento	Respecto al grupo 1, son menos densas, gran cantidad presenta diferentes grados de daño interno desde hipertrofia (hinchamiento) hasta lisis, la mayoría está destruida	Se incrementa el espacio y se observa proliferación de mitocondrias	Hay desprendimiento y en algunos casos aparecen rupturas.	Migra a la periferia (heterocromatina)	Se pierde el arreglo y se observan distintos grados de destrucción y despolimerización
3 Con tratamiento Ropitofna (1mg/kg)	En general hay menos daño que en el grupo 2 y aparece un menor número de lisadas.	Tiene apariencia clásica.	Desprendimiento y ruptura pero en menor grado que el grupo 2.	Heterocromatina en el mayor número de núcleos, eucromatina en algunos.	En menor desarreglo que las observadas en el grupo 2, en un 66 % de las muestras se observan fibras hipercontráidas.

## **ASPECTOS CUANTITATIVOS**

En base al análisis cualitativo se determinó la manera de realizar el análisis cuantitativo de las estructuras elegidas, la cual se especifica a continuación.

### **MITOCONDRIAS TOTALES**

Para determinar el número de mitocondrias totales por unidad de área se realizó la cuenta de las mitocondrias presentes en cada micrografía tomada, luego, se relacionó dicho número con la superficie de la foto en milímetros y finalmente siguiendo la metodología descrita en el Apéndice VI (Manejo de Datos de Tamaño en Foto a Tamaño Real) se obtuvieron las superficies en micras para cada micrografía, posteriormente se sacó el cociente del número de mitocondrias entre la superficie en la que se contaron dichas mitocondrias con lo que se obtiene el número de mitocondrias por micra cuadrada de tejido, sin embargo, para facilidad de manejo se calculó la relación de mitocondrias/superficie por 100 micras cuadradas los que se presentan a continuación para cada grupo experimental.

Cabe mencionar las determinaciones se realizaron en cortes longitudinales y en áreas de sarcómeros sin tomar en cuenta el espacio intercelular.

### **MITOCONDRIAS NORMALES**

De la forma descrita anteriormente para mitocondrias totales se llevó a cabo la cuenta de mitocondrias normales por unidad de área por rata para cada grupo. Contando solo aquellas mitocondrias que no presentaban daño aparente, definiendo como daño cualquier apariencia anormal presente en la mitocondria (ver aspectos cualitativos) desde espacios apreciables en la matriz mitocondrial y desaparición de crestas mitocondriales hasta lisis mitocondrial. La forma no se consideró ya que depende en gran medida de el ángulo de corte así como del espacio en el que se encuentren distribuidas las mitocondrias.

### **MITOCONDRIAS DAÑADAS**

De la forma descrita para la cuenta de mitocondrias totales se llevó a cabo esta cuenta salvo que se consideraron solo las mitocondrias que presentaban algún daño en su estructura como se mencionó desde hipertrofia hasta lisis.

### **PORCIENTO DE DAÑO MITOCONDRIAL**

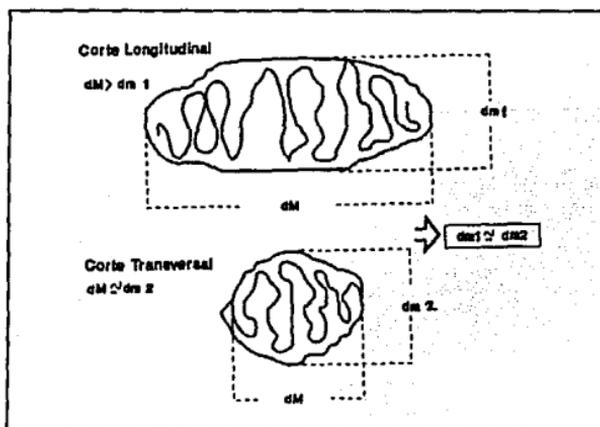
Se determinó el porcentaje de daño mitocondrial para los grupos haciendo la relación porcentual del número de mitocondrias dañadas con respecto al número de mitocondrias totales.

$$\% \text{ DAÑO} = (\text{mit. dañadas} / \text{mit. tot.}) * 100$$

**DIAMETRO MITOCONDRIAL**

Se determinó el diámetro mitocondrial normal midiendo en las micrografías de cada rata por grupo, para ello se tomaron en cuenta solo las mitocondrias que se encontraban completas puesto que el medir restos de mitocondrias implicaría un error grande ya que a veces no era posible distinguir entre las membranas de una y otra mitocondria cercanas íntegras o lisadas.

Considerando la forma característica de las mitocondrias (101) la cual es oval y presenta dos diámetros, (uno mayor si el corte se realizó longitudinalmente a ella y otro menor en el caso contrario) se determinó el medir solo el diámetro menor para controlar lo mas posible la medición.



**Fig.14:** Medición del diámetro mitocondrial.  $dM$ ; diámetro mayor  $dm$ ; diámetro menor.

**TAMAÑO DEL SARCOMERO**

Se midió el tamaño del sarcómero es decir la longitud entre dos líneas Z, esto se realizó para los diferentes grupos tomando en cuenta solo aquellos sarcómeros que se encontraban íntegros la conversión de medida en foto se realizó multiplicando por el factor de corrección a tamaño real en micras (ver apéndice VI).

Para las evaluaciones mencionadas se determinaron promedios por rata obteniendo un error estandar menor al 20% con lo que se verificó el comportamiento homogéneo de los lotes y por lo que se calculó el promedio por grupo para cada determinación efectuada, los resultados se presentan en la tabla No. 9.

**TABLA 9: DATOS PROMEDIO DE LOS PARAMETROS EVALUADOS LOS TRES GRUPOS TRABAJADOS.**

GRUPO	MT/a	MN/a	MD/a	%D	DMN	TS
1	34.7058	34.2509	0.4548	1.7431	0.7891	2.51315
2	17.87813	8.38708	9.4910	55.4299	1.07300	2.3604
3	21.00833	18.8540	2.1542	14.9687	1.15697	2.5737

*MT/a = Mitochondrias totales por 100 micras cuadradas.*

*%D = Porcentaje de daño mitocondrial.*

*MN/a = Mitochondrias normales por 100 micras cuadradas.*

*DMN = Diámetro de mitocondrias normales*

*MD/a = Mitochondrias dañadas por 100 micras cuadradas.*

*TS = Tamaño del sarcómero (micras)*

Con los resultados anteriores se realizó un análisis estadístico por t de student y ANADEVa para encontrar diferencia entre lotes, los resultados del análisis estadístico se resumen en la siguiente tabla.

**Tabla 10: RESULTADOS DE LAS PRUEBAS DE SIGNIFICANCIA ESTADISTICA.**

Grupo	MT/a	MN/A	MD/a	%D	DM	TS
1	**	**	**	**	**	**
2	**	**	**	**	**	**
3	**	**	**	**	**	**
2 vs 3	**	*	*	*	**	**

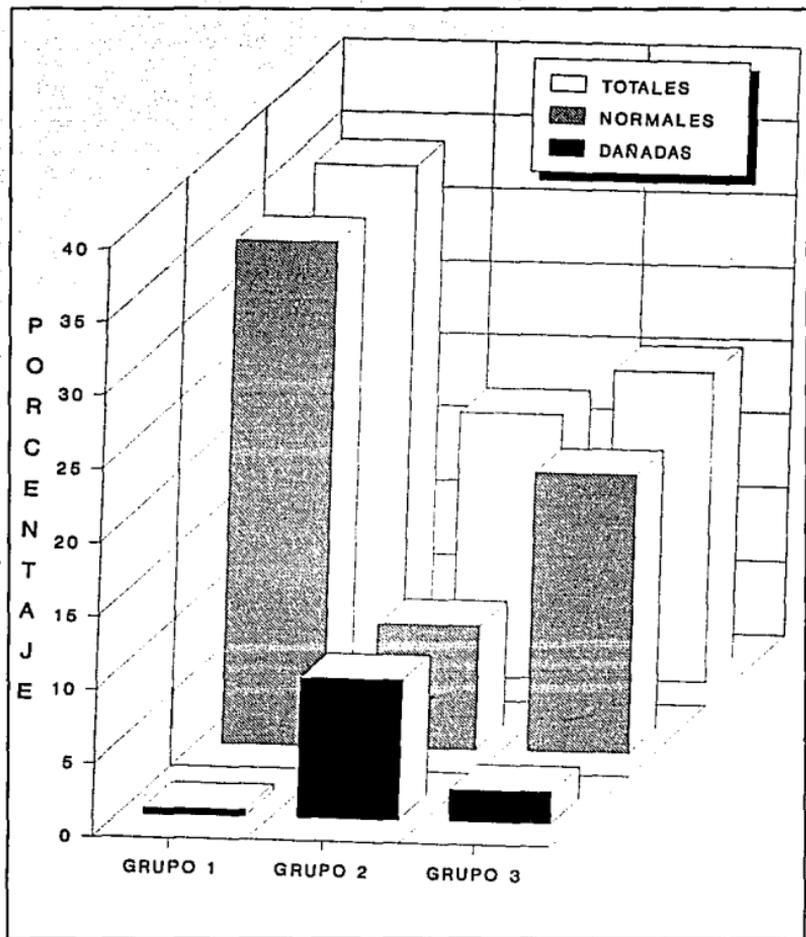
\* = Diferencia significativa con  $P < 0.05$

\*\* = No hay diferencia significativa con  $P < 0.05$

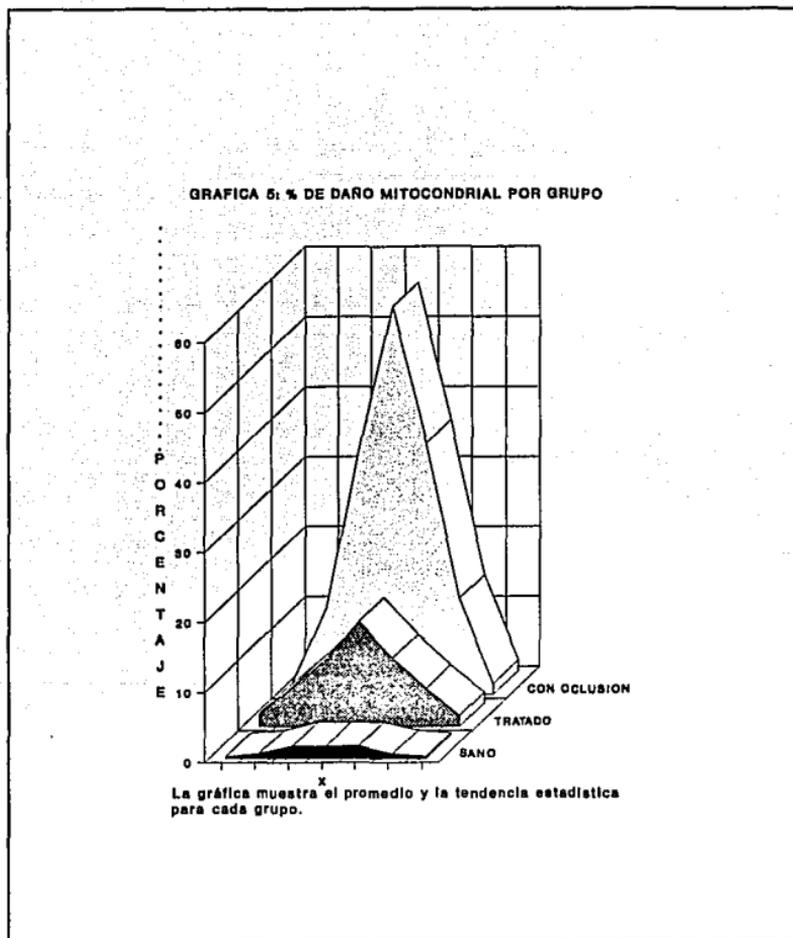
Se observa que hay diferencias significativas para las medias de mitocondrias normales, mitocondrias dañadas y porcentaje de daño mitocondrial. Las medias de tamaño del sarcómero así como diámetro mitocondrial tienen valores con tendencia de aumento para el tercer grupo con respecto a los grupos 1 y 2, sin embargo se determinó que tal diferencia no es estadísticamente significativa.

A continuación se presentan gráficamente los resultados obtenidos.

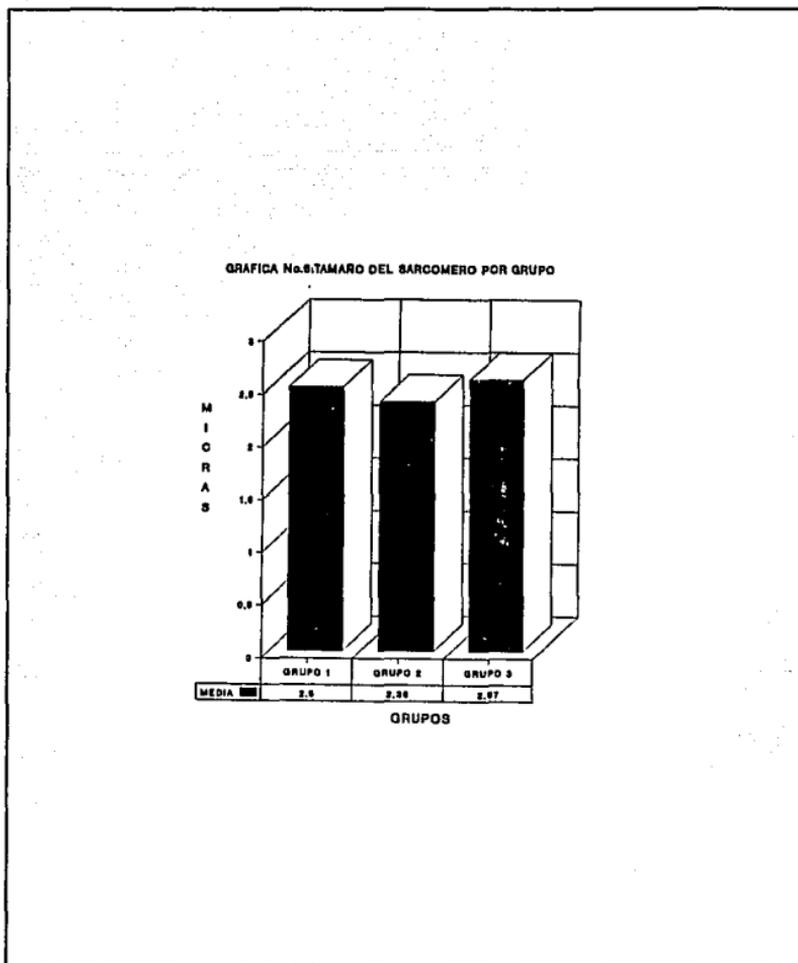
GRAFICA No.4: MITOCONDRIAS PRESENTES POR UNIDAD DE AREA



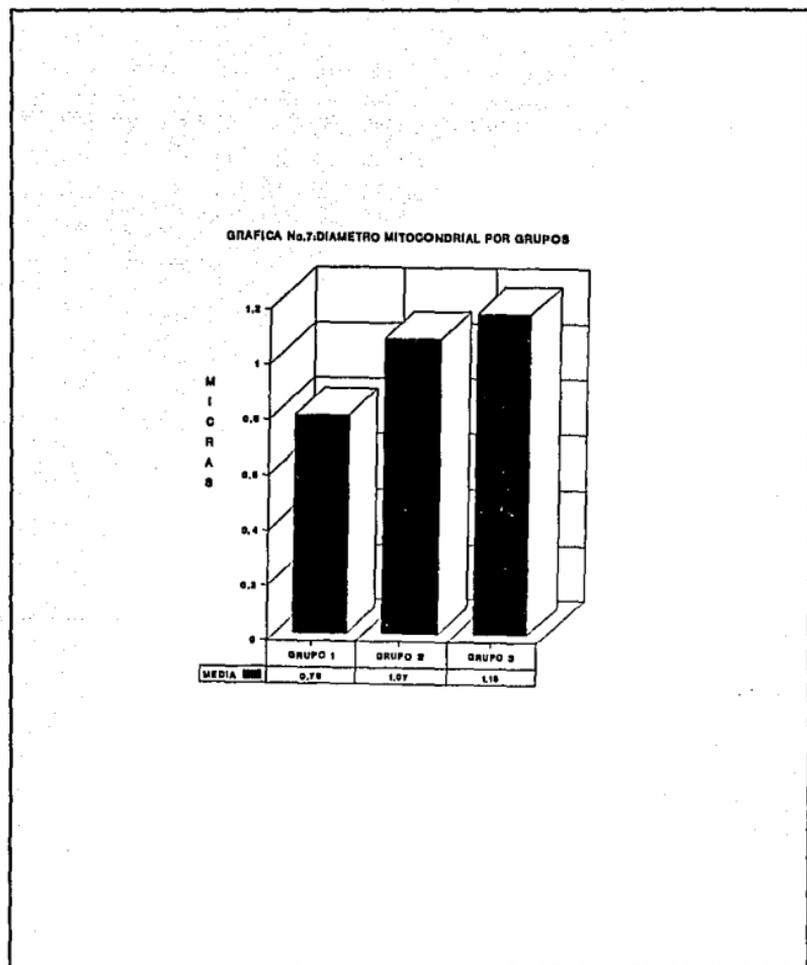
**Gráfica No.4:** Muestra la variación en el número de mitocondrias totales, normales y dañadas en los grupos trabajados. El número de mitocondrias totales es en el grupo 1 mayor que en el grupo 2. En el grupo 3 aún se ve disminuido el número de mitocondrias totales, sin embargo en el grupo 3 el número de mitocondrias normales es considerablemente mayor con respecto al grupo 2.



**Gráfica No.5:** Muestra el porcentaje de mitocondrias dañadas determinado en cada grupo, es claro el aumento en el daño mitocondrial presente en el grupo 2 con respecto a 1. En cambio en el grupo tratado si bien se presenta cierto porcentaje de mitocondrias dañadas este disminuye en un 40.5% con respecto al grupo 2.



**Gráfica No.6:** Muestra el tamaño promedio de los sarcómeros en los tres grupos trabajados medidos entre líneas Z. Se consideraron solo aquellos sarcómeros que se encontraban en estado de relajación e íntegros en su estructura. Se observó que la longitud de los mismos no presenta diferencias estadísticamente significativas.



**Gráfica No. 7:** Muestra el diámetro mitocondrial promedio para los tres grupos trabajados. Se consideraron solo las mitocondrias que se evaluaron como normales midiendo solo el diámetro menor (ver pag. 93). Se determinó que no hay diferencia significativa entre grupos.

## 7. DISCUSION

### 7.1 ASPECTOS CUALITATIVOS

De acuerdo con el análisis tisular se encontró que hay una gran relación entre los cambios provocados por la oclusión coronaria. Con respecto al grupo 1 se observaron varios daños en el grupo 2 en mayor grado que en el grupo 3.

El grupo 2 se caracterizó por el desarreglo de bandas, así como la ausencia de las mismas lo que indica despolimerización, la presencia de espacio intercelular indica edema presente en el tejido de corazones sometidos a anoxia (4). La existencia de cromatina migrada a la periferia en este grupo indica la gran actividad a la que es sometido el miocito durante dicho proceso (97).

Entre los daños observados en los grupos 2 y 3 con respecto al grupo 1 se encuentran cambios relacionados a la pérdida de función como son la despolimerización de las proteínas contractiles en el miocito, la cual, provoca un adelgazamiento en las fibras con la consecuente expulsión de líquido intercelular que provoca edema y por tanto el aumento en el espacio intersticial posteriormente la célula evoluciona a un estado de necrosis lo que propicia una respuesta inflamatoria para remover el tejido necrosado.

Inicialmente se observó congestiónamiento, lo cual se atribuye a un aumento del flujo vascular en la circulación colateral que pretende substituir la falta del riego principal, unido a esto se presentan claras evidencias de hemorragia ésta se evaluó positivamente solo cuando se observó debida al fenómeno de diapedesis puesto que ello es también una respuesta a la falta de oxígeno, en la cual, se permite la salida de los eritrocitos para proveer de oxígeno

a la células que presentan un daño reversible, por otra parte junto con las células es expulsado también el plasma que contribuye a la presencia de edema. Lo anterior es la causa de un aumento en la infiltración leucocitaria y con ello un aumento en la presencia de macrófagos puesto que son las células encargadas de retirar a las células necrosadas.

Los cambios observados no se dan en el orden mencionado porque todos ellos ocurren de manera simultánea unos como respuesta a otros, muestra de ello es la apatencia titorial debida a los cambios bioquímicos que sufre la célula en estado de anoxia y aún de necrosis donde hay una disminución en el pH y se favorece en el tejido la fijación del colorante de carácter básico dando la coloración azul presente con mayor intensidad en las muestras del grupo 2.

En general también se cumple que en el grupo 3 el grado de alteraciones ultraestructurales disminuye considerablemente con respecto al grupo 2.

Con dicho análisis ultraestructural fué posible evidenciar cambios intracelulares que se correlacionan con las observaciones a nivel óptico como son el desarreglo estructural de los sarcómeros debido a la despolimerización de los filamentos de actina y miosina, se observó claramente el fenómeno de pérdida de miofibrillas por el porcentaje de área que estas ocupan con respecto a el número de mitocondrias y el espacio plasmático.

Así mismo se observó el fenómeno de formación de vesículas subsarcolemicas y con ello la deformación del sarcolema dando lugar a estructuras con apariencia de olan y a veces desprendimiento de la unión del sarcoléma y miofibrillas (conexión del tubulo T con la línea Z).

Se corroboró la intensa actividad a la que se encuentran sometidos los miocitos pues en las muestras del grupo 2 se observaron repetidamente núcleos conteniendo heterocromatina migrada hacia la periferia.

Igualmente de la observación meramente cualitativa se determinó que en efecto los cambios presentados en la estructura de las muestras del grupo 2 con el 1 y del grupo 3 con el 2 eran debidos a los diferentes tratamientos en cada grupo.

Debido a la basta información que puede proporcionar una sola micrografía y el gran número de fenómenos que se pueden suponer en cada estructura presente en la misma, fué necesario limitar la observación de las muestras a dos estructuras: sarcómeros y mitocondrias para un análisis mas amplio en la parte cuantitativa del estudio.

## 7.2 ASPECTOS CUANTITATIVOS

Para los dos grupos se cumple que la zona 2 fué mas afectada que la zona 5 puesto que el número de muestras en las que se presentó daño es la que se presenta en la Tabla No. 11.

**TABLA No. 11: FRECUENCIA DE MUESTRAS QUE PRESENTARON CUALQUIER TIPO DE DAÑO POR ZONAS EN LOS GRUPOS 2 Y 3.**

Grupo 2 (n=8)		Grupo 3 (n=8)	
Zona 2	Zona 5	Zona 2	Zona 5
L= 36.36 %	L= 35.23 %	L= 43.18 %	L= 40.91 %
M= 26.14 %	M= 21.59 %	M= 12.50 %	M= 12.50 %
S= 12.50 %	S= 13.64 %	S= 0.00 %	S= 1.14 %
T= 75.00 %	T= 70.45 %	T= 55.68 %	T= 54.55 %

*L, leve; M, Moderado; S, Severo. T, Daño Total independientemente del grado y tipo del mismo.*

Por lo anterior podemos decir que la zona 2 al estar mas alejada del riego coronario es la que queda inicialmente expuesta a los efectos de la falta de oxígeno y por ello un porcentaje mayor de muestras presentan daños y en mayor severidad.

Por otra parte se pone también de manifiesto que en el grupo previamente tratado con Ropitofna hay un menor número de muestras que presentan daño (Zona 2= 55.68 % y Zona 5= 54.55%) en comparación con el grupo 2 (Zona 2= 75.00 % y Zona 5 70.45%) y por tanto esta variación es debida al efecto protector de la Ropitofna.

A nivel ultraestructura se comprueba estadísticamente que no hubo diferencia para todos los parámetros evaluados (mitocondrias totales , normales y dañadas por unidad de área, tamaño del sarcómero y diámetro mitocondrial) en los animales de un mismo lote (sometidos al mismo tratamiento), es decir que no hubo diferencia entre los animales del grupo 1 (Control sin oclusión), del grupo 2 (control con oclusión y sin tratamiento) y del grupo 3 (con tratamiento de ropitofna previo a la oclusión coronaria), esto indica que los grupos se comportaron homogéneamente.

Comparando el grupo 1 con el grupo 2 se observa una disminución en el número de mitocondrias totales lo cual es congruente con varios estudios (17,34,37), esto se atribuye a la lisis mitocondrial por falta de oxígeno.

Sin embargo, el número de mitocondrias dañadas es mayor en el grupo 2 lo cual afirma un grado de afección mayor debido a la isquemia por oclusión.

Lo mas sobresaliente es el 40.46 % menos en el daño mitocondrial en el grupo 3 con respecto a 2 lo cual nuevamente afirma el efecto benéfico de la Ropitofna.

El tamaño de los sarcómeros no presentó una variación significativa entre grupos, esto se atribuye a que se realizó la medición de la longitud del sarcómero solo en aquellos que se encontraban íntegros y en estado de relajación, esto corrobora el hecho de que la ultraestructura miofibrilar no fué afectada por el procesamiento de las muestras ya que la longitud medida para los tres grupos va de 2.3 a 2.6 micras, rango que se encuentra dentro del tamaño del sarcómero reportado antes por otros autores (4,45,47,26,49,67).

En cuanto al diámetro mitocondrial, éste tampoco presentó variación significativa entre grupos, esto es lógico pensando en que para realizar la medición se tomaron en cuenta solo aquellas mitocondrias cuya estructura se observó íntegra es decir aquellas que se identificarón como mitocondrias normales, sin embargo comparando los diámetros promedio de los grupos los cuales son:

1)control sano= 0.79 micras; 2)control con oclusión= 1.07 micras y 3)tratado con Ropitofna = 1.16 micras, observamos que se presenta cierta tendencia a un aumento en el diámetro mitocondrial, el cual, puede ser provocado por hipertrofia mitocondrial como respuesta celular ante la isquemia hecho que han mencionado algunos autores (1,2,3,4,7). Otra explicación es que debido a los cambios bioquímicos que intercelularmente tienen lugar en condiciones de anoxia, la membrana mitocondrial se vuelve permeable y permite la entrada de líquido sarcoplasmático. Una tercer teoría es que simplemente al estar habiendo despolimerización de las proteínas contractiles se proporciona un espacio mayor en el cual de cierta manera se libera la mitocondria y puede ocupar un mayor espacio.

De cualquier manera para tener un mayor control en estudios cuantitativos se hace necesario contar con equipos mas sofisticados que permitan determinar con mayor exactitud cualquier parámetro.

Se recomienda para posteriores estudios el estandarizar la dirección del corte del tejido así como tratar de infiltrar y obtener los cortes para MET en la misma dirección y del mismo tamaño tratando con ello el tener un mayor control y homogeneidad en los resultados obtenidos.

## 8. CONCLUSIONES

- SE CARACTERIZO A NIVEL TISULAR Y ULTRAESTRUCTURAL AL TEJIDO CARDIACO DE RATA MEDIANTE TECNICAS DE MICROSCOPIA OPTICA Y MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRANSMISION RESPECTIVAMENTE.

- SE DETERMINARON LOS CAMBIOS TISULARES QUE SE PRESENTAN AL INDUCIR EL INFARTO MIOCARDICO MEDIANTE LA OCLUSION EXPERIMENTAL DE LA RAMA DESCENDENTE ANTERIOR IZQUIERDA DE LA ARTERIA CORONARIA, LOS CUALES SON: ADELGAZAMIENTO, DESPOLIMERIZACION, ONDULAMIENTO U NECROSIS COAGULATIVA DE LAS FIBRAS CARDIACAS. EDEMA, HEMORRAGIA, CONGESTIONAMIENTO Y AUMENTO DEL ESPACIO INTERCELULAR. INFILTRACION LEUCOCITARIA ESPECIALMENTE DE MACROFAGOS Y AUMENTO DE FIBROCITOS Y FIBROBLASTOS.

- SE DETERMINO QUE LOS CAMBIOS ULTRAESTRUCTURALES DEBIDOS A LA OCLUSION CORONARIA SON: PRESENCIA DE HETEROCROMATINA MIGRADA A LA PERIFERIA NUCLEAR, DESPOLIMERIZACION DE SARCOMERO, DAÑO Y LISIS DE LA ESTRUCTURA MITOCONDRIAL, AUMENTO EN EL ESPACIO SUBSARCOLEMICO Y DAÑOS EN LA MEMBRANA MIOCITICA QUE VAN DE DESPRENDIMIENTO HASTA RUPTURA DE LA MISMA.

- SE DETERMINO QUE EL NUMERO DE MITOCONDRIAS POR UNIDAD DE AREA DE TEJIDO ASI COMO EL DAÑO QUE ESTAS PRESENTAN ES UN BUEN PARAMETRO PARA EVALUAR EL DAÑO DEBIDO A LA OCLUSION CORONARIA EN EL MODELO EXPERIMENTAL EMPLEADO.

- SE DETERMINO QUE EL EFECTO DE LA ROPITOINA SOBRE EL INFARTO MIOCARDICO INDUCIDO ESPERIMENTALMENTE EN LA RATA ES BENEFICO YA QUE DISMINUYE LOS DAÑOS PROVOCADOS POR LA OCLUSION CORONARIA. SIN EMBARGO, NO SE PUEDE AFIRMAR QUE DICHO EFECTO PROTECTOR SE DEBE A UNA ACCION A NIVEL ULTRAESTRUCTURA YA QUE PUEDE SER UNA RESPUESTA POR SU EFECTO PRIMARIO COMO ANTIARRITMICO.



## APENDICE I: TECNICA DE PERFUSION DEL CORAZON "IN SITU"

### PERFUSION COMO MEDIO OPTIMO DE FIJACION

El método de la perfusión vascular es hasta hoy el mejor para fijar la ultraestructura de los tejidos a observar con el microscopio electrónico.

Los primeros investigadores (Nilsson, 1958) que trataron de poner a punto esta técnica usando tetróxido de osmio, fracasaron en su intento por que este fijador producía una vasoconstricción tan intensa que cerraba casi completamente el lecho vascular tan pronto como le llegaba el líquido fijador inyectado por el sistema canalicular arterial (12).

Hubo que tener en cuenta desde el principio que la perfusión había que realizarla rápidamente y a cierta presión a través del árbol arterial para que se disemine el fijador lo antes posible por los tejidos y que, por tanto, convenía abrir en este o en el árbol venoso un drenaje adecuado.

Para evitar dislaceraciones tisulares y alteraciones mecánicas se debe hacer la inyección de las distintas soluciones a una presión conveniente, que será la que corresponda a la tensión arterial máxima del animal de laboratorio que se emplee. Para lograr esta, que en términos generales es de 100mm de mercurio para los pequeños animales de laboratorio, se recurre a situar los frascos que contienen las distintas soluciones a la altura conveniente sobre el corazón del animal, para que el flujo de la solución al salir sea de la presión deseada (98).

Si se trata de fijar todo el animal, se analizarán los distintos catéteres a nivel de las cámaras auriculares (arterial y venosa) del corazón, estando el animal bajo anestesia. Si se trata de fijar solo la cabeza ( o parte superior) se procederá a inyectar a través de la aorta abdominal retrógradamente y a hacer un drenaje mediante la vena cava superior y las venas yugulares.

Cuando se trata de perfundir un determinado órgano muy pediculado, se recurrirá a su hilio vascular, introduciendo el catéter en su arterial principal y abriendo para drenaje la vena más gruesa (64).

Es necesario que durante las primeras manipulaciones se mantenga el animal vivo con anestesia, que el corazón esté latiendo y el pulmón ventilándose, por que se debe evitar la entrada de aire en el sistema vascular que entorpecería la fijación, y esto solo se asegura viendo que sale alguna sangre por la cánula al recambiar o enchufar el sistema de perfusión.

Los tiempos que debe fluir o perfundir cada solución varían con arreglo al fijador empleado (tetróxido de osmio, formaldehído y glutaraldehído) (43). En general lo primero que se inyecta es la solución lavadora, a continuación se deja perfundir la solución fijadora. La velocidad de perfusión se controla por un cuentagotas, como las que se usan en clínica médica para la administración de sueros continuos en vena, donde se apreciará un goteo constante.

Cuando la perfusión es con glutaraldehído se puede dejar en la solución buffer. En este caso se debe hacer una postfijación con tetróxido de osmio, troceando el tejido en bloquitos de 1 a 2 mm (56).

Como a los tejidos fijados así mediante la doble fijación, no les penetra bien el ácido ósmico, se les debe dar una tinción en bloque (antes de la deshidratación) con acetato de uranilo al 2%, o una tinción sobre los cortes con acetato de plomo, según MILLONIG (1961).

### **Extension y Direccion del Flujo de Perfusión**

Se puede emplear la vía abordaje (Canulación), bien arterial o bien venosa, y en cada una de ellas la dirección del flujo y del líquido fijador puede ser contra corriente o a favor de la corriente, es decir, que habrá una perfusión anterógrada y una perfusión retrógrada. Ambas pueden realizarse para todo el organismo (perfusión total) o para parte de él (perfusión parcial), debiendo en este último caso ligar las arterias o venas correspondientes.

### **Presión de Perfusión**

La manera mas exacta de realizar esta es dejar caer el líquido según su fuerza de gravedad al colocar su recipiente a una altura sobre el corazón del animal. Se suele situar a 120 cm de altura (PEASE) o a 150 cm (PALAY).

### **Anestesia**

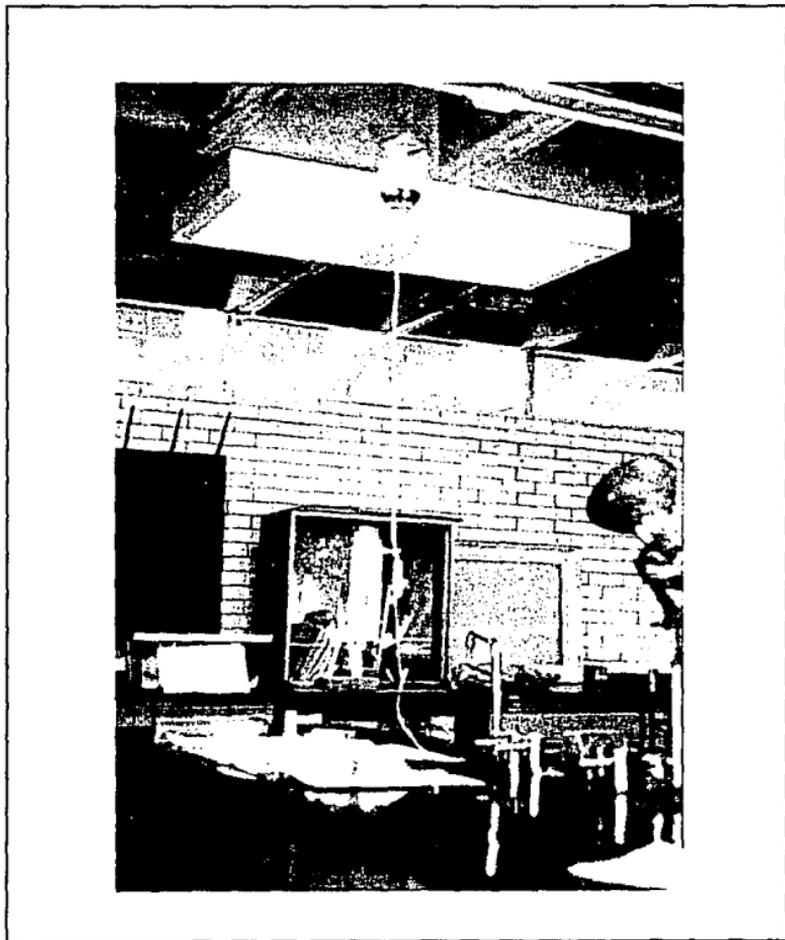
Para mejor éxito de la perfusión se debe anestesiarse el animal a fin de que la perfusión se realice in vivo, y si es necesario se practicará la respiración artificial. Los animales pequeños pueden ser anestesiados con vapores de éter.

### **Ventajas**

- La primera ventaja es que se gana tiempo en recobrar el tejido situado profundamente, aunque luego haya que proceder a una segunda fijación con tetróxido de osmio.
- La segunda ventaja es que se obtiene una dureza inicial del tejido, lo cual facilita la disección y manipulación sin producir daños mecánicos.
- Los tejidos no pierden su grado de hidratación vital.
- La forma del tejido se conserva.

### **Desventajas**

- Mala fijación de los tejidos, que están poco vascularizado.
- Hay que emplear grandes volúmenes de líquido fijador, que en el caso del OsO<sub>4</sub> resulta caro.
- Precauciones en el empleo del ácido ósmico.



*Fig 15: Aparato de Perfusión Empleado durante la experimentación.*

## APENDICE II: TECNICAS DE PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA MET

### 1) FIJACION Y POSTFIJACION.

Por la rapidez de acción del fijador y por preservar muy bien los tejidos más delicados se empleó la fijación in situ en tejido muscular, que se puede trocar después con la mínima dislaceración mecánica.

Esta técnica de fijación in situ puede ser realizada, bien sobre las superficies naturales, mediante una fijación tópica, bien sobre superficies cortadas y situadas profundamente en el organismo (29).

Para los dos casos se precisa la operación quirúrgica y mucho más en el caso de superficies recién cortadas. Cuando se trata de estudiar y fijar las superficies naturales, el traumatismo mecánico es reducido al mínimo y el tejido es fijado vivo mientras continúa circulando la sangre, no necesitándose operación quirúrgica alguna.

Hay muchos líquidos fijadores en uso para microscopía electrónica, pero todos ellos tienen como producto químico activo básico algunos de estos: tetróxido de osmio, algunos aldehídos, permanganato potásico, sales de cromo, ácido fosfotúngstico, acetato de uranilo, plomo e incluso la congelación rápida (29,42,43)

### TETROXIDO OSMICO

El tetróxido de osmio es el mejor fijador para microscopía electrónica (12,43) Para que la solución se vea libre de la contaminación orgánica, que reduciría el ácido ósmico, haciéndole perder su actividad, las ampollas en las que vienen los cristallitos de tetróxido ósmico se lavarán previamente para quitar su etiqueta y cualquier resto de pegamento y se tratará de romper la ampolla en el interior de un frasco con agua destilada.

Con los mismos fines de evitar la acción reductora de la luz, la solución de tetróxido ósmico se guarda en frascos color ambar.

El único inconveniente que se le ha puesto al tetróxido de osmio es que resulta muy caro (12).

Los cristales de ácido ósmico se disuelven muy bien en agua, pero tarda bastante tiempo (3-4) días en realizarse, acelerándose su disolución a una temperatura ligeramente caliente (25-30° C).

#### Precauciones:

El tetróxido ósmico es muy perjudicial por su intensa acción de fijador para los tejidos orgánicos.

En general puede causar dermatitis, y hay que tener cuidado con sus vapores que son frecuentemente inadvertidos hasta que causan su efecto lesivo. A nivel de los ojos se produce una conjuntivitis irritativa muy molesta, que obliga, a veces a suspender la experiencia, por lo que se ha recomendado la protección con gafas cerradas o manejar el producto dentro de una cámara que elimine sus vapores.

#### Concentración

La concentración a preparar de ácido ósmico depende del uso que se vaya a dar a la misma. La concentración utilizada para esta experiencia fue la de 1%.

### TECNICA GENERAL DE FIJACION

Como la fijación de los tejidos para microscopia electrónica debe ir seguida inmediatamente de la deshidratación y de la inclusión, hasta lograr finalizarlo con la obtención de los bloques de inclusión endurecidos por polimerización de los distintos monómeros que engloban el tejido fijado.

El proceso total es muy largo, llegando a unas 35hrs, aproximadamente, en estas horas van incluidas las previas a la fijación, que suele ser media hora de preparativos para desmenuzar y fragmentar el tejido y 2 horas para que actúe el tetróxido de osmio.

El proceso completo se realiza en 3 días consecutivos ya que después de que actúa el tetróxido de osmio se puede dejar en alcohol del 96, donde puede pasar toda la primera noche en el frigorífico. La segunda noche la pasa también, en la resina-epoxi.

Una vez que el órgano de estudio se fijó por perfusión, se extrae y es lavado con buffer pH 7.2, este es rebanado y se obtienen cubos de aproximadamente 1mm de espesor, estos trozos son colocados en pequeños frascos que contienen buffer pH 7.2 y son lavados 3 veces cada 10 minutos, finalmente son colocados en el tetróxido de osmio el cuál se deja actuar por 2 horas.

## 2) DESHIDRATACION

Las razones fundamentales por las cuales es necesario extraer el agua de los tejidos es, para que pueda penetrar el medio líquido o semifluido que servirá de soporte permitiendo una verdadera inclusión del tejido. Si quedara algo de agua en este, se podría polimerizar irregularmente y producir artefactos. Y para que los cortes que se obtengan puedan ser introducidos en el alto vacío del microscopio electrónico.

Los tejidos se pueden lavar en agua destilada o en buffer por 10 a 15 minutos antes de proceder a la deshidratación. También se procede a un lavado con tampón sucrosa cuando se ha fijado con glutaraldehído y se desea hacer una segunda fijación con tetróxido ósmico. Después de la acción del último fijador es cuando con más razón se procede a la deshidratación.

A fin de extraer el agua del tejido se sumergen en líquidos anhidros ávidos de agua, como son: el alcohol (etílico, metílico, amílico y butílico), el cloroformo ó la acetona.

La deshidratación del tejido para microscopía electrónica conviene que sea lo más perfecta posible y realizada en forma gradual en concentraciones de alcohol crecientes y progresivas.

La deshidratación se hará sumergiendo el tejido en soluciones de concentración creciente (alcohol 30,50,70, 80, 96 ° durante un tiempo total de una hora, hasta llegar a una concentración pura de 100%. Para la certeza de una buena deshidratación, el último baño debe ser de alcohol absoluto.

Los baños en alcoholes de concentración creciente se verifican así, con el fin de evitar corrientes bruscas de deshidratación que podrían traer como consecuencia algunas alteraciones ultraestructurales o, por lo menos la provocación de una retracción brusca del tejido.

El tiempo total que dura la deshidratación depende del tamaño de los trocitos de tejido, pero no debe ser menor de dos horas y puede ser mucho más, puesto que la permanencia prolongada del tejido en el alcohol absoluto no perjudica al tejido. Si no se deshidrata bien el tejido con alcoholes cada vez más puros, que actúen en tiempo suficiente, se expone uno a que no se realice adecuadamente la infiltración del medio de inclusión y que los cortes aparezcan con finísimos agujeros al observarlos al microscopio electrónico (29).

### SOLVENTES INTERMEDIARIOS

Antes de proceder a la infiltración del medio de inclusión es preciso realizar una perfecta eliminación del alcohol absoluto que contiene el tejido después de su deshidratación, ya que el tejido en ese momento se encuentra embebido por el alcohol, este impide la penetración del medio de inclusión ( por ser insoluble en alcohol) siendo entonces necesario reemplazar el alcohol por un líquido o solvente intermediario que tenga simultáneamente las características de ser miscible en el alcohol absoluto y en el medio de inclusión que se vaya a emplear.

Si no se elimina totalmente el alcohol absoluto del tejido, se expone uno a producir fuertes retracciones y a no obtener posteriormente cortes ultrafinos con satisfacción.

El solvente intermediario que proporciona excelentes resultados es el óxido de propileno. El líquido intermediario se llama así por que sirve de solvente de transición para el paso siguiente de la inclusión.

### 3) INCLUSION

La inclusión o infiltración es el acto de introducir el tejido biológico, ya fijado previamente antes, en un medio líquido o semifluido que , al solidificarse después, pueda dotar al tejido de una consistencia que le permita ser cortado en láminas finas (58).

Para realizar una inclusión en microscopía electrónica se necesita: una deshidratación perfecta del tejido y que este sea infiltrado por un medio líquido que posteriormente se endurezca y al pasar a este estado sólido no altere la ultraestructura del tejido. La dureza adquirida por la inclusión debe ser la apropiada para practicar cortes ultrafinos.

Como medios de inclusión se usan, por lo general, compuestos no solubles en agua, como son los metacrilatos, las resinas epoxi y las resinas poliéster, y con menos éxito algunos medios solubles en agua.

Los pasos fundamentales de la inclusión : deshidratación solventes intermediarios, infiltración, temperatura, polimerización o endurecimiento y la orientación del tejido.

#### Características del Medio de Inclusión :

- Debe ser líquido o semifluido
- Debe ser miscibles con los solventes intermediarios.
- Debe penetrar rápidamente en el tejido
- Solidifique por la acción del calor
- No debe aumentar ni disminuir su volumen al pasar del estado líquido a sólido.
- Que adquiera dureza adecuada.
- debe ser soluble en alcohol.
- Debe tener baja viscosidad.
- Polimerizar uniformemente.
- Resistir el bombardeo del haz de electrones.
- Los cortes que se obtengan se deben desprender fácilmente y solos del borde de la cuchilla y flotar en el agua del pozo.
- Consistencia uniforme para asegurar el no desplazamiento del tejido mientras este se corta.

#### Temperatura de Inclusión.

A partir, de la deshidratación, el tejido a incluir estará a la temperatura ambiente del laboratorio (se recomienda 18 ° C) hasta que se encuentre en el medio de inclusión.

Como en el medio de inclusión ha de estar el tejido unas 24 horas para que se verifique la infiltración, después se puede guardar durante la noche en el refrigerador a la temperatura de 4 a 10 ° C, con el fin de que no se acelere la polimerización del medio de inclusión. Al final de esto habrá que dejarla que pase a temperatura ambiente para manipularla.

Después de llenar las cápsulas de inclusión, se someten a más altas temperaturas de modo gradual.

En el trabajo original de LUFT (1961) se recomienda realizar la polimerización del Epon con temperaturas crecientes en la siguiente forma: Toda una noche a la temperatura de 35°C , y todo el día siguiente a 45 y a 60° C durante la próxima noche.

### **Tiempo de Infiltración e Inclusión.**

Para la inclusión en Epón se suelen usar 2 días consecutivos con una utilización aproximada de 6 horas para el primer día y 4 horas para el segundo, para que se verifique la infiltración, y 2 ó 3 días para que se realice la polimerización en la estufa.

El líquido intermediario hay quien lo pone solo (sin mezclarlo con el medio de inclusión), actuando durante 2 horas y renovándolo por líquido limpio en la mitad del tiempo.

Para una más perfecta infiltración se tiene también previamente de 12 a 24 h en la mezcla de óxido de propileno-Epon en concentraciones decrecientes del primero.

### **Polimerización.**

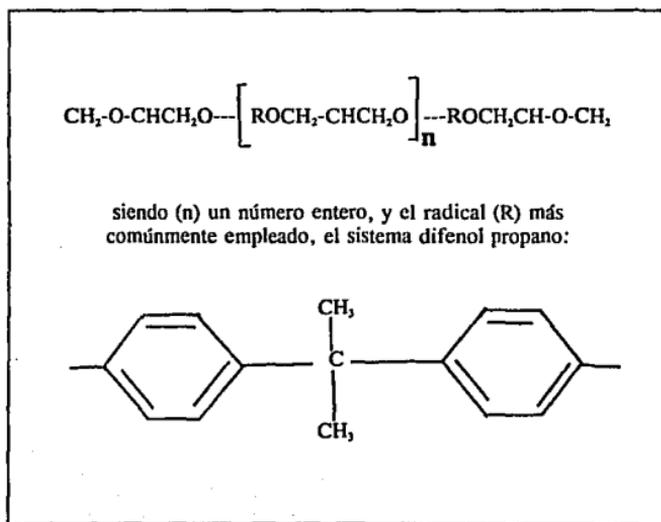
En los polímeros intervienen en la asociación de sus moléculas reversibles, simple y únicamente, las fuerzas de VAN DER WAALS, por lo que se denominan polímeros típicos. En los polímeros irreversibles se crean nuevos grupos atómicos por que hay un cambio de distribución de valencias al asociarse sus moléculas monómeras, o bien porque ceden electrones una o otra y al quedar como iones de signos contrarios se atraen electrostáticamente, o bien porque los electrones de un átomo se comparten con los del otro y serán comunes a ambos.

Según esto podemos definir la polimerización como un proceso de reacción intramolecular capaz funcionalmente de proceder de modo indefinido, y originar macromoléculas que pueden tener propiedades plásticas.

Los polímeros plastómeros tienen por característica la plasticidad y el no ser elásticos. Entre estos los hay termoplásticos (como, p. ej., el celuloide y el nylon) y los hay termoestables (como p. ej., los gliptales, la baquelita, las resinas epoxi y las resinas acrílicas).

Las propiedades de estas resinas epoxi y acrílicas son las que dan la base para utilizarlas el estado monómero como medio de inclusión en microscopía electrónica.

Las resinas epoxi químicamente son éteres poliacríficos de grupos terminales epoxi de aspecto glicerolado, a las que puede ser aplicada la siguiente fórmula general la que se muestra en la figura 16.



*Fig.16: Estructura general de las resinas Epoxi.*

## CARACTERISTICAS GENERALES DEL EPON

Para una perfecta inclusión de tejidos biológicos se debe emplear una resina epoxi al estado monómero (líquido) de base glicerolada, de baja viscosidad, que es endurecida con dos tipos de anhídridos, a cuya mezcla se le añade una amina terciaria que acelera la reacción de polimerización a modo de catalizador, al ser sometida a la acción del calor.

El epon-812 es una resina epoxi alifática de baja viscosidad, de base glicerolada, líquida, de color blanco amarillento.

El Epon-812 es soluble en alcohol y acetona, este se endurece con dos tipos de anhídrido: dadocetil succínico anhídrido DDSA, y el metil-nádico anhídrido MNA. A esta mezcla se le añade una amina terciaria, el 2-4-6-tridimetilaminometil-phenol DMP-30, que a modo de acelerador cataliza la reacción.

El MNA es un endurecedor más enérgico que el DDSA. El taco de inclusión que se forma por la acción del calor y del catalizador es de gran consistencia, de una dureza muy conveniente y de color amarillo claro.

### Ventajas del EPON-812

- La polimerización se realiza uniformemente endureciéndose el taco de inclusión sin tensiones internas ni retracciones.
- La resistencia de los cortes es mucho mayor que la del metacrilato y la araldita.
- Los cortes - aunque muy finos- es posible montarlos sobre rejillas sin membranas, porque resisten mucho el bombardeo del haz de electrones.

### Desventajas

Los ligeros inconvenientes del Epon comparado con la Araldita son:

- Que sus cortes no son susceptibles de estirarlos con toluol.
- Que los productos han de conservarse en frigorífico y no a temperatura ambiente.

### APENDICE III: TECNICAS DE OBTENCION DE CORTE FINO

#### PREPARACION DE BLOQUES DE INCLUSION

Los bloques de inclusión obtenidos de los distintos medios de inclusión han de ser sometidos a una preparación previa antes de situarlos en un ultramicrotomo para ser cortados.

La primera manipulación consiste en desproveer al bloque de inclusión de la cápsula, y la segunda, el realizar el tallado del bloque, formando una pequeña pirámide truncada que contenga en su vértice truncado solamente el tejido biológico de que se trate.

Para tallar un bloque de inclusión se ha de comenzar por situarlo perfectamente acoplado a una mordaza.

A fin de que al cortarlo luego exista el menor riesgo de vibraciones, el bloque debe sobresalir de la mordaza lo menos posible, y casi solo lo imprescindible, para poderlo tallar y que quede el trozo de tejido en la pirámide algo sobresaliente.

Para ellos el bloque se debe cortar por el lado opuesto a donde está el tejido, a la distancia conveniente para que salga de la mordaza lo justo y que se apoye en el fondo de la misma para cobrar solidez aparte de evitar que se dilate el bloque en dicho sentido al ser apretado en la mordaza.

La operación del tallado de los bloques de inclusión consiste en la realización de una pirámide truncada, cuadrangular, en cuya parte más sobresaliente (parte truncada) quede incluido exclusivamente el trozo de tejido, y de tal forma que las aristas las forme el mismo tejido y la superficie truncada sea toda de tejido (fig. 17)

La pirámide debe ser de rampas de poca pendiente, porque, de lo contrario, ello contribuiría a que sobresaliera del bloque mucho la parte truncada, y provocaría vibraciones nocivas en el momento del corte y, en consecuencia, secciones comprimidas.

Según como se talle la pirámide, los cortes serán cuadrangulares, rectangulares o irregulares, pero siempre deberán ser por lo menos, de dos lados paralelos. Prácticamente se ha visto que cualquiera de las tres o cuatro formas, es satisfactoria si su superficie es menor de un milímetro cuadrado.

El piramitomo es un aparato que realiza mecánicamente el tallado de los tacos.

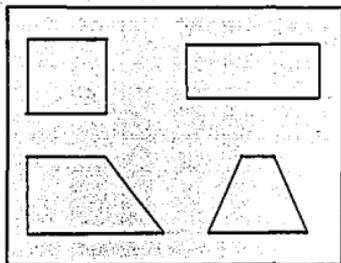


Fig. 17: Formas de pirámides útiles para obtener cortes seriados.

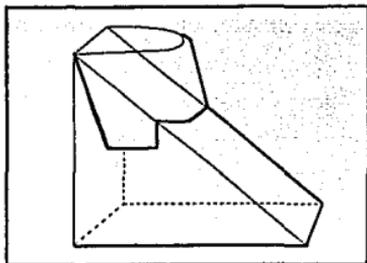


Fig. 18: Cuchilla de cristal con solapa para formar el pozo o bote.

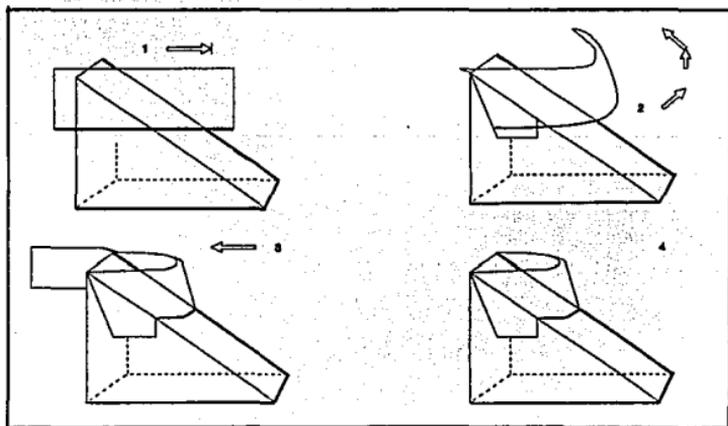


Fig. 19: Esquema de colocación de la solapa para formar el pozo con cinta.

## CUCHILLAS

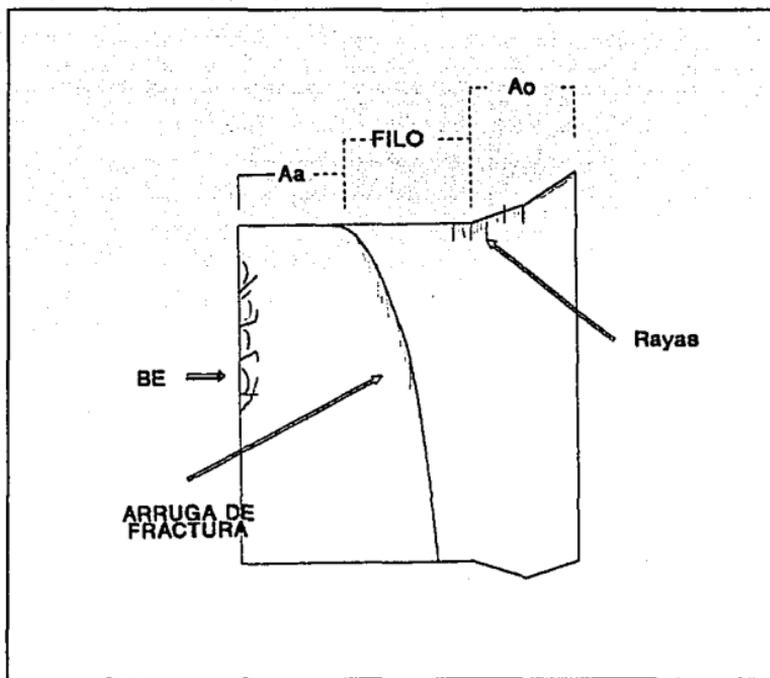
Se fabrican cuchillas de cristal, diamante y de corión artificial. La introducción de las cuchillas de cristal en la técnica de microscopía electrónica se debe a Latta y Hartman (1950).

Con las cuchillas de cristal se trata de obtener un borde cortante que será el filo de la cuchilla, a modo de una arista entre dos superficies de fractura. A estas cuchillas es preciso acoplarles un sencillo dispositivo para que se pueda colocar un líquido (agua) que bañe toda una vertiente de la cuchilla hasta llegar casi a mojar el filo de la misma (fig. 18). A este fin se precisa poner a las cuchillas recientemente hechas lo que denominamos solapas para hacer un pozo que se llena con agua. Para que este no tenga la más mínima pérdida de agua la solapa se aísla con parafina (fig. 19) A fin de que el borde cortante sea perfecto, útil y no se contamine, las cuchillas se deben preparar en el mismo momento de su uso, y se deben guardar de forma que su filo no se contamine con el polvo del aire. La forma de la cuchilla suele ser triangular con un ángulo recto. De los otros dos ángulos agudos, uno es el empleado para cortar. Este debe ser de unos 45°. Al fracturarse el cristal se produce una superficie que está surcada por una línea a modo de arruga de forma curvada, que comienza en un ángulo de dicha superficie puede ser el derecho o el izquierdo, y tiene una caída más o menos brusca, tendiendo a aproximarse más o menos al filo de la cuchilla. En el lado del borde, donde concluye la arruga de fractura, se forman irregularidades debidas a ser el lado por donde se produjo la marca rayada con el cortavidrios, por lo que se denomina borde escarificado (fig. 20)

El filo de la cuchilla tienen tres zonas distintas que acaban en dos ángulos. El ángulo del borde escarificado y el ángulo opuesto que forma un pico de deflexión más o menos acusado.

Las tres zonas del filo de la cuchilla son:

- Una hacia el borde escarificado, que es tanto más extensa cuanto que la arruga de fractura camine más tiempo casi paralelo al filo. Puesto que el ángulo es muy agudo no es útil para cortar.
- Otra zona hacia el lado opuesto, que forma el pico de deflexión y no es útil tampoco
- La tercera zona del filo está comprendida entre las dos anteriores y es más o menos amplia según la extensión de las otras dos zonas. Esta es la zona más útil para cortar.



*Fig. 20: Representación de una cuchilla de cristal donde se observa el filo útil.*

#### Condiciones Óptimas de las Cuchillas.

- 1.- Carecer de borde escarificado.
- 2.- Mínimas irregularidades en el borde opuesto.
- 3.- Arruga de fractura de cada brusa.
- 4.- Ausencia de pico de deflexión.
- 5.- Línea de corte completamente recta.
- 6.- Ausencia de finas y pequeñas rayitas sobre el filo.

### **Método de Obtención de Cuchillas.**

Por fractura mecánica, por el método de la máquina de hacer cuchillas L.K.B.

El funcionamiento técnico de acción de esta máquina es el de fractura mecánica por presión, después de haber sido rayado el cristal. Tiene un equilibrado sistema amortiguador que evita toda serie de vibraciones perjudiciales en el momento de hacer la fractura del cristal al absorber la energía cinética que se produce en la fractura.

### **Solapas para las Cuchillas**

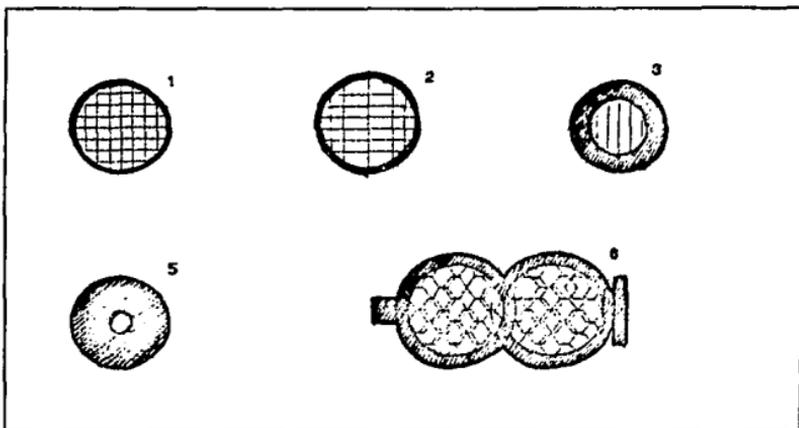
Se llama solapa al dispositivo especial que abraza a la cuchilla para poder formar sobre ella un pequeño pozo donde se depositan unas gotas de agua (ver fig.19)

En primer lugar, se ha tener presente que la grasa habitual del sudor de las manos del operador puede ser motivo de contaminación de la superficie de la cuchilla donde luego ha de pegarse la solapa, las cuchillas se deben manipular lo menos posible y agarrarlas por los sitios no peligrosos a este fin.

Prácticamente las solapas se realizaron con cinta adhesiva, ya que es muy rápida la ejecución de estas dando buenos resultados.

## **REJILLAS**

Se denominan rejillas, en la técnica de microscopía electrónica, a unas láminas perforadas, de malla finísima, y son soportes metálicos fabricados por procesos electrolíticos, de forma redondeada, con su parte central llena de finísimas perforaciones y su parte periférica con un borde sólido y liso (fig. 21) Las rejillas se deben manipular con mucho cuidado, utilizando una pinza de punta fina de acero inoxidable. Para poder coger las rejillas con mayor facilidad se recomienda situarlas sobre papel filtro, que será así como pueda agarrarse con las puntas de la pinza al estar parcial y ligeramente levantada la rejilla.



*Fig. 21: Distintos tipos de rejillas : 1, malla cuadrada; 2, malla rectangular; 3, finas y alargadas; 5, un solo orificio redondeado; 6, en forma de libro y malla hexagonal.*

*Durante la experimentación se utilizaron rejillas del tipo 1.*

## CORTES FINOS

Muchos son los factores que influyen en la consecución de cortes ultrafinos para obtenerlos con características óptimas:

- Espesor de 150 a 200 Å como muy óptimos.
- Consistencia suficiente para resistir un intenso bombardeo de electrones.
- Extensión suficiente que permita el estudios panorámico celular e intercelular.
- Que sean susceptibles de adquirir un buen contraste con los colorantes electrónicos.

Para obtener cortes de tejido de los que se pueda obtener un máximo rendimiento al observarlos al microscopio electrónico es imprescindible conocer ciertos factores, como pueden ser: los bloques de inclusión, el tejido incluido, el cristal a emplear, el ángulo de

ataque de la cuchilla, el avance del ultramicrotomo, el líquido del pozo, la extensión del corte, además de otras condiciones necesarias para el éxito final, como son: las vibraciones, la orientación de la pirámide tallada, el ambiente del laboratorio, el estiramiento de los cortes, la manipulación de los cortes.

#### Espesor de los Cortes.

Los cortes deben ser ultrafinos, pudiéndose evaluar los espesores convenientes, entre 150 a 250 Angstroms. Como directamente sería imposible medir las secciones que tuvieran este grosor, para despreciar los que sobrepasan estos límites, se recurre al método indirecto de apreciación del grosor mediante los colores de interferencia de la luz al refractarse sobre ellos. De una manera empírica se sabía que la luz blanca al incidir sobre un objeto lo ilumina de distintos colores según el grosor del mismo. Este fenómeno físico matemático, nos dice que es debido a los llamados colores de interferencia, que se producen por la descomposición de las distintas longitudes de onda de la luz blanca según la amplitud del grosor.

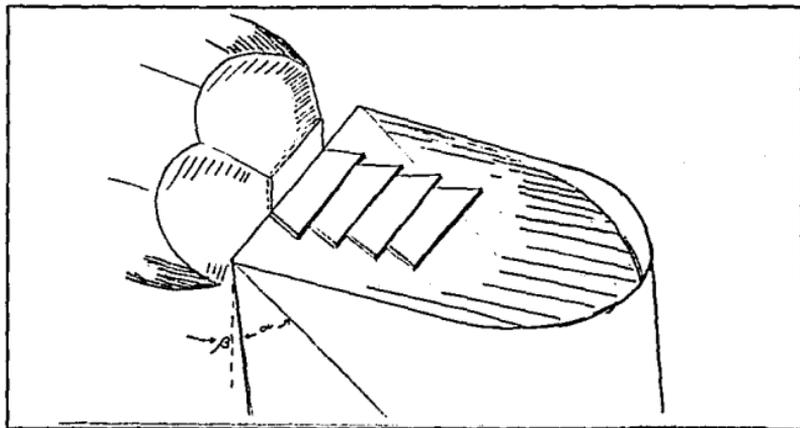
Estos colores los observamos en los cortes, según se van produciendo y mientras flotan en el pozo (fig. 22).

Una escala general ha sido dada en el año 1958 por Peachey para uso de los ultramicrotomistas, en donde se relaciona el grosor en Angstroms de los cortes con su coloración.

Color gris.....	600 Angstroms o menos.
Color plata.....	600 a 900 Angstroms.
Color Oro.....	900 a 1.500 A.
Color Azul.....	1.500 a 1.900 A.
Color Verde.....	2.400 a 2.800 A.
Color amarillo.....	2.800 a 3.200 A.

Los cortes de color gris son los que se deben usar para microscopía electrónica, aunque también se puede obtener algún rendimiento con los cortes de color plata, e incluso con los de color oro, aunque solo a muy bajo aumento.

La razón de necesitar cortes ultrafinos para el microscopio electrónico estriba en que tienen que ser transparentes, para dejar pasar el haz de electrones.



*Fig. 22: Representación de la obtención de cortes finos en el ultramicrotomo.*

La consistencia de los tacos de inclusión influye extraordinariamente en la obtención de cortes finos, hasta el punto de que solo es un rango determinado de consistencia se puede cortar. Los bloques blandos no ofrecen una resistencia lo suficientemente consistente para que sean cortados, por lo que es difícil obtener cortes finos por su excesiva elasticidad. Los bloques muy duros tienen una gran resistencia por lo que es imposible cortarlos además de mellar la cuchilla.

Una vez obtenidos los cortes, estos quedan flotando en el agua del pozo de la cuchilla.

Las vibraciones son muy perjudiciales para los cortes, puesto que las secciones saldrán irregulares y muy comprimidas, es por eso que para evitar en parte estas, se coloca el bloque de inclusión sin que sobresalga mucho de la mordaza, es decir solo debe sobresalir un trozo de la pirámide tallada.

Es frecuente que una vibración fuerte, como ocurre al cerrar la puesta del laboratorio, produzca una variación tal de las condiciones mecánicas de corte que origine secciones muy gruesas, o de grosores no uniformes.

#### Manipulación de los Cortes.

Los cortes, por diversas causas, pueden situarse en el pozo flotando en partes no fácilmente accesibles para montarlos en las rejillas, o pegarse a la solapa del pozo. Para situarlos de nuevo en el lugar de flotación conveniente, se puede utilizar un pelo fino de cabello montado sobre un palillo, que hace de mango, o una de las fibras de papel filtro. Con cuidado y mucho pulso se tratará de desplazar a los cortes sobre la superficie del agua, tocando y empujando la superficie del corte con el pelo, sin hundirlo y sin que se moje en el agua del pozo.

## SECCIONAMIENTO

Ante cualquier tipo de ultramicrotomo se comenzará por recuperar a su posición de partida todos los mandos, tanto el dispositivo de avance como los distintos avances del carro soporte de la cuchilla y su orientación normal.

La mordaza que lleva el bloque de inclusión se coloca en el extremo del vástago sobre el que se realiza el avance, apretándolo perfectamente para que forme con él una sólida unidad y no haya desviaciones o movimientos extraños al realizar el ciclo de corte.

El ángulo de posición o de ataque varía de 2 a 7 grados, según distintos factores, y sirve solo como una orientación que luego afina la experiencia de cada usuario.

La superficie de la pirámide no es perfectamente lisa, por que ha sido hecha manualmente con una cuchilla de afeitar, lo primero que se debe hacer, antes de realizar cortes, es pulir o abrillantar la superficie. Este abrillantamiento origina cortes defectuosos, de forma irregular y con agujeros.

El abrillantamiento cumple dos finalidades:

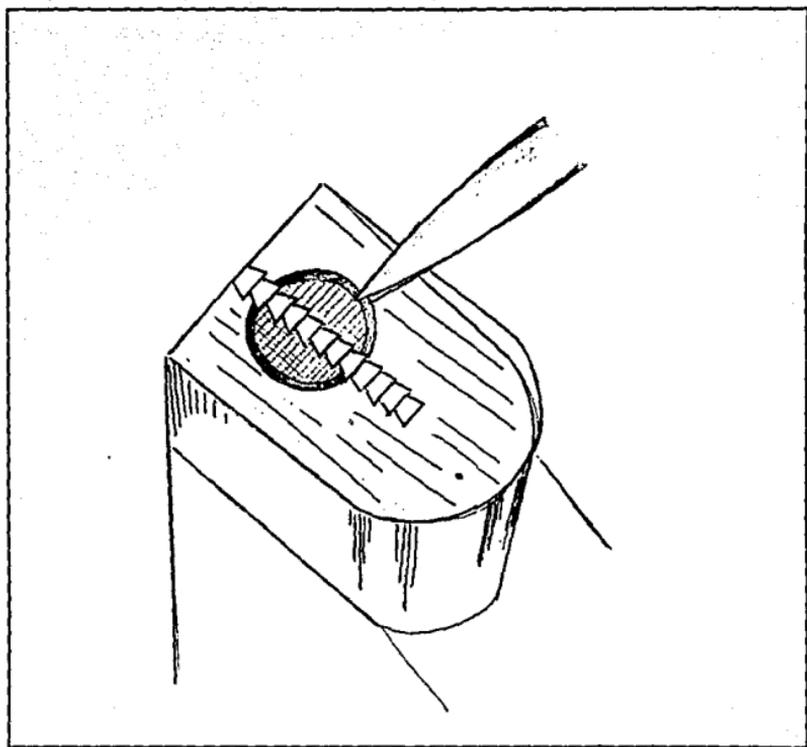
- Dejar la superficie de corte lisa
- Conseguir una orientación frontal y vertical de la superficie de corte.

### **Material y Condiciones para el seccionamiento**

- 1.- Ultramicrotomo.
- 2.- Una caja de petri vacía con papel filtro en su fondo.
- 3.- Caja de petri conteniendo rejillas.
- 4.- Frasco tapado conteniendo agua destilada.
- 5.- Jeringa con aguja.
- 6.- Pinza fina (relojero)
- 7.- Caja con papel filtro cortado.
- 8.- Cuchillas con solapa o bote
- 9.- Bloque de inclusión, previamente tallado para formar la pirámide.

### **Montaje de los Cortes.**

Se pueden seguir dos procedimientos distintos para lograr recoger los cortes. Uno es pescar los cortes cogiéndolos por debajo (levantándolos), y otro es pescar los cortes cogiéndolos por arriba (adhiriéndolos) (fig. 23). Una vez que se recogieron los cortes se seca el exceso de agua extraído entre las pinzas y la rejilla introduciendo un rectángulo de papel filtro entre las dos ramas de la pinza hasta llegar a absorber el agua por capilaridad. Se deposita la rejilla, ya seca, sobre un papel filtro dentro de la caja de petri.



*Fig. 23: Forma de recoger los cortes con la rejilla*

## APENDICE IV: TECNICA DE TINCION DOBLE ELECTROCONDUCTIVA.

### COLORANTES

En 1960 aparece un importante método de tinción con plomo. A pesar de que el plomo es muy eficaz en la producción de un intenso contraste sobre los cortes ultrafinos, y fue dado a conocer fue Watson en 1958 en forma de hidróxido, su gran dificultad residio en que formaba precipitados que contaminaban los cortes, que se cree son de carbonato de plomo.

El método más importante de coloración electrónica sobre cortes que se sigue empleando hasta hoy, es el dado por REYNOLDS en 1963 del citrato de plomo a pH alto (72).

Se emplea el citrato como agente reductor en cantidad suficiente como para que pueda retener todo el plomo y evitar que este se pueda combinar con el dióxido de carbono para formar carbonato de plomo insoluble, del que están originados los precipitados. El contraste que se produce en la imagen es más intenso por que ciertos sitios de los tejidos biológicos tienen mucho mayor afinidad para unirse con los cationes de plomo que con los de citrato.

Por ser el uranilo de un peso atómico muy elevado, se le ocurrió a Watson en 1958 emplear la sal de este metal pesado como colorante electrónico. Se ha visto que tiene una especificidad, sobre todo para teñir las proteínas. En general, los tejidos fijados con ácido ósmico incrementan su contraste.

### TINCION DOBLE

- 1.- Preparar solución de Reynolds (Nitrato de Plomo).
- 2.- Preparar solución acuosa saturada de uranilo (solución de Watson).
- 3.- Preparar dos cámaras húmedas, colocando cera en dos cajas de petri ó papel filtro, colocar unas gotas de agua sobre estos y poner varias hojuelas de hidróxido de sodio. Esto se realiza con el fin de eliminar el bióxido de carbono presente evitando así la precipitación de plomo del tinte de Reynolds.
- 4.- Colocar un pedazo de papel parafilm sobre la base de la cámara húmeda.
- 5.- En una caja colocar 2 gotas de solución de watson sobre el papel parafilm. Esto se realiza con una jeringa a través de un filtro metálico especial.
- 6.- En la otra caja colocar 2 gotas de solución de Reynolds sobre el papel parafilm, haciendo uso de un filtr de plástico especial.
- 7.- Colocar las rejillas sobre las gotas de la solución de Watson de manera que los cortes esten en contacto con la solución aproximadamente 15-20 minutos.
- 8.- Hacer 3 lavados con agua destilada de 5 minutos cada uno. El lavado debe ser metiendo y sacando constantemente la rejilla durante los 5 minutos.
- 9.- Secar las rejillas con papel filtro por uno de los extremos, evitando tocar los cortes.
- 10.- Colocar las rejillas sobre la solución de reynolds de manera que los cortes queden en contacto con la solución durante 15-20 minutos.
- 11.- Hacer 3 lavados consecutivos de 5 minutos cada uno con agua hervida (destilada).
- 12.- Secar las rejillas con papel filtro.
- 13.- colocar las rejillas en una caja de petri y meterlas en la estufa a 60 grados centígrados por 30 minutos.

**APENDICE V: PREPARACION DE SOLUCIONES.****BUFFER pH 7.2**

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  .....71.64g/lit

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .....27.6g/lit.

**TETROXIDO DE OSMIO**

- 1.- Quitar la etiqueta después de haber humedecido la ampolla conteniendo 1g de  $\text{OsO}_4$ .
- 2.- Lavar la ampolla con agua y detergente y finalmente con agua destilada.
- 3.- Poner la ampolla dentro de una botella ambar (usar pinzas, evitando tocar la ampolla).
- 4.- Agitar la botella para romper la ampolla.
- 5.- Agregar 100 ml de agua destilada y guardar la solución en refrigeración hasta que los cristales de  $\text{OsO}_4$  se disuelvan.

**PREPARACION DE RESINA EPON-812****Solución A**

Epon-812 .....100 ml

NMA .....89 ml

**Solución B**

Epon-812 ..... 62 ml

DDSA .....100 ml

**MEZCLA = 6 ml "A" + 4 ml "B" + 0.2 DMP-30**

**COLORANTE AZUL DE TOLUIDINA**

Solución de 1% de Borax

Azul de toluidina al 0.1 %

Carbonato sódico al 2.5 % .

**SOLUCION DE ACETATO DE URANILO (WATSON)**

Disolver 8g de ACetato de Uranilo en 100 ml de agua destilada ( o 5 g en 100 ml de alcohol etílico al 50%) agitar vigorosamente durante 5 minutos. Guardar la solución de Acetato de Uranilo en una botella Ambar (el Acetato de Uranilo es foto-lábil).

Guardar la solución en refrigeración.

Usar unicamente soluciones cristalinas; desechar soluciones lechosas. Es aconsejable centrifugar o filtrar la solución antes de usarla.

**SOLUCION DE NITRATO DE PLOMO (REYNOLDS)**

Llevar a ebullición 1 Lt de agua destilada y mantenerla así durante 10 minutos para eliminar el CO<sub>2</sub> disuelto. Enfriar el agua hervida a temperatura ambiente.

Pesar:

NITRATO DE PLOMO ..... 2.66g

CITRATO DE SODIO..... 3.52g

Agregar 60 ml de agua hervida. Agitar vigorosamente durante 30 minutos hasta obtener una solución lechosa.

Agregar 16 ml de NaOH 1N lentamente y con agitación constante. La solución se volverá transparente al agregar el NaOH. Aforar a 100 ml con agua hervida. Guardar la solución preferentemente en una botella plastica ya que ésta solución alcalina (pH 12) ataca el vidrio. Centrifugar a 3000 rpm durante 5-10 minutos antes de usarse.

Utilizar una camara húmeda para teñir.

## APENDICE VI: MANEJO DE DATOS PARA CORREGIR DEL TAMAÑO EN FOTO AL TAMAÑO REAL PARA MET.

1.- El aumento que se registra al observar la imagen en el Microscópio electrónico de transmisión es el 3.63 veces mayor que el tamaño de las estructuras en el negativo de cada imagen fotografiada.

Por tanto:

$$\text{Factor 1) Tamaño en foto} * 3.63 * \text{aumento registrado} = \text{Tamaño en negativo}$$

2.- Para el MET la relación de tamaño real e imagen observada no es directamente proporcional (para corregir el tamaño se utiliza una escala para interpolar valores). Para evitar esto se graficaron algunos valores interpolados, se observó una tendencia asintótica, se probaron varias funciones matemáticas comprobando que al graficar el inverso del tamaño real \* 1000 los puntos graficados siguen el comportamiento de los valores interpolados en la escala (Tabla No.11 y Gráfica 8).

Por tanto :

**Factor 2)**

$$\text{Tamaño real en negativo} = \text{Tamaño en negativo} * 1/\text{factor de aumento real} * 1000$$

3.- Al imprimir del negativo a papel se hace una ampliación de la imagen la cual no es constante por lo que es necesario incluir un tercer factor de corrección.

Por tanto:

**Factor 3)**

$$\text{Tamaño real en negativo} * \text{Distancia entre dos puntos en el negativo}$$

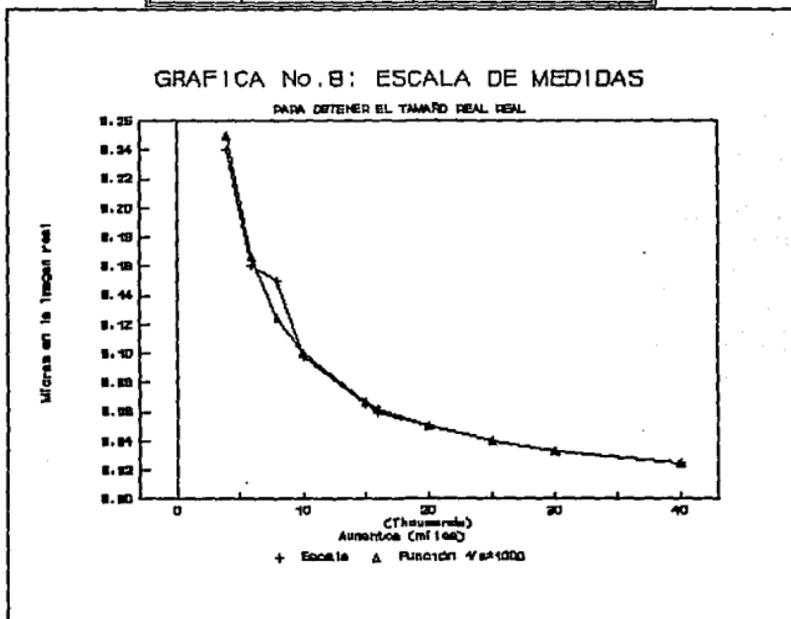
$$\text{Tamaño real en foto} = \frac{\text{Distancia entre dos puntos en el negativo}}{\text{Distancia entre los mismos puntos en la foto}}$$

4.- **Factor total de corrección = 1 \* 2 \* 3**

**TABLA No.12 AUMENTOS vs.MICRAS POR MET.**

Aumentos	mm (módulo en negativo)	micras (Imagen real)
4 000	1	0.24
6 000	1	0.16
8 000	1	0.15
10 000	1	0.098
15 000	1	0.065
16 000	1	0.06
20 000	1	0.05
25 000	1	0.04
30 000	1	0.0325
40 000	1	0.025

**GRAFICA No.8: ESCALA DE MEDIDAS**



### DETERMINACION DE LA SUPERFICIE EN FOTO

1.- Se mide el area observada en cada foto midiendo en mm los lados de la misma.

Por tanto :

**Superficie en foto = lado \* lado (Factor total de corrección)<sup>2</sup>**

2.- En caso de que el área a considerar no sea rectangular se toman en cuenta superficies las cuales se puedan ajustar a una figura geométrica para obtener su área con el menor error posible.

## INDICE DE FIGURAS

Fig. 1: Sistema circulatorio. A)Circulación menor. B)Circulación mayor . . . . .	11
Fig. 2: Diagrama del músculo cardíaco. A)Como se ve con MO. B) Como se ve con MET . . . . .	16
Fig. 3: Esquema del marcapaso eléctrico y el sistema de conducción del corazón . . . . .	20
Fig. 4: A)Fases del potencial de acción en la célula cardíaca. B)Movimientos iónicos durante la excitación celular. C)ECG normal . . . . .	22
Fig. 5: Modelo del mecanismo de deslizamiento entre los miofilamentos durante la contracción muscular . . . . .	24
Fig. 6: Acoplamiento de los procesos de excitación y contracción cardíaca . . . . .	25
Fig. 7: Válvulas del corazón . . . . .	28
Fig. 8: Circulación coronaria . . . . .	28
Fig. 9: Esquema de insuficiencia coronaria por descompensación entre el aporte y demanda de oxígeno. . . . .	30
Fig.10: ECG alterado durante a) isquemia b)infarto miocárdico . . . . .	35
Fig.11: Estructura de la Ropitofina . . . . .	40
Fig.12: Diagrama de flujo del diseño experimental . . . . .	48
Fig.13: Procesamiento de las muestras . . . . .	51
Fig.14: Medición del diámetro mitocondrial . . . . .	93
Fig.15: Aparato de perfusión . . . . .	112
Fig.16: Estructura general de las resinas Epoxi . . . . .	119
Fig.17: Formas distintas de pirámides útiles para obtener cortes en serie . . . . .	122
Fig.18: Bote formado en las cuchillas para contener agua . . . . .	122
Fig.19: Esquemmatización de como poner a una cuchilla de cristal una solapa para formar un bote . . . . .	122
Fig.20: Representación de una cuchilla de cristal donde se observa el filo útil . . . . .	124
Fig.21: Distintos tipos de rejillas usadas en MET . . . . .	126
Fig.22: Representación de la obtención de cortes finos en el ultramicrotomo . . . . .	128
Fig.23: Forma de recoger los cortes con la rejilla . . . . .	131

## INDICE DE FOTOS

Foto 1 : Corte longitudinal de músculo cardíaco	13
Foto 2 : Oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda	50
Foto 3 : Corte transversal de ventrículo izquierdo del grupo 1 (control sano)	55
Foto 4 : Corte transversal de corazón de rata del grupo 1	55
Foto 5 : Corte transversal de miocardio del ventrículo izquierdo del grupo 2 (control con oclusión)	57
Foto 6 : Corte transversal de corazón (Grupo 3, tratado con ropitofna)	57
Foto 7 : Corte transversal (grupo 2) Diferencia de diámetro de las fibras adyacentes al borde del infarto	58
Foto 8 : Adelgazamiento de miocardiocitos grupo 2	60
Foto 9 : Disminución en el adelgazamiento y otros daños en el grupo 3	60
Foto 10 : Ondulamiento de fibras (grupo 2)	62
Foto 11 : Ondulamiento de fibras (grupo 3)	62
Foto 12 : Hemorragia, congestión e infiltración leucocitaria (grupo 2)	63
Foto 13 : Despolimerización e infiltración leucocitaria (grupo 2)	63
Foto 14a: Despolimerización protéica (grupo 2)	65
Foto 14b: Despolimerización protéica (grupo 2)	65
Foto 15 : Despolimerización (grupo 3)	66
Foto 16 : Necrosis coagulativa (grupo 2)	67
Foto 17 : Necrosis coagulativa (grupo 3)	67
Foto 18 : Aparato de perfusión empleado durante la experimentación	122

## INDICE DE MICROGRAFIAS

Micrografía 1: Corte longitudinal de músculo cardíaco	14
Micrografía 2: Conformación mitocondrial ortodoxa	19
Micrografía 3: Corte longitudinal grupo 1 (control sano)	72
Micrografía 4: Mitocondrias normales (grupo 1)	74
Micrografía 5: Espacio subsarcolémico (grupo 1)	75
Micrografía 6: Núcleo (grupo 1)	76
Micrografía 7: Filamentos de actina y miosina (grupo 1)	77
Micrografía 8: Corte longitudinal grupo 2 (control con oclusión)	78
Micrografía 9: Daño severo del miocardio (grupo 2)	80
Micrografía 10: Daño mitocondrial (grupo 2)	81
Micrografía 11: Aumento en el espacio subsarcolémico (grupo 2)	82
Micrografía 12: Tipo de núcleos presentes en el grupo 2	83
Micrografía 13: Foco de despolimerización de miofilamentos (grupo 2)	84
Micrografía 14: Corte longitudinal grupo 3 (tratado con Ropitofna)	85
Micrografía 15: Daño mitocondrial (grupo 3)	86
Micrografía 16: Cromatina periférica en núcleos presentes en el grupo 3	87
Micrografía 17: Cromatina dispersa en núcleos presentes en el grupo 3	88
Micrografía 18: Regularidad en sarcómeros y arreglo general	89

## INDICE DE TABLAS

Tabla No. 1: Variaciones enzimáticas durante el infarto miocárdico . . . . .	34
Tabla No. 2: Grupos de fármacos de uso común en la clínica para el tratamiento del infarto miocárdico . . . . .	36
Tabla No. 3: Fármacos antiarrítmicos . . . . .	39
Tabla No. 4: Efecto de la Ropitofna en la evolución del infarto miocárdico inducido experimentalmente . . . . .	41
Tabla No. 5: Características de varios antiarrítmicos . . . . .	43
Tabla No. 6: Comparación de la frecuencia en los grupos 2 y 3 de cada tipo de lesión en la zona 2 . . . . .	68
Tabla No. 7: Comparación de la frecuencia en los grupos 2 y 3 de cada tipo de lesión en la zona 5 . . . . .	70
Tabla No. 8: Características cualitativas a nivel ultraestructura para los grupos experimentales . . . . .	90
Tabla No. 9: Datos promedio de los parámetros evaluados para los tres grupos trabajados . . . . .	94
Tabla No.10: Resultados de las pruebas de significancia estadística para los parámetros evaluados . . . . .	95
Tabla No.11: Frecuencia de muestras que presentaron cualquier tipo de daño por zonas en los grupos 2 y 3 . . . . .	104
Tabla No.12: Aumentos vs. Micras en MET . . . . .	137

## INDICE DE GRAFICAS

Gráfica No.1: Efecto de la Ropitofna en la evolución del infarto miocárdico inducido experimentalmente . . . . .	42
Gráfica No.2: Frecuencia de cada tipo de lesión por grupo en la zona 2 (MO) . . . . .	69
Gráfica No.3: Frecuencia de cada tipo de lesión por grupo en la zona 5 (MO) . . . . .	71
Gráfica No.4: Mitocondrias presentes por unidad de área (MET) . . . . .	96
Gráfica No.5: Porcentaje de daño mitocondrial por grupo (MET) . . . . .	98
Gráfica No.6: Tamaño del sarcómero por grupo (MET) . . . . .	99
Gráfica No.7: Diámetro mitocondrial por grupo (MET) . . . . .	100
Gráfica No.8: Escala de medidas para obtener el tamaño real en foto por MET . . . . .	137

## 9 . REFERENCIAS

- 1) Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial Infarction in Rats: infarct size, myocyte hypertrophy, and capillary growth. Circ. Res. ; vol. 58. no. 1, pp. 26-37; 1986.
- 2) Anversa P, Lord AV, Giacomelli F. Wiener J (1978) Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. Lab Invest 38: 597-609.
- 3) Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G: Myocyte hypertrophy in the aging rat heart. J Am Coll Cardiol 8:1441, 1986.
- 4) Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G. Myocardial Response to Infarction in the Rat morphometric measurement of infarct size and myocyte cellular hypertrophy. Am.J.Pathol. ; vol. 118 ; no. 3 ; pp. 482-492; 1985.
- 5) Anversa P, Sonnenblick E.H: Ischemic cardiomyopathy: Pathophysiologic mechanisms. Prog Cardiovasc Dis: 33: 49, 1990.
- 6) Ashraf M, Halverson CA: Structural changes in the freeze fractured sarcolemma of ischemic myocardium. Am J Pathol 1977, 88: 583-594.
- 7) Bache R.J: Effects of hypertrophy on the coronary circulation. Prog Cardiovasc Dis 30: 403, 1988.
- 8) Bajusz E, Jasmin G: Histochemical Studies on the myocardium following experimental interference with coronary circulation I. Occlusion of coronary artery. Acta Histochem 18: 222-237, 1964.
- 9) Bates CK. Medical risks of cocaine use. WEST. J. MED.; vol. 148, no. 4, pp. 440-444; 1988.
- 10) Campbell C.A., Przyklenk K., Kloner R.A. Infarct Size Reduction: A Review of the Clinical Trials. J.Clin. Pharmacol.: vol. 26; pp.317-329 ; 1986.
- 11) Capasso J.M, Robinson T.F, Anversa P. Alterations in collagen cross-linking impair myocardial contractility in the mouse heart. Circ Res 65: 1657, 1986.
- 12) Caulfield JB: Effects of varying the vehicle for osmium tetroxide tissue fixation. J Biophys Biochem Cytol 3: 827, 1957.
- 13) Caulfield J.B, Borg T.K: The collagen network of the heart. Lab Invest 40: 364, 1979.

- 14) Collins JSA; Higginson JDS; Boyle DMcC; Webb SW. Myocardial infarction during marijuana smoking in a young female. EUR. HEART J.; vol. 6, no. 7, pp. 637-638; 1985.
- 15) Crozatier B, Ashraf M, FRanklin D, Ross J Jr: Sarcomere length in experimental myocardial infarction: Evidence for sarcomere overstretch in dyskinetic ventricular regions. J Mol Cell Cardiol, 1977. 9: 785-797.
- 16) Fishbein M.C., Maclean D. et al. Experimental Myocardial Infarction in the Rat. qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. Am. J. Pathol. ; vol. 90 ; no.1 ; pp. 57-70 ; 1987.
- 17) Fishbein MC, Maclean D, Maroko PR (1978) Experimental myocardial infarction in the rat. Qualitative and quantitative changes during pathologic evolution. Am J Pathol 90: 57-70.
- 18) Forman SA; Helmkamp JC; Bone CM. Cardiac morbidity and mortality associated with occupational exposure to 1,2 propylene glycol dinitrate. J. OCCUP. MED.; vol. 29, no. 5, pp. 445-450; 1987.
- 19) Ganote CE: Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury (editorial). Mol Cell Cardiol 1983 15: 67-73.
- 20) Ganote Ch.E., Vander R. S. Cytoskeletal Lesions in Aaoxic Myocardial Injury. A conventional and High-Voltage Electrón-Microscopic and Immunofluorescence Study. Am. J. Pathol. ; vol. 129 ; no. 2 ; pp. 327-344 ; 1987.
- 21) Ganote CE: Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. J Mol Cell Cardiol 1983, 15: 67-73.
- 22) Golikov AP; Zingerman LS; Moiseeva TY; Ryabinin VA. Certain features of the course of myocardial infarction in patients with chronic alcoholic intoxication. KLIN. MED.; no. 2, pp. 110-113; 1987.
- 23) Gossop M. Beware cocaine. BR. MED. J.; vol. 295, no. 6604, p. 945; 1987.
- 24) Goto Y. Smoking and atherosclerosis. ASIAN MED. J.; vol. 31, no. 2, pp. 75-82; 1988
- 25) Grande P. Hansen B.F. Christiansen G. et. al. Estimation of acute myocardial infarct size in man by serum CK-MB measurements. Circulation 1982, 65: 756-764.
- 26) Hagler HK, Sherwin L, Buja LM: Analytical electron microscopy of mitochondrial inclusions in infarcted myocardium: effect of tissue preparation. Circulation 58 (Suppl II) : 11: 241, 1978.
- 27) Haines JD Jr; Sexter S. Acute myocardial infarction associated with cocaine abuse. SOUTH. MED. J.; vol. 80, no. 10, pp. 1326-1327; 1987.

- 28) Hamaguchi H. Genetic analysis of common diseases using DNA polymorphisms (RFLPs).
30. ANNUAL MEETING OF THE JAPAN SOCIETY OF HUMAN GENETICS.; 1986; p. 136;
- 29) Hayat MA: Principles and techniques of electron Microscopy. Biological Applications, Vol 1. New York, Van Nostrand Reinhold Co, 1970.
- 30) Hegele RA; Huang L-S; Herbert PN; Blum CB; Buring JE; Hennekens CH; Breslow. Apolipoprotein B-gene DNA polymorphisms associated with myocardial infarction. N. ENGL. J. MED.; vol. 315, no. 24, pp. 1509-1515; 1986
- 31) Hochman JS, Bulkley BH (1982) Pathogenesis of left ventricular aneurysms: an experimental study in the rat model. Am J Cardiol 50 : 83-88.
- 32) Howard RE; Hueter DC; Davis GJ. Acute myocardial infarction following cocaine abuse in a young woman with normal coronary arteries. J. AM. MED. ASSOC.; vol. 254, no. 1, pp. 95-96; 1985.
- 33) Jennings, R.B, Kaltenbach, J.P & Sommers, H M. Mitochondrial metabolism in ischaemic injury. Archives of pathology 84, 15-19 (1969).
- 34) Jennings RB, Shen AC, Hill ML, Ganote CE, Herdson PB: Mitochondrial matrix densities in myocardial ischemia and autolysis. Exp Mol Pathol 29: 55, 1978.
- 35) Jennings RB, Ganote CE, Structural changes in myocardium during acute ischemia. Circ Res 1974, 35 ( Suppl III) ; 156-172.
- 36) Jennings R.B, Hawkins H.K: Ultrastructural changes of acute myocardial ischemia In Degradative Processes in Heart and Skeletal Muscle, edited by Wildenthal K, p 295. Amsterdam, Elsevier/ North- Holland, 1986.
- 37) Jennings RB, Ganote CE: Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. Circ Res 38 ( Sppl I) : 1-80, 1976.
- 38) Jennings RB, Reimer KA: Salvage of ischemic myocardium. Mod Concepts Cardiovasc Dis 43: 125-130, 1974.
- 39) Jennings RB, Summers HM, Kaltenbach JP, West JJ: Electrolyte alterations in acute myocardial ischemic injury. Circ Res 1964, 14: 260-269.
- 40) Jennings, R.B & Ganote, C.E. Ultrastructural changes in acute myocardial ischaemia. In Effect of acute Myocardial Ischaemia on Myocardial Infarction. M.F. Oliver, D.G. Guliar & K.W. Donald, Eds, pp 50-74. Edinburgh and London: Churchill Livingstone (1972).
- 41) Johns TNP, Olson BJ: Experimental myocardial Infarction. A method of coronary occlusion in small animals. Ann Surg 140: 675-682, 1954.

- 42) Karnovsky MJ: A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. J Cell Biol 27: 137A, 1965.
- 43) Karnovsky MJ: Use of Ferrocyanide-reduced osmium tetroxide in electron microscopy (abstr). Proceedings of the American Society for Cell Biology, 1971. p 146.
- 44) Kaufman DW; Palmer JR; Rosenberg L; Shapiro S Cigar and pipe smoking and myocardial infarction in young men. BR. MED. J.; vol.294, no. 6583, pp. 1315-1316; 1987
- 45) Kaufman N, Gavan TL, Hill RW: Experimental myocardial infarction in the rat. Arch Pathol 67: 482-488, 1959.
- 46) Kloner, R.A., Fishbein, M.C., Hore, C.M. & Maroko, P. R. Early ischaemic ultrastructural and histochemical alterations in the myocardium of the rat following coronary artery occlusion. Experimental and Molecular Pathology 30, 129-143 (1979).
- 47) Korecky B, Rakusan K: Normal and hypertrophic growth of the rat heart: Changes in cell dimensions and number. Am J Physiol 1978, 234: H123-H128.
- 48) Koskenvuo M; Kaprio J; Kesaniemi A; Poikolainen K. Alcohol-related diseases associated with ischaemic heart disease: A three-year follow-up of middle-aged male hospital patients. ALCOHOL ALCOHOLISM.; vol. 21, no. 3, pp. 251-256; 1986.
- 49) Kossowsky WA; Lyon AF. Cocaine and acute myocardial infarction. A probable connection. CHEST.; vol. 86, no. 5, pp. 729-731; 1984.
- 50) Lithell H; Aaberg H; Selinus I; Hedstrand H. Alcohol intemperance and sudden death. BR. MED. J.; vol. 294, no. 6585, pp. 1456-1458; 1987
- 51) Lynch, J., Montgomery, D., Ventura, A., et al. Antiarrhythmic vs. antifibrillatory activity of the basic diphenylhydantoin derivative 3-(4-phenyl-1-piperidyl)propyl-5-(4-methoxyphenyl)-5-phenylhydantoin hydrochloride. ARZNEIM. FORSCH. 36 475-481 3 1986.
- 52) Maroko, P. R., Kjekshus, J.K., Sobel, B.E., Watanabe, T., Covell, J.W., Ross, J. J. & Braunwald, E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusion. Circulation 43, 67-82 (1971).
- 53) Martínez A. L. Efecto de la Ropitoina (TR-2985) sobre la evolución temporal del Infarto Miocárdico inducido mediante la ligadura coronaria experimental en la rata. CINVESTAV.IPN.Méx. 1989.
- 54) Maroko PR, Libby P, Braunwald E: Effect of pharmacologic agents on the function of the ischemic heart. Am J Cardiol 32: 930-936, 1973.
- 55) Merigian KS; Roberts JR. Cocaine intoxication: Hyperpyrexia, rhabdomyolysis and acute renal failure. J. TOXICOL.: CLIN. TOXICOL.; vol. 25, no. 1-2, pp. 135-148; 1987

- 56) Millonig G: Advantages of a phosphate buffer for osmium tetroxide solutions in fixation. J Appl physics 32: 1637, 1961.
- 57) Mittal B; Deutsch M; Thompson M; Lee Dameshek H. Radiation-induced accelerated coronary arteriosclerosis. AM. J. MED.; vol. 81, no. 1, pp. 183-184; 1986
- 58) Mollenhaver HH: Plastic embedding mixtures for use in electron microscopy. Stain Technol 39: 111, 1964.
- 59) Myers MG; Harris L; Leenen FHH; Grant DM. Caffeine as a possible cause of ventricular arrhythmias during the healing phase of acute myocardial infarction. AM. J. CARDIOL.; vol. 59, no. 12, pp. 1024-1028; 1987
- 60) Oberpriller JO, Ferrans VJ, Carrol RJ: Changes in DNA content, number of nuclei and cellular dimensions of young rat atrial myocytes in response to left coronary artery ligation. Mol Cell Cardiol 1983, 15: 31-42.
- 61) Olivetti G., Ricci R., et al. Response of the Border Zone to Myocardial Infarction in Rats. Am. J. Pathol.; vol. 125, no. 3, pp. 476-483; 1986
- 62) Page, E., Polimeni P.I.: Ultrastructural changes in the ischemic zone bordering experimental infarcts in rat left ventricles. Am J. Pathol 1977; 87: 81-104.
- 63) Page E, Mc Callister LP: Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells: Application to normal hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. Am J Cardiol 1973, 31: 172-181.
- 64) Palade GE: A study of fixation for electron microscopy. J Exp Med 95: 285, 1952.
- 65) Pasternack PF; Colvin SB; Baumann FG. Cocaine-induced angina pectoris and acute myocardial infarction in patients younger than 40 years. AM. J. CARDIOL.; vol. 55, no. 6, pp. 847-848; 1985.
- 66) Pfeffer MA, Pfeffer JM, Fishbein MC, Fletcher Pj, Spadare J, Kloner RA, Braunwald E (1979). Myocardial infarct size and ventricular function in rats. Circ Res 44: 503-512.
- 67) Pierobon-Bormioli S: Transverse sarcomere filamentous system: Z and M cables. J Mus Res Cell Motil 1981, 2: 401-413.
- 68) Plowright C; Adam SA; Thorogood M; Beaumont V; Beaumont JL; Mann JI. Immunogenicity and the vascular risk of oral contraceptives. BR. HEART J.; vol. 53, no. 5, pp. 556-561; 1985
- 69) Polimeni PI, Al-Sadir J: Expansion of extracellular space in the nonischemic zone of the infarcted heart and concomitant changes in tissue electrolyte contents in the rat. Circ Res 1975, 37: 725-732.

- 70) Porter JB; Hunter JR; Jick H; Stergachis A. Oral contraceptives and nonfatal vascular disease. OBSTET. GYNECOL.; vol. 66, no. 1, pp. 1-4; 1985.
- 71) Prentice RL. On the ability of blood pressure effects to explain the relation between oral contraceptives and cardiovascular disease. AM. J. EPIDEMIOLOG.; vol. 127, no. 2, pp. 213-219; 1987
- 72) Reynolds ES: The use of lead citrate at high pH as an electron opaque stain in electron microscopy. J Cell Biol 17: 208, 1963.
- 73) Roe CR: Validity of estimating myocardial infarct size from serial measurements of enzyme activity in the serum. Clin chem 1977; 23: 187.
- 74) Rosenberg L; Werler MM; Kaufman DW; Shapiro S. Coffee drinking and myocardial infarction in young women: An update. AM. J. EPIDEMIOLOG.; vol. 126, no. 1, pp. 147-149; 1987.
- 75) Rosenberg L; Palmer JR; Kelly JP; Kaufman DW; Shapiro S. Coffee drinking and nonfatal myocardial infarction in men under 55 years of age. AM. J. EPIDEMIOLOG.; vol. 128, no. 3, pp. 570-578; 1988
- 76) Rosengren A; Wilhelmsen L; Wedel H. Separate and combined effects of smoking and alcohol abuse in middle-aged men. ACTA MED. SCAND.; vol. 223, no. 2, pp. 111-118; 1988
- 77) Rosengren A; Wilhelmsen L; Berglund G; Elmfeldt. Non-participants in a general population study of men, with special reference to social and alcoholic problems. SOUTH. MED. J.; vol. 80, no. 10, pp. 1326-1327; 1987
- 78) Satoh J; Hattori N; Onuki M; Yamakawa K; Fujiwara H; Amamiya H; Nagaoka H; Sakuma T; Hamaguchi H; et al. Apolipoprotein AI-CIII gene polymorphisms in Japanese myocardial infarction survivors. JAP. J. HUM. GENET.; vol. 32, no. 1, pp. 15-20; 1987
- 79) Scragg R; Stewart A; Jackson R; Beaglehole R. Alcohol and exercise in myocardial infarction and sudden coronary death in men and women. AM. J. EPIDEMIOLOG.; vol. 126, no. 1, pp. 77-85; 1987
- 80) Selye H, Bajusz E, Grasso S, Mendell P: Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rat. Angiology 1960, 11: 398-407.
- 81) Shaper AG; Phillips AN; Pocock SJ; Walker W. Alcohol and ischaemic heart disease in middle aged British men. BR. MED. J.; vol. 294, no. 6574, pp. 733-737; 1987
- 82) Smith HWB III; Liberman HA; Brody SL; Battey LL; Donohue BC; Morris DC. Acute myocardial infarction temporally related to cocaine use: Clinical, angiographic, and pathophysiologic observations. ANN. INTERN. MED.; vol. 107, no. 1, pp. 13-24; 1987

- 83) Sridharan MR; Flowers NC; Hand RC; Hand JW; Horan LG. Effect of various regimens of chronic and acute nicotine exposure on myocardial infarct size in the dog. AM. J. CARDIOL.; vol. 55, no. 11, pp. 1407-1411; 1985
- 84) Tazelaar HD; Karch SB; Stephen BG; Billingham ME. Cocaine and the heart. HUM. PATHOL.; vol. 18, no. 2, pp. 195-199; 1987
- 85) Vander Heide R.S, Ganote C.E: Increased myocyte Fragility Following anoxic injury. J Moll Cell Cardiol 19: 1085, 1987.
- 86) Vidal, J., Peón, J., and Kabela, E. Effects of a New Antiarrhythmic Agent on the Electrophysiological Characteristics of the Heart. Joint Meeting of Asociación Mexicana de Farmacología, Western Pharmacology Society and Texas Pharmacologists. (VII National Congress of Pharmacology, México) 1980.
- 87) Vidrio, H., Mena, M.A. and Hong, E. Antiarrhythmic Activity of TR-2985, a Novel Diphenylhydantoin Derivative. ARZNEIM. FORSCH./DRUG RES. 30 (1) 1: 12-17, 1980.
- 88) Wang K: Cytoskeletal matrix in striated muscle: The role of titin nebulin and intermediate filaments. Contractile mechanisms in muscle. Edited by GH Pollack H Sugi. New York, Plenum, 1984, pp 285-305.
- 89) Weisfeldt M.L, Wright J.R, Shreiner D P, Lakatta E, Shock N W: Coronary Flow and oxygen extraction in the perfused heart of senescent male rats. J Appl Physiol 30:44, 1971.
- 90) Yamaguchi M, Robson RM, Stromer MH: Evidence for actin involvement in Cardiac Z-lines and Z-line analogues. J Cell Biol 1983, 96: 435-442.
- 91) Best Taylor, Bases Fisiológicas de la Práctica Médica 11a. Ed. Ed. Médica Panamericana. Argentina 1987. pp137-397.
- 92) Bloom and Fawcet. A Textbook of histology 9a. Ed. Ed. Buenos Aires 1986. Cap. 11.
- 93) Británica. Hombre. Ciencia y Tecnología Tomo 2. Ed. Británica Méx. 1980.
- 94) Ganong Manual de Fisiología Médica Ed. Manual Moderno Argentina 1989. pp 61-63 y 543.
- 95) Grollier. Enciclopedia de las Ciencias Tomo 5. Ed. Cumbre S.A. Méx. 1980.
- 96) Litter Farmacología Experimental y Clínica Ed. El Ateneo 7a Ed. Argentina 1988
- 97) Weiss L., Greep R.O., Histology 4a. Ed. Ed. Mc Graw-Hill E.U.A. 1987. Cap. 7.

- 98) Jacob Anatomía y Fisiología Humana 4a. Ed. Interamericana. México 1989.
- 99) Angel Gilberto M. Interpretación clínica del Laboratorio. 3a. Ed. Médica Panamericana.
- 100) Marcus. Diagnóstico Clínico y Tratamiento. El Manual Moderno. México 1985.
- 101) Peter A. Witaker Susan M. Danks. Mitocondria: Estructura, Función y Formación. Ed. CECSA. México 1982.
- 102) Drill, Victor Alexander. Farmacología Médica. 2a. Ed. México. La Prensa Médica Mexicana 1978.
- 103) Bevan, John A. Fundamentos de Farmacología. 2a. Ed. Harper. México 1982.
- 104) Leningher Bioquímica. Ed. Omega 2a. Ed. España 1984.