



52
2ej

**Universidad Nacional Autónoma
de México**

Facultad de Estudios Superiores
CUAUTITLÁN



**“Efecto del Propranolol en el Infarto Miocárdico Inducido Mediante
la Ligadura Coronaria Experimental en Rata. Estudio a Nivel
de Microscopía Óptica y Electrónica”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A N
MONSALVO MIJANGOS ANA MONICA
NAKANO HATANO ERIKA
SANCHEZ MENDEZ REYNA IRMA

A S E S O R E S :

M. EN C. LUISA MARTINEZ AGUILAR
M. EN C. SOFIA GONZALEZ GALLARDO
M.V.Z. JORGE TORRES MARTINEZ
PH D. ELISEO HERNANDEZ B.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Cuautitlán, Edo. de México

1993



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

RESUMEN.....	1
1 INTRODUCCION	
1.1 Antecedentes.....	3
2 GENERALIDADES	
2.1 Aspectos Normales del Corazón.....	7
2.1.1 Irrigación	
2.1.2 Histología	
2.1.3 Ultraestructura	
2.2 Enfermedades Cardiovasculares.....	15
2.3 Miocardio Isquémico.....	15
2.4 Infarto Miocárdico.....	17
2.5 Métodos de Estudio.....	18
2.4.1 Modelos en Animales	
2.4.2 Estudios Clínicos	
2.6 Alteraciones Histológicas del miocardio debidas a la taquimia.....	22
2.7 Intervenciones Farmacológicas.....	25
2.8 Propranolol.....	31
2.8.1 Antecedentes	
2.8.2 Características Generales	
2.8.3 Carácter Químico	
2.8.4 Metabolismo	
2.8.5 Estudios Experimentales	
3. OBJETIVOS.....	37
4. MATERIAL Y METODOS	
4.1 Diseño Experimental.....	40
4.2 Oclusión.....	42
4.3 Perusión.....	43
4.4 Preparación del Tejido.....	44
4.3.1 Microscopía Óptica	
4.3.2 Microscopía Electrónica	
5. RESULTADOS	
5.1 Microscopía Óptica.....	52
5.1.1 Cambios en las Fibras Miocárdicas	
5.1.2 Infiltración de Células Inflammatorias	
5.1.3 Macrófagos	
5.1.4 Cambios Tisulares	
5.1.5 Fibroblastos y Fibras de Colágeno	

6.2 Microscopía Electrónica.....	58
5.2.1 Resultados Cualitativos	
5.2.2 Resultados Cuantitativos	
6. DISCUSION.....	70
7. CONCLUSION.....	78
8. BIBLIOGRAFIA.....	82

RESUMEN

El Propranolol es un agente β -bloqueador que ha demostrado ser uno de los fármacos más efectivos en la disminución del tamaño del infarto. En el presente estudio se determinó el efecto del propranolol sobre los cambios estructurales y ultraestructurales en el infarto al miocardio inducido mediante la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en la rata. Se emplearon 3 grupos de ratas Wistar macho de 8 a 10 semanas de edad. el grupo 1 sin oclusión, el grupo 2 con oclusión mas administración del vehiculo -S.S.F- (no tratado) y el grupo 3 con oclusión mas administración del propranolol -1mg/kg I.M.- (tratado). La administración se realizó 30 minutos antes de la oclusión. A las cuatro horas postocclusión, los corazones de los tres grupos se trataron por técnicas convencionales de microscopía óptica y electrónica. Las observaciones por microscopía óptica muestran cambios estructurales como son necrosis coagulativa, pérdida de estriaciones, áreas con infiltración de células inflamatorias, hemorragia y congestión. Las observaciones por microscopía electrónica muestran cambios ultraestructurales en el núcleo, mitocondrias y sarcómeros. Los resultados del análisis morfométrico muestran que el número de mitocondrias por $100\mu^2$ no muestran diferencias significativas entre los tres grupos. La relación de volumen de las mitocondrias no presenta diferencias significativas entre los grupos no tratado (25.44+1.33%) y tratado (23.19+1.67%), pero ambos muestran diferencia significativa con el grupo sin oclusión (11.04+3.89%) ($p<0.01$). El porcentaje de mitocondrias que no presentaron daño en su estructura (grado 0) es de 99.29% en el grupo sin oclusión, de 71.3% en el grupo tratado y de 30.12% en el grupo no tratado. El porcentaje de mitocondrias que presentaron hinchamiento, pérdida de densidad de la matriz y separación de crestas (grado 1) es de 0.71% en el grupo sin oclusión, de 27.18% en el grupo tratado y de 51.78% en el grupo no tratado. En tanto que el porcentaje de mitocondrias con lisis (grado 2) es de 18.08% para el grupo no tratado, el grupo tratado únicamente presentó un porcentaje de 1.53% de mitocondrias con lisis y en el grupo sin oclusión no se presentaron mitocondrias con este grado de daño. El porcentaje de núcleos que presentaron acumulación y marginación de la cromatina es de 87.1% para el grupo tratado, 100% para el grupo no tratado y el grupo sin oclusión no presentó núcleos con estas características. La longitud de los sarcómeros en μ . no muestran diferencias significativas entre los tres grupos.

El presente trabajo nos permite concluir que. 1. El modelo de infarto por ligadura coronaria experimental nos permitió provocar daño isquémico a las 4 horas postocclusión. 2. Las técnicas de microscopía óptica y electrónica permitieron alcanzar el objetivo general de este proyecto, que fué evaluar el efecto del propranolol sobre los cambios morfológicos provocados por el daño isquémico. 3. El estudio a nivel estructural permitió localizar la zona del infarto, su extensión, y los cambios que ocurren en esta así como la capacidad del propranolol para prevenir la extensión del tejido

lesionado. 4. A nivel ultraestructural se determinó que la mitocondria es el organelo que presenta mayor evidencia de daño en un período de 4 horas post oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda. 5. La conservación de la estructura mitocondrial puede ser un factor que evita el daño irreversible en la célula miocárdica. 6. Con los resultados anteriores se confirma que el propranolol tiene un efecto protector sobre el corazón ya que previene la extensión del tejido lesionado además de la conservación de la estructura mitocondrial.

1. INTRODUCCION

1.1 ANTECEDENTES

El número de muertes provocadas por enfermedades cardiovasculares en países desarrollados como Estados Unidos, Canadá, Australia, Finlandia, Japón, Suiza, Italia y Francia ha disminuído considerablemente durante las últimas décadas, particularmente, a partir de los años setentas esta tendencia se ha acelerado (Levy y col.; 1982). Esto es, en parte atribuible a los grandes avances de la medicina cardiovascular que han permitido el descubrimiento y desarrollo de nuevos y mejores agentes para el tratamiento y prevención de estas enfermedades, así como también, al uso de técnicas quirúrgicas y terapias más agresivas las que han incrementado el número de pacientes que sobreviven a un ataque cardíaco.

Otros factores que han contribuído a incrementar esta tendencia son: la reducción en el consumo de cigarrillos, el menor consumo de alimentos ricos en colesterol, la sustitución de grasas animales saturadas por poliinsaturadas en la alimentación, una toma de conciencia cada vez mayor de los beneficios de la reducción de peso y del ejercicio físico regular. La importancia relativa de cada uno de estos factores aún no ha sido establecida. (Bristol, 1986)

El número de muertes provocadas por enfermedades cardiovasculares aún es muy elevado y en países como Estados Unidos, son causantes de más de un millón de muertes anualmente, lo que constituye dos veces más la mortalidad asociada con el cáncer y diez veces la ocasionada por accidentes (American Heart Association, 1985). A diferencia de los países industrializados donde la tendencia es hacia la disminución (Atters y col; 1991), los países como

México muestran un incremento de la tendencia hacia las enfermedades cardiovasculares (Simons, 1986) . Un estudio publicado en 1989 por la revista Salud Pública de México, coloca a las enfermedades isquémicas del corazón entre las primeras cinco causas de muerte (Cavazos-Ortega, 1989).

En la última década, el número de pacientes que han ingresado a un hospital por una falla cardiaca se ha triplicado y ésto ha creado la necesidad de desarrollar modelos racionales de terapia que permitan salvar el mayor número de pacientes.

2. GENERALIDADES

2.1 ASPECTOS NORMALES DEL CORAZON

El corazón, porción notablemente especializada del sistema vascular, impulsa la sangre por los vasos. Incluye cuatro cámaras principales: dos aurículas, izquierda y derecha y dos ventrículos, derecho e izquierdo. Las venas cavas superior e inferior traen sangre corporal a la aurícula derecha, sitio donde la sangre pasa al ventrículo derecho. Del ventrículo derecho es impulsada a los pulmones, en donde se lleva a cabo el intercambio gaseoso, y vuelve al corazón por las venas pulmonares a la aurícula izquierda. De ésta pasa al ventrículo izquierdo, y de ahí la sangre es expulsada al cuerpo por medio de la aorta y sus ramas (Ganong,1984).

2.1.1 Irrigación

El corazón recibe sangre por las dos arterias coronarias, y su drenaje venoso se hace por las venas cardiacas. Las arterias coronarias nacen en los senos situados detrás de las valvas de la válvula aórtica, en la raíz de la aorta. Por ello, durante la sístole están de alguna manera protegidas del efecto Venturi producido por el rápido paso de la sangre en el intervalo de la contracción sistólica. La mayor parte del llenado de las arterias coronarias tiene lugar durante la diástole (Ganong,1984).

Desde el punto de vista funcional, las arterias coronarias derecha e izquierda se comportan como arterias terminales, aunque anatómicamente existen

numerosas anastomosis intercoronarias en la mayoría de los corazones normales. La rama descendente anterior de la arteria coronaria izquierda irriga la mayor parte de la punta del corazón, la superficie anterior del ventrículo izquierdo, el tercio contiguo de la pared anterior del ventrículo derecho, y los dos tercios anteriores del tabique interventricular. En la mayor parte de los casos, la arteria coronaria derecha irriga el resto de la superficie anterior del ventrículo derecho, la cara posterior del mismo, la mitad adyacente de la pared posterior del ventrículo izquierdo, y el tercio posterior del tabique interventricular. A cargo de la rama circunfleja de la arteria coronaria izquierda queda sólo una pequeña porción de la carga lateral del ventrículo izquierdo. Las aurículas están irrigadas por ramas procedentes de las arterias del lado correspondiente. (Ganong; 1984).

2.1.2 Histología

En la actualidad, la aplicación de los métodos modernos de examen de la morfología cardíaca permite estudios muy precisos de las características anatómicas microscópicas del músculo cardíaco.

Bajo el microscopio óptico, las capas musculares están formadas por células o fibras aisladas estriadas ramificadas denominadas miocitos, de una longitud aproximada de 50-100 μ y un diámetro de 5-50 μ y que conservan la misma dirección dentro de un mismo haz. A su vez, la fibra muscular contiene muchísimas hileras paralelas de miofibrillas longitudinales, que recorren toda la longitud de la fibra. Cada

miofibrilla comprende varias unidades contráctiles básicas, o sarcómeros, dispuestos uno tras otro en línea recta. En determinados lugares puede encontrarse otra línea cruzada diferente, a menudo alternando su posición entre células vecinas, conocida como el disco intercalar. Los miocitos muestran uno o dos núcleos en posición central (Anderson; 1981 y Soderman; 1984). (figura 2.1)

2.1.3 Ultraestructura

La aplicación del microscopio electrónico en el estudio del corazón provee información de gran interés en cuanto al funcionamiento normal y anormal del músculo cardíaco. Por un lado, el microscopio electrónico ha permitido conocer los principales cambios que son producidos en la ultraestructura celular por procesos fisiológicos y patológicos; y por otro lado, las observaciones al microscopio electrónico han dado la pauta para explicar los mecanismos de fenómenos celulares por medio de los detalles intrincados de la fina estructura celular y especialmente por la relación geométrica que existe entre varios tipos de membranas celulares (Page et. al. 1973).

A. Sarcómeros y Miofilamentos. Los propios sarcómeros presentan una disposición específica basada en dos conjuntos superpuestos de miofilamentos de proteínas contráctiles; los filamentos gruesos son moléculas de miosina, que a su vez están compuestas de subunidades de meromiosina ligera y meromiosina pesada; y los filamentos delgados moléculas de actina, tropomiosina y troponina. Las interacciones bioquímicas y biofísicas en ciertos focos de estos dos filamentos de actina y de miosina

produce la contracción al proporcionarse una fuerza que se traduce por un acortamiento de las fibras musculares del corazón. Dentro de una fibra miocárdica dada, los sarcómeros de las miofibrillas vecinas se encuentran juntas unas a otras y sus extremos coinciden de manera que la organización en bandas de las proteínas contráctiles que contiene el sarcómero da a las fibras musculares en conjunto un aspecto de estriación transversa. Figura 2.1.

Las densidades ópticas relativas de las bandas transversales permiten identificar el lugar ocupado por las proteínas contráctiles en el sarcómero. Los filamentos de miosina corresponden a la banda A ancha y oscura, cuya longitud no cambia (aproximadamente 1.5μ en la parte central del sarcómero). Las unidades estacionarias de miosina quedan unidas con sus vecinas mediante enlaces que ocupan el punto medio de los filamentos así formado (línea M oscura). Figura 2.1 y 5.3a.

Alrededor de las unidades de miosina se encuentran los filamentos deslizantes de actina, también de longitud constante (1μ), unidos en uno y otro extremo del sarcómero a la banda Z oscura, que también une los sarcómeros adyacentes en este lugar. A partir de la banda I clara, cuyas dimensiones son variables, los filamentos de actina adoptan una dirección central, hasta quedar ampliamente cubiertos por la estructura fija de miosina. En condiciones fisiológicas, la longitud total del sarcómero varía durante el ciclo cardíaco entre 1.5 y 2.2μ , según el grado de relajación de las fibras al final de la diástole, y también el grado de acortamiento durante la contracción.

Inmediatamente por fuera de cada línea M se encuentra una banda H clara. Figura 2.1 y 5.3a.

B.Membrana Superficial. Cada fibra del miocardio está cubierta por una membrana llamada sarcolema, de ésta se deriva un disco intercalar y un sistema de túbulos transversos. Los discos intercalares se encuentran en las uniones intercelulares, entre los sarcómeros terminales de la fibra; por lo tanto conectan entre sí los extremos de las fibras. En el miocardio ventricular, se observa una red transtubular compleja, o sistema T, formado por invaginaciones profundas del sarcolema, a intervalos frecuentes, que se proyectan verticalmente hacia el interior de cada célula a partir de la superficie de la fibra. El disco intercalar y las membranas de los túbulos transversos son vías de paso para la transmisión rápida de los impulsos despolarizantes que excitan eléctricamente las fibras vecinas y el sistema formado por membrana intracelular y sarcómero contráctil.

El sistema transtubular también amplía considerablemente el espacio extracelular y le permite llegar a todas las regiones de la célula, de manera que el transporte por la membrana de cationes como sodio, potasio y calcio, el acoplamiento excitación-contracción, así como la relajación, resulta ser un fenómeno rápido en todas las fibras del miocardio. Además, el sistema T suministra una vía para la fácil entrada y salida de metabolitos y otras sustancias entre el medio intersticial y el sarcoplasma; constituye también una vía de acceso para los fármacos utilizados por el cardiólogo.

C.Retículo Sarcoplásmico. El sistema de tubulos T es completado estructural y funcionalmente por un gran sistema intracelular de membranas tubulares, llamado retículo sarcoplásmico, que ayuda a fenómenos de acoplamiento excitación-contracción y relajación mecánica . El retículo sarcoplásmico se encuentra totalmente en el interior de las células, y su orientación general es perpendicular al sistema T, de manera que la estructura sarcotubular se dispone longitudinalmente en la región de la banda A, a lo largo de las hileras de sarcómeros, con interconexiones ramificadas múltiples. En los lugares donde entra en contacto con los túbulos T, en la banda I lateral a un lado de la línea Z, el retículo sarcoplásmico presenta ensanchamientos, las bolsas laterales entran en contacto con los discos intercalares y el sarcolema .

De esta manera, la función del retículo sarcoplásmico es la de transportar y almacenar el calcio citoplasmático durante el proceso de relajación y de liberarlo previamente al proceso de contracción muscular. (Sodeman y col, 1984 y Holguín y col 1985).

D.Mitocondrias. La mitocondria es el organelo que contiene los sistemas bioquímicos aerobios de la fibra. Las mitocondrias, que se encuentran entre las miofibrillas, son muy abundantes, en vista de las elevadas necesidades de oxígeno del corazón; constituyen aproximadamente el 30% de la masa de la célula cardiaca. Las mitocondrias, situadas cerca de las bandas A y la miosina ATPasa, son las plantas del metabolismo energético donde se utilizan el oxígeno y los sustratos para producir ATP.

última fuente de energía para la contracción del miocardio y para otras reacciones bioquímicas .

Morfológicamente, la mitocondria está envuelta en una membrana, y a partir de ésta nace hacia el interior invaginaciones en forma de crestas sobre las que tienen lugar los fenómenos de desfosforilación oxidativa. Además, las membranas de la mitocondria pueden acumular calcio, cuyo ion podría representar un amortiguador interno en caso de un aumento anormal del calcio sarcoplásmico durante la diástole (Sodeman y col. 1984).

Tabla 2.1 Principales organelos de las células miocárdicas y sus funciones. (Page y col. 1973)

Composición de las células miocárdicas de ventrículo izquierdo en rata	
Organelo	Principales Funciones
Miofibrillas	Contracción y relajación
Mitocondrias	Respiración
Sistema T	Transmisión de señales eléctricas en la superficie e interior de la célula
Sarcotúbulos	Control de la contracción y relajación por la regulación de la concentración de calcio ionizado
Cisternas terminales	Almacenamiento de calcio y liberación de calcio ionizado
Resto del retículo sarcotubular	Colección de calcio desde el sarcoplásmo y retorno de esto hacia las cisternas terminales

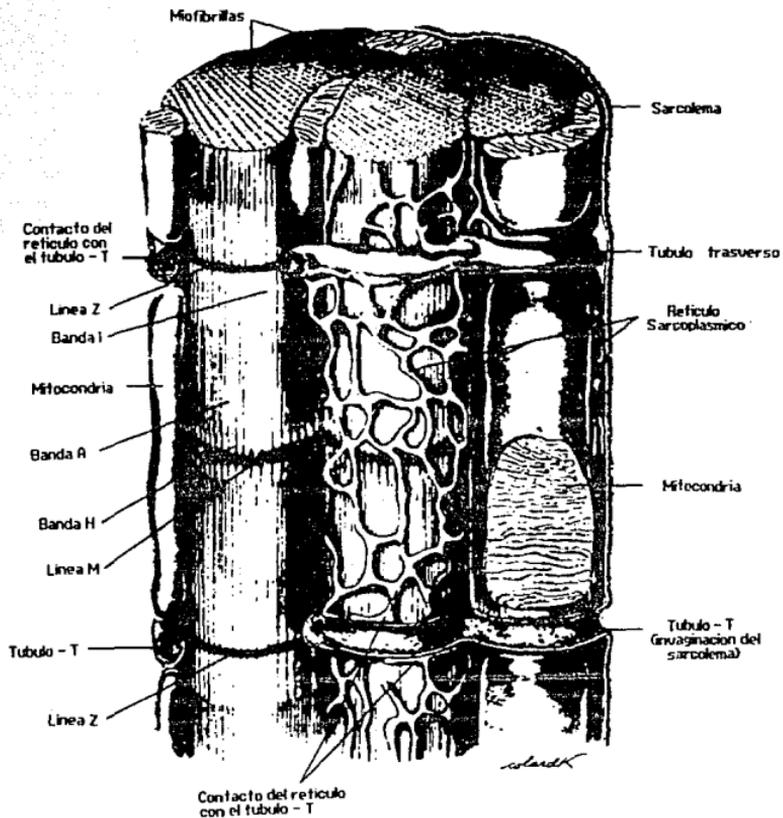


Figura 2.1 Representación esquemática del miocardio donde se observa el sarcómero de una banda z a otra. La mitocondria, el retículo sarcoplásmico, y los túbulos T también se muestran en el esquema. (Bloom y col. 1969) (Fawcett y col. 1969)

2.2 ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

Enfermedad cardiovascular es un término genérico que describe la interrelación entre diversos desórdenes clínicos. Las principales enfermedades cardiovasculares son: hipertensión arterial, enfermedades coronarias y aterosclerosis. El origen y evolución de esta enfermedad es multifactorial, además todas ellas se interrelacionan unas con otras, y poseen factores de riesgo comunes que favorecen su desarrollo. (Ver Figura 2.2). Por ejemplo, la aterosclerosis contribuye con casi el 75% de las muertes que por ataque cardíaco se producen anualmente. La hipertensión puede promover el desarrollo de la aterosclerosis y ésta puede inducir a la hipertensión. Ambas pueden contribuir al desarrollo de enfermedades en las arterias coronarias y esto puede progresar a una enfermedad coronaria más severa, falla cardíaca, y finalmente la muerte. (Bristol ; 1986)

2.3 MIOCARDIO ISQUEMICO

El problema fundamental en el miocardio isquémico es un inadecuado flujo sanguíneo en relación a los requerimientos tisulares, de tal forma que se está limitando el aporte de oxígeno y los sustratos necesarios para mantener la función y la integridad del tejido. La angina de pecho es el desorden mas común, se inicia como un desbalance entre el aporte y la demanda de oxígeno. Cuando la severidad y la duración de la isquemia alcanzan un nivel crítico como el que ocurre cuando se produce un daño irreversible en el tejido, el resultado es el infarto al miocardio (muerte de la parte afectada del miocárdio). Si

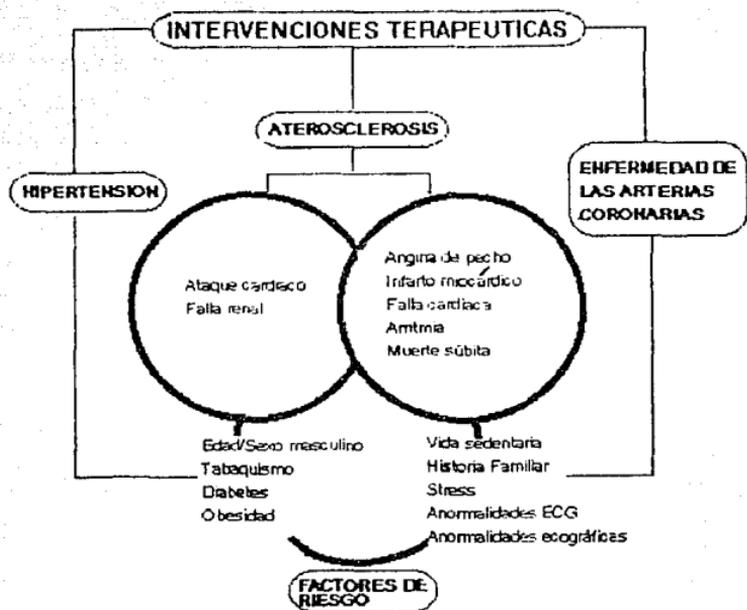


Figura 2.2 Las enfermedades cardiovasculares y sus interrelaciones. Los círculos destacan la naturaleza multifactorial de las enfermedades cardiovasculares. En la parte inferior se muestran los factores de riesgo (Bristol, 1986)

la isquemia persiste el área de tejido dañado puede abarcar una gran porción del corazón. Finalmente, se produce una falla cardíaca y posteriormente la muerte. Este es un ciclo vicioso que se inicia con la obstrucción coronaria (usualmente asociada con la aterosclerosis), que conduce a una isquemia miocárdica la que afecta la contractilidad miocárdica y la actividad cardiovascular. La reducción en el rendimiento cardíaco, la presión aórtica y la presión de perfusión coronaria, conducen a la isquemia y a la extensión de la necrosis hasta que ocurre la muerte. Los fármacos pueden aportar beneficios en la interrupción de este ciclo en diferentes puntos. El desequilibrio entre el aporte y la demanda de oxígeno puede ser corregido farmacológicamente de dos formas: disminuyendo la demanda de oxígeno y/o incrementando el aporte de oxígeno (Bristol; 1986).

2.4 INFARTO MIOCARDICO

Si la isquemia es lo suficientemente intensa y prolongada se produce lo que se conoce como infarto al miocardio. La importancia y la mortalidad debida al infarto se pueden relacionar con sus dimensiones. Cuando el área infartada excede el 40% del músculo ventricular existe un 90% de probabilidad de muerte (Connor y col, 1985), por lo que la mayoría de las investigaciones están encaminadas a evaluar aquellas intervenciones farmacológicas que permitan limitar y prevenir el infarto al miocardio.

La cantidad de tejido miocárdico infartado depende básicamente de la arteria ocluida, de tal forma que si se ocluye la arteria coronaria descendente anterior izquierda, el área afectada ocupará la pared anterior del ventrículo izquierdo cerca de la punta y dos tercios anteriores del tabique interventricular. Si la arteria ocluida es la arteria coronaria derecha, la zona afectada comprenderá la pared posterior del ventrículo izquierdo y el tercio posterior del tabique interventricular, finalmente si la arteria ocluida es la arteria coronaria izquierda, la zona afectada comprenderá la pared lateral del ventrículo izquierdo.

2.5 METODOS DE ESTUDIO

Los estudios que se han realizado para tratar de explicar el infarto al miocardio, se han encaminado a elucidar principalmente aspectos relacionados con la ultraestructura, los cambios bioquímicos, las alteraciones eléctricas, las intervenciones incluyendo la reperfusión, las farmacológicas, las físicas y las hemodinámicas (Boden y col; 1978, Vokonas y col.1976). Básicamente, las consecuencias del proceso isquémico se estudian de 2 maneras: una mediante modelos en animales y otra a través de estudios clínicos (Gold y col 1976).

2.5.1 Modelos en Animales

El estudio de las alteraciones bioquímicas, histológicas y ultraestructurales que ocurren durante el infarto al miocardio no pueden realizarse

directamente en el hombre, por lo que se han diseñado una gran variedad de modelos en animales, y a partir de ellos se han obtenido resultados con éxito.(Gold y col. 1976).

Para realizar estos estudios, se ha recurrido al uso de una gran variedad de especies de animales entre los que se encuentran, primates, perros, cerdos, gatos y ratas. Las observaciones se han obtenido a partir de animales intactos, en preparaciones en las cuales la perfusión coronaria es controlada, en corazones aislados, músculos papilares y células aisladas. (Kloner et al; 1980)

El perro es uno de los animales más empleados para el estudio del infarto al miocardio, debido a la anatomía coronaria tan semejante que presentan éstos en relación al humano. La oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda o la arteria circunfleja ha demostrado alteraciones hemodinámicas, electrocardiográficas y patológicas similares a las observadas en el hombre. Sin embargo, las diferencias entre el corazón de perro y el corazón humano prohíben la extrapolación de los resultados al hombre (Kloner y col 1980). Además el empleo de estos animales requiere de condiciones extremosas de laboratorio y los procesos quirúrgicos son más laboriosos.

Otro de los animales utilizados en el estudio del infarto al miocardio es el cerdo, esta especie presenta una distribución de las arterias coronarias similar a la del hombre, ambos presentan una arteria coronaria izquierda dominante que irriga la cara posterior del corazón. Otra ventaja que presenta esta especie es que posee poca

circulación colateral en la zona cercana a la oclusión lo que proporciona una área de isquemia uniforme muy adecuada para estudios histológicos (Spinale y col, 1989). En comparación con el perro esta especie resulta ser más resistente a los tratamientos. El manejo difícil de estas especies es el principal problema que se presenta para su empleo en estudios experimentales.

El gato también es utilizado para la evaluación experimental del infarto al miocardio, sin embargo, debido a que la anatomía coronaria de esta especie es muy variable resultan inconvenientes para el estudio del infarto al miocardio (Bristol;1986).

Desde 1946, la rata ha sido empleada para el estudio del infarto al miocardio. Johns y Olson (1954), describen el modelo experimental que consiste en la inducción artificial del infarto al miocardio en animales pequeños por medio de la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda in vivo. Posteriormente, Sayle y colaboradores en 1960 modifican dicho modelo y este último es el utilizado en este trabajo.

De acuerdo a Fishbein y col. (1978), la oclusión de la arteria coronaria izquierda en animales pequeños como la rata presenta las siguientes ventajas :

a) La oclusión de la arteria se realiza fácilmente y no requiere de equipo sofisticado de laboratorio.

b) Presenta ventajas económicas, ya que son especies fáciles de conseguir y de mantener.

c) El tamaño del corazón de rata es pequeño por lo que se pueden estudiar grandes áreas del corazón en pocas secciones histológicas, además la cuantificación del infarto es más fácil de realizar.

El modelo de infarto al miocardio en rata, se ha empleado para estudiar los cambios morfológicos que se desarrollan a consecuencia del infarto y para investigar el efecto de diversas intervenciones en la dimensión del infarto (Fishbein y col; 1978).

2.6.2 Estudios Clínicos

En el hombre la evaluación del daño isquémico se encuentra restringido sobre todo en lo referente al uso de técnicas directas. El daño en el infarto isquémico a nivel clínico se evalúa mediante : 1) el nivel de dolor, 2) irritabilidad ventricular, 3) alteraciones en el metabolismo del lactato, 4) técnicas radionucleares, 5) liberación de enzimas a partir del miocardio dañado y 6) mapeo electrocardiográfico del segmento S-T precordial.

Todas las técnicas antes mencionadas, presentan inconvenientes, a continuación se describen algunas desventajas que éstas presentan: la evaluación de los cambios en el metabolismo del lactato depende de la técnica de muestreo, el monitoreo de los cambios en la extensión de la zona isquémica necesita de más

investigaciones. La predicción del tamaño del infarto por medio de la desaparición de las curvas CPK requiere de 10 horas de retraso en el tratamiento y por lo tanto, no es aplicable cuando la terapia se debe aplicar durante las primeras horas después del infarto. El dolor es una medida muy subjetiva y no siempre es de origen isquémico . Aunque el uso de la elevación del segmento S-T precordial en pacientes no permite la evaluación cuantitativa del tamaño de un infarto, ésta es una técnica muy utilizada para evaluar los cambios direccionales en el miocárdio isquémico. Experimentalmente, la elevación en el segmento S-T se correlaciona adecuadamente con la reducción en la presión parcial de oxígeno en el miocárdio , reducción en el flujo coronario y la producción de lactato , cambios locales en los fosfatos de alta energía y lactato, y con la actividad de la CPK miocárdica, La técnica más importante para predecir las áreas dañadas por necrosis es definitivamente la microscopia óptica y electrónica. (Maroko y col, 1972).

2.6 ALTERACIONES HISTOLOGICAS DEL MIOCARDIO DEBIDAS A LA ISQUEMIA

La isquemia provoca alteraciones evidentes en la microestructura del músculo cardiaco. Las lesiones más características en los primeros estadios de la isquemia en el miocardio de perro, por oclusión experimental de la arteria coronaria descendente anterior, son el cambio de forma (de alargada a esferoide) y el hinchamiento de las mitocondrias, la disminución de las granulaciones citoplasmáticas, el edema intermiofibrilar y la dilatación de los túbulos longitudinales y de los

transversales. En estadios más avanzados se nota un marcado hinchamiento mitocondrial con aparición de formas de ovillo y vacías, ruptura de miofibrillas y destrucción de los discos intercalares. (Micheli; 1971)

Algunos otros autores señalan, pérdida de glucógeno en el sarcoplasma, los cambios en el sistema sarcotubular y principalmente las alteraciones en las mitocondrias, como índices sensibles de las fases tempranas de la isquemia en el miocardio. Además, se relata la acumulación de gránulos de grasa neutras en las células miocárdicas de la zona dañada (Micheli,1971) .

Estudios realizados por Greve y col, (1990). en corazones de gato sometidos a un período isquémico de 10 minutos mostraron un considerable aumento en la fragilidad del sarcolema, hinchamiento de la mitocondria, acumulación de gotas de lípidos, cambios similares se observaron en el estudio realizado en cerdos por Spinale y col.(1989).

La mayoría de los autores coinciden en señalar que los cambios observados después de periodos isquémicos de 15-20 minutos son evidencia de daño irreversible, entre estos cambios se encuentran los reportados en un estudio realizado en el miocárdio de cerdo sometido a un período isquémico de 15 minutos, este se caracteriza por la pérdida de la arquitectura celular, hinchamiento y separación de crestas mitocondriales, aparición de cuerpos amorfos en la matriz mitocondrial, y la presencia de núcleos en los que la migración de la cromatina nuclear es evidente. Herdson, y

colaboradores (1965); señalan cambios similares en el periodo de 20-40 minutos de isquemia además de un marcado edema del retículo sarcoplásmico y ruptura de las crestas y membranas externas de las mitocondrias.

Los cambios antes mencionados, se van acentuando con el paso del tiempo y a los 60 minutos es posible observar edema intracelular, lo que se manifiesta por la separación de la membrana del sarcolema de los miofilamentos y en algunas zonas se puede observar incluso la ruptura de la membrana.

La muerte celular progresa en diferentes niveles en las diferentes regiones del corazón con el paso del tiempo la onda de células muertas progresa del subendocárdio al subepicárdio completándose el proceso en la séptima semana. (Robbins, 1989)

El uso de técnicas semicuantitativas para evaluar el daño en las células y organelos, han facilitado la caracterización de los detalles ultraestructurales que se producen como consecuencia del proceso isquémico. Estas mismas técnicas pueden ser aplicadas en células que han estado sujetas a intervenciones farmacológicas (Gottfried y col. 1990).

2.7 INTERVENCIONES FARMACOLOGICAS

TABLA 2.2 INTERVENCIONES FARMACOLOGICAS QUE REDUCEN EL TAMAÑO DEL INFARTO

Bloqueadores b-adrenérgicos	Atenolol Metoprolol Practolol Propranolol Timolol
Bloqueadores del canal lento de calcio	Verapamil Nifedipina
Nitritos	Nitroglicerina Nitroprusiato de Sodio
Esteroides	Hidrocortisona Metoprednisolona
Antiinflamatorio de tipo no esteroide	Aspirina Dipiridamol Ibuprofen Indometacina Piroxicam Sulfpirazona
Agentes Trombolíticos	Estreptoquinasa Uroquinasa Activadores del plasminógeno tisular
Enzimas	Hialuronidasa
Agentes atrapadores de radicales libres	Alopinolol Catalasa Mantol Superóxido de dismutasa

(Campbell y col 1986).

Los intentos para disminuir el tamaño del infarto han llevado a la realización de numerosos estudios experimentales y clínicos dentro de este campo, por lo que las intervenciones farmacológicas, han sido ampliamente estudiadas con el fin de obtener mejores resultados en la disminución del tamaño del infarto (Campbell y col, 1986).

Los resultados que arrojan los estudios en los modelos experimentales que se realizan para reducir el tamaño del infarto miocárdico difieren entre los diferentes protocolos, estas diferencias son debidas a la especificidad de los modelos experimentales, el tiempo y la dosis de fármaco (Kloner y col, 1980)

Los mecanismos de acción precisos de muchos de estos fármacos son desconocidos pero los estudios realizados han demostrado que (Kloner y col, 1980):

- 1) Mejoran la relación entre el aporte y demanda de oxígeno por incremento en el aporte de éste, por la reducción de la demanda o bien por ambos.
- 2) Mejoran la distribución de sustratos en células isquémicas.
- 3) Estabilizan y previenen alteraciones en la permeabilidad del sarcolema.
- 4) Inhiben la respuesta inflamatoria que contribuye en mucho a la muerte celular.
- 5) Previenen la inflamación celular

6) Inhiben la entrada de calcio.

Agentes β -Bloqueadores Adrenérgicos

Los bloqueadores β -adrenérgicos actúan reduciendo la composición del oxígeno miocárdico por reducción de la frecuencia cardiaca, la contractilidad y la presión sanguínea (Campbell y col, 1986). El bloqueo de los receptores β pueden también reducir los niveles de catecolaminas en el corazón isquémico (Mueller et al, 1980), y producir una redistribución del flujo sanguíneo coronario (Pitt y col, 1970). Además de que disminuyen la elevación del segmento ST epicárdico (Libby y col, 1973), desarrollo de la onda Q (Miura y col, 1979), y liberación enzimática.

Bloqueadores del Canal Lento de Calcio.

Los mecanismos complejos de acción por medio de los cuales los fármacos bloqueadores del canal lento de calcio ejercen su efecto involucran, (Antman y col, 1980):

- a) Antagonismo del flujo de calcio a través de las membranas.**
- b) Vasodilatación coronaria y de los vasos sanguíneos periféricos.**
- c) Reducción de la contractilidad cardiaca.**

d) Reducción de la postcarga ventricular izquierda, lo que conduce a disminuir la carga sistólica del ventrículo izquierdo reduciendo así los requerimientos del oxígeno miocárdico.

Nitratos

Los nitratos orgánicos como la nitroglicerina y el nitroprusiato de sodio, aumentan la vasodilatación arterial, (Campbell y col, 1986). Awan y col. en 1976 reportaron que la nitroglicerina reduce la elevación del segmento S-T, interpretando este hecho como la reducción de tamaño del infarto debido a la reducción en la composición del O₂ miocárdico.

Esteroides

Quizás este tipo de fármacos son los que causan mayor controversia en el tratamiento para la reducción del tamaño del infarto. La razón del uso de éstos es debida a que, (Robert y col. 1980):

- 1) Estabilizan la membrana lisosómica, lo que inhibe la liberación de estas enzimas , y juegan un papel muy importante en la necrosis celular.
- 2) Estabilizan otras membranas celulares.
- 3) Disminuyen la respuesta inflamatoria que ocurre durante el infarto agudo del miocardio.

Agentes trombolíticos

En la mayoría de los infartos miocárdicos, la trombosis coronaria es el final más común en la oclusión de la arteria coronaria. Por lo tanto, el objetivo de la terapia trombolítica con estreptoquinasa, uroquinasa o activadores del plasminógeno tisular inducen a la disolución del trombo (Reimer, 1977; Ellis y col, 1983).

Es así, como la administración temprana de la terapia trombolítica resulta de la recanalización de la arteria coronaria ocluida y por consecuencia la reperusión de la zona isquémica. Esto lleva a salvar al miocárdio isquémico, reducir el tamaño del infarto y una mejoría eventual en la función miocárdica (Campbell y col. 1986).

Enzimas

La hialuronidasa presenta un mecanismo de acción confuso pero supone la despolimerización del ácido hialurónico en el espacio intersticial a las células isquémicas, aumentando la entrada de nutrientes y el consumo de productos metabólicos (Maroko y col. 1972). También parece ejercer efectos benéficos en el flujo sanguíneo colateral (Opie y col. 1969).

Agentes Atrapadores de Radicales Libres

Estos agentes tiene efecto hiperosmótico, mejoran la función ventricular y el flujo sanguíneo colateral y reducen la elevación del segmento ST epicárdico (Willerson y col. 1972), experimentalmente.

Probablemente, no tenga ninguna utilidad significativa en la clínica, ya que aumenta la osmolaridad plasmática, estos agentes pueden tener serios efectos adversos en el sistema nervioso central (Kloner y col. 1980).

Glucosa Insulina Potasio (GIK)

El GIK reduce la isquemia y la muerte celular por medio de la actividad miocárdica de la creatin cinasa (CK) (Boden y col. 1978, Opie y col. 1975).

La razón del uso de esta combinación, de estos agentes es que ellos incrementan la producción de energía en la isquemia miocárdica por estimulación de la glucólisis anaerobia (Kloner y col. 1980).

2.8 PROPRANOLOL

2.8.1 Antecedentes

El primer agente antagonista de los receptores β -adrenérgicos, la dcloroisoprenalina (DCI), es descrita por Powell y Slater (1958), quienes demuestran que el DCI bloquea un gran número de efectos inhibitorios de la adrenalina, tanto en tejidos aislados como en animales íntegros. Moran y Perkins (1958) observan que el DCI bloquea selectivamente los efectos cardioestimulantes de la isoprenalina, la adrenalina y la estimulación simpática.

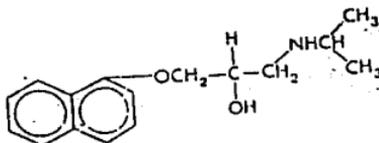
Posteriormente Black y Stephenson en 1962, prepararon y probaron gran número de compuestos, y el primero en mostrar ventajas sobre el DCI fue el pronetanol, éste presenta efectos estimulantes iniciales mucho menores, sin embargo inhibe significativamente las taquicardias y la angina de pecho. De este modo, el pronetanol es introducido en la clínica, lo que posteriormente tuvo que suspenderse ya que estudios realizados demostraron efectos carcinógenos en ratones.

Para entonces Black y col. en 1962, encuentran un agente bloqueador de los receptores β -adrenérgicos, no carcinógeno y más potente que el pronetanol y carente casi por completo de actividad simpaticomimética intrínseca. Esta sustancia se denominó PROPRANOLOL y es descrita por primera vez por Black, Duncan y Shankas en 1965 .

Es así como, el propranolol se ha estudiado exhaustivamente tanto desde el punto de vista experimental como clínico .

2.8.2 Características generales

Estructura (figura 2.3)



Fórmula desarrollada: C₁₆H₂₁NO₂

Nombre químico: 1-isopropil-amino-3-3(1-naftiloxi)-2-propranol. (en su forma de clorhidrato)

PM= 259.3 mg/mmol

Descripción: Polvo blanco o casi blanco inodoro, con sabor amargo, estable al calor, inestable por exposición a la luz y no higroscópica. Funde a 161 °C (Remington y col. 1987).

2.8.3 Carácter Químico

El núcleo bencénico permite poseer una potente afinidad por los receptores adrenérgicos β así como la cadena lateral con una amina secundaria. Un hidrógeno libre del grupo amino parece ser esencial para la actividad del receptor β . El hidroxilo en el carbono β de la cadena lateral también tiene importancia, por su actividad antagonista. La configuración óptica del carbono β tiene gran importancia, ya que los isómeros levógiros (-) son mucho más activos que los dextrógiros (+) o los isómeros. Así la forma (+) del propranolol tiene menos de 1% de la potencia de la forma (-) para bloquear receptores adrenérgicos β (Goodman, 1978).

2.8.4 Metabolismo

Se absorbe adecuadamente después de ingerirlo, a partir del tracto gastrointestinal. Se concentra en pulmones y en menor medida en cerebro, hígado, riñones y corazón. Alrededor del 50% del fármaco, es metabolizado por el hígado a medida que se va absorbiendo lo que se denomina efecto del primer paso. Estudios realizados por Hayes y Cooper 1971, han demostrado que se excreta por la orina después de experimentar metabolismo casi completo. Más del 90% del propranolol en la circulación está conjugado a proteínas plasmáticas (Evans y col, 1973). La vida media del fármaco es de 3 horas (Shand y col, 1970).

Estudios realizados en perros y humanos por Walle y Gaffney 1972, han encontrado en orina de éstos, 8 metabolitos siendo el más importante el 4-hidroxi propranolol, éste tiene actividad de bloqueo semejante a la del propranolol de acuerdo a los hallazgos de Fitzgerald y O'Donnell, 1971.

2.8.5 Estudios Experimentales

Sin duda, el fármaco que más se ha utilizado en estudios experimentales para reducir el tamaño del infarto es el PROPRANOLOL, así lo demuestran algunos trabajos realizados por Grayson y col. 1983; Clayton y col. 1976; Heng y col. 1976; Reimer y col. 1976.

Estudios iniciales realizados por Reimer y Jenning utilizando el modelo de perro, al que se le oclufa la arteria coronaria circunfleja, encuentran que el propranolol reduce significativamente la necrosis en el miocardio isquémico. Este resultado fué evaluado mediante el análisis histológico del músculo papilar posterior.

Se ha propuesto, que el propranolol puede reducir la isquemia por reducción en la composición del oxígeno miocárdico debido al bloqueo simpático, que influye en la disminución de la frecuencia y contractilidad cardiaca (Grayson y col .1983).Obeid y col, (1976), demuestran que el propranolol preserva el trifosfato de

adenosina (ATP), en el miocárdio isquémico, sugiriendo de este modo que la demanda de oxígeno pueda ser reducida.

Kloner y colaboradores en 1976 miden el flujo sanguíneo miocárdico utilizando microesferas y xenón radioactivo demostrando así que el propranolol reduce el flujo sanguíneo en el miocardio isquémico y el no isquémico, reduciendo de este modo la elevación del segmento ST y del dióxido de carbono intramural (PCO_2). Esto sugiere que el propranolol reduce la demanda de oxígeno y como consecuencia el flujo coronario sanguíneo.

Respectivamente en 1971 y 1972 Maroko y col y Watanabe y col. demuestran que el propranolol reduce la elevación del segmento ST epicárdico lo que conduce a preservar la actividad de la creatín fosfoquinasa miocárdica, tras haber ligado la arteria coronaria descendente anterior izquierda en perros.

Posteriormente, en un estudio más detallado realizado por Miura y col. en 1979, observan que este fármaco tiene la capacidad de reducir la elevación del segmento ST en registros precordiales, la inclinación de la onda R y el desarrollo de la onda Q.

Es así como, el propranolol ha demostrado experimentalmente que tiene efectos benéficos en la isquemia aguda por:

- 1) Reducción en la elevación del segmento ST epicardial
- 2) Reducción de la creatin fosfoquinasa en la región isquémica
- 3) Reducción histológica de la necrosis en el músculo papilar posterior.
- 4) Reducción del tamaño del infarto expresado en porcentaje en el ventriculo izquierdo.

Por otra parte Nayler y col en 1978, encontraron que el propranolol presenta efectos favorables en la mitocondria, este bloqueador mejora la función mitocondrial en el miocárdio isquémico. Kloner y col en 1978 encuentran que animales tratados con propranolol antes de realizarles la oclusión coronaria reducen el edema mitocondrial.

Estudios realizados por Clayton H. y col. 1976, y Grayson G y col. 1983. Indican que la dosis de Propranolol de 1mg/Kg es la que ha mostrado mejores resultados .

Norris y col, 1978 y Yusuf y col, 1983; mediante el análisis enzimático y electrocardiográfico, sugieren que los β -bloqueadores adrenérgicos reducen el tamaño del infarto, si estos agentes son administrados en las primeras horas de los síntomas del infarto agudo del miocardio

De acuerdo a Mueller y col, 1974 demuestran que el propranolol mejora notablemente el metabolismo miocárdico en pacientes con necrosis miocárdica.

3. OBJETIVOS

OBJETIVOS

- **Determinar los cambios estructurales y ultraestructurales que se presentan en el infarto miocárdico cuatro horas después de la ligadura coronaria experimental en rata mediante el análisis en microscopía óptica y electrónica.**
- **Determinar el efecto del Propranolol en este mismo modelo experimental de infarto miocárdico sobre los cambios estructurales y ultraestructurales del músculo cardíaco después de cuatro horas postoclusión.**

4. MATERIAL Y METODOS

4.1 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se emplearon 21 ratas Wistar macho cuyos pesos oscilaban entre los 250 300g, de 8 a 9 semanas de edad distribuidas en tres grupos. El primer grupo (5 ratas) fué el control sin oclusión al que no se le administró ninguna solución y/o fármaco; el segundo grupo (8 ratas) fué el grupo control con oclusión, sólo se le administró solución salina fisiológica (S.S.F.) y el tercer grupo fué el grupo con oclusión y fármaco (8 ratas) al cual se le administró propranolol en una dosis de 1 mg/Kg de peso por vía intramuscular, utilizando como vehículo S.S.F. Ver tabla 4.1 y figura 4.1.

Tabla 4.1 Diseño Experimental

GRUPO	NUMERO DE RATAS	SOLUCION Y/O FARMACO
1) Control sin oclusión	5	Ninguno
2) Control con oclusión	8	Solución salina fisiológica
3) Con oclusión y fármaco	8	Propranolol (1.0 mg/kg) (I.M)

METODOLOGIA

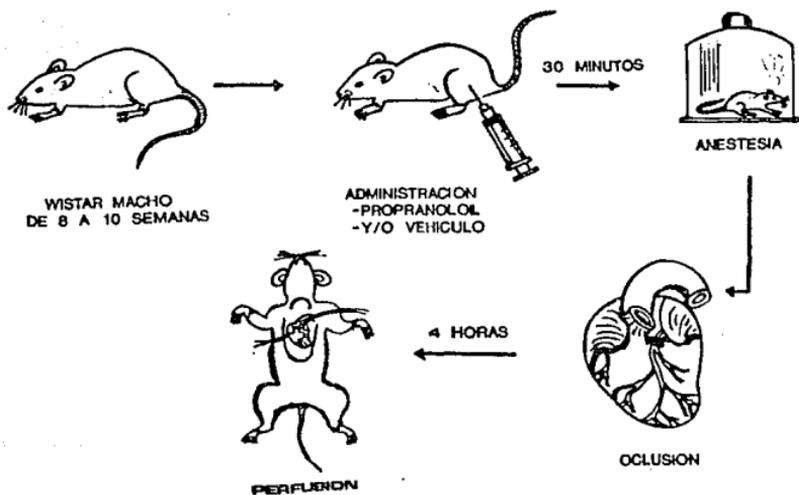


Figura 4.1 Etapas de la metodología empleada para la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda (Jhons y Olson 1954) y la perfusión.

4.2 OCLUSION

En un período de 30 minutos posteriores a la administración del propranolol y/o S.S.F., los animales fueron anestesiados con éter etílico en una cámara de anestesia, (figura 4.1) permaneciendo en esta el tiempo necesario para que sufrieran pérdida del equilibrio y así permanecieran inmóviles. En este momento, la rata se extrajo de la cámara de anestesia y se colocó en la mesa de disección de tal forma que el costado izquierdo del animal quedara expuesto hacia arriba. Posteriormente se realizó una incisión vertical en la piel, aproximadamente a un centímetro de la axila posterior izquierda, de una longitud de 2 cm. A continuación se separó el tejido muscular torácico presionando la punta de la pinza en el tejido y abriéndolo ligeramente para separar el músculo y se realizó una toracotomía entre la cuarta y quinta costilla, presionando ligeramente la punta de la pinza en el espacio intercostal, hasta que el orificio del espacio intratorácico fuera de un centímetro aproximadamente. Con la porción posterior de la pinza de disección se extrajo el corazón de la cavidad torácica y se inmovilizó parcialmente tomándolo entre los dedos medio y pulgar. Posteriormente, con el dedo índice se levantó la aurícula y se localizó la arteria coronaria descendente anterior izquierda. Fig.4.1

La oclusión de la arteria coronaria se realizó pasando un hilo seda (4/0) por medio de una aguja atraumática. Posteriormente, se retiró la aguja y el hilo seda se amarró por medio de un nudo alrededor de la arteria (figura 4.1). El exceso de hilo se eliminó y el corazón se regresó a la cavidad torácica. Esta fue cerrada de forma temporal

con la ayuda de una pinza y se restableció la ventilación con una bombilla de hule. En seguida, se lavó la zona en la que se realizó la intervención con S.S.F. y se retiraron las pinzas, se suturó el músculo con hilo seda (1/0) utilizando puntos continuos, y finalmente se realizó la sutura de la piel con hilo (1/0) por medio de puntos continuos.

4.3 PERFUSION

Cuatro horas después de realizada la oclusión las ratas fueron anestesiadas con éter. Una vez anestesiado el animal se colocó en la mesa de disección en posición supino dorsal sujetándole las extremidades firmemente con pinzas de disección y tijeras, se hizo una incisión longitudinal a partir del esternón hacia la cabeza, de aproximadamente 5cm, se separó el esternón y se cortaron las costillas sujetándolas hacia los lados de manera que el corazón quedara expuesto (figura 4.1). Se localizó la aorta y la vena cava inferior y se obstruyó la circulación sanguínea por medio de unas pinzas homeostáticas, posteriormente se introdujo un punzocat en la aorta a una distancia aproximada de 5-10 mm del ventrículo izquierdo. A continuación se extrajo la aguja y se conectó a la manguera proveniente de la venoclisis la cual se colocó a una altura de 1.50m conteniendo buffer de fosatos (pH=7.2) a una temperatura de 37 °C, en este momento se abrió la llave de paso para permitir la entrada de buffer a través del corazón y en este momento se hizo una incisión en la pared de la vena cava inferior para continuar así la vía de salida de la sangre del animal, y de las soluciones perfundidas. Posteriormente, se continuó la perfusión hasta que se observaron los vasos sanguíneos

limpios . Se interrumpió el flujo de buffer y se introdujeron 10ml de glutaraldehído al 2%, a través de la "Y" del aparato de venoclisis a una presión tal que impidiera el hinchamiento del corazón y que a su vez permitiera que el corazón continuara latiendo. Finalmente, se extrajo el corazón de la cavidad torácica y se lavó con S.S.F., manipulándolo lo menos posible.

4.4 PREPARACION DEL TEJIDO

Cada corazón fué cortado en secciones transversales de aproximadamente 1mm de espesor del ápice a la base, obteniéndose ocho secciones. Se tomó la sección 1 (ápice) para ser analizado por Microscopía Electrónica y las secciones 2 y 5 (de ápice a base) para ser analizadas por Microscopía Óptica (figura 4.2).

4.3.1 Microscopía Óptica

Las secciones transversales 2 y 5 de cada animal fueron procesadas para ser teñidas por la tinción tricrómica de Masson. Con esta técnica se pueden diferenciar varios componentes del tejido como son : núcleos (morado a negro), citoplasma (violáceo), fibras musculares (rojo), y tejido conectivo (azul) y eritrocitos (rojo) .

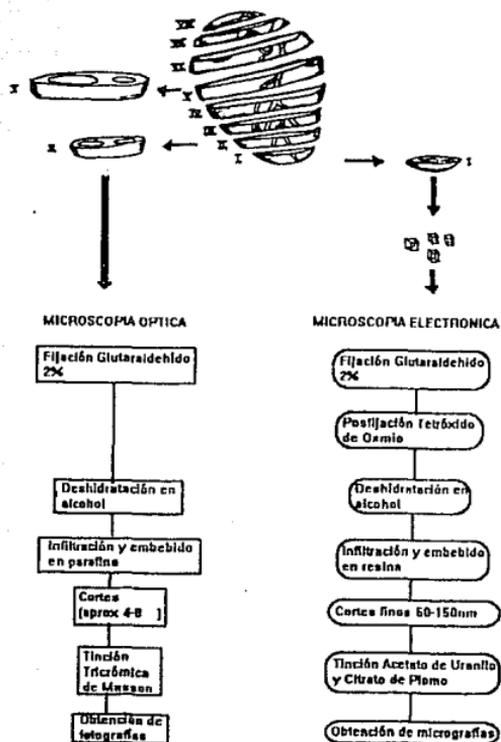


Figura 4.2 Etapas del procesamiento de muestras para las fases experimentales microscopía óptica y electrónica.

Las secciones transversales fueron fijadas con glutaraldehído al 2% y deshidratadas con alcoholes de concentración ascendente (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%). Después de la deshidratación se realizó el proceso de aclaramiento que consistió en sustituir el alcohol deshidratante por un disolvente de la parafina. En este paso se utilizaron 2 cambios de Xilol por periodos de 1 hora. La infiltración en parafina se realizó colocando las muestras en recipientes que contenían parafina fundida generalmente a 56 °C (punto de fusión de la parafina), por lo que debido al calor el Xilol se evaporó y los espacios ocupados por este fueron sustituidos por la parafina que al solidificar confiere al tejido dureza y soporte para ser cortado, ya que la muestra fué infiltrada se colocó en un recipiente cúbico que contenía parafina fundida, dejándose solidificar a temperatura ambiente (Gaviño et al, 1984). El bloque de parafina fué cortado con un microtomo que cuenta con una cuchilla de acero, la cual permitió realizar cortes de 4 a 8 mm de espesor. Los cortes obtenidos fueron extendidos sobre agua caliente (40°C) que contenía grenetina diluida y posteriormente éstos fueron adheridos a un portaobjetos, por medio de un baño de flotación de tejidos y platina térmica. Una vez realizado lo anterior, la muestra quedó lista para el siguiente proceso que fué la coloración. El procedimiento a utilizar fué el siguiente (Cantwell et al; 1981): Se colocaron cortes desparafinados e hidratados en solución Bouin durante 1 hr 56 °C, fueron enfriados y lavados con agua corriente hasta que desapareció el color amarillo. Se enjuagaron con agua destilada y fueron colocados en una solución de Hematoxilina-Fe de Weigert durante 5 minutos. Después se lavaron con agua corriente durante 10 minutos y se enjuagaron con agua destilada, se colocaron en una solución de escarlata Biebrich y fuchsina durante 2 minutos. Se lavaron con agua destilada y se

colocaron en una solución ác. fosfomolibdico y ác. fosfotungstico durante 10 minutos. Se colocaron en una solución de anilina azul por 3 minutos en ácido acético glacial al 1%. Se deshidrataron en alcohol al 96% y 100% y se aclararon con Xilol, finalmente se montaron los cortes con resina sintética.

4.3.2 Microscopía Electrónica

La sección transversal 1 del corazón fue cortada por la técnica de navajas encontradas para evitar el desgarramiento del tejido, hasta obtener fragmentos de aproximadamente 2 milímetros cúbicos de tejido, estos fragmentos se fijaron con solución de glutaraldehido al 2% por espacio de dos horas, después de este tiempo los fragmentos de tejido se sometieron a 3 lavados de 10 minutos cada uno con solución buffer de fosfatos (pH=7.2). Posteriormente, se realizó la postfijación del tejido con tetróxido de Osmio durante 2 horas, finalizado este tiempo los fragmentos de tejido fueron sometidos nuevamente a 3 lavados con solución buffer de fosfatos por espacio de 10 minutos cada uno. Al finalizar, se continuó con la deshidratación de las muestras, para ello se utilizaron alcoholes de concentración ascendente (40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% y 100%), las muestras permanecieron 10 minutos en cada uno de los alcoholes, en el alcohol al 100% se realizaron 2 cambios. Dos trozos de tejido fueron infiltrados con resina epóxica de la manera siguiente :

Oxido de propileno 2 Cambios/10 minutos

Oxido de propileno-resina 2:1/ 60 minutos

Oxido de propileno- resina 1:1/ 60 minutos

Oxido de propileno- resina 1:2/ toda la noche en refrigeración en un recipiente cerrado herméticamente.

La inclusión se llevó a cabo al día siguiente. Las muestras se colocaron en resina de 3 a 4 horas a temperatura ambiente. Se continuó la inclusión en resina incubandose a 35°C, 40°C, 50°C y 60 °C por 24 horas para cada temperatura, hasta obtener la dureza adecuada del bloque y poder ser seccionado en cortes de 60-150 nm. de grosor .

Los bloques obtenidos poseían una superficie extremadamente grande para realizar los cortes delgados, por lo que fué necesario recortar el exceso de medio de inclusión por medio de una hoja de rasurar para exponer el tejido. Posteriormente, la muestra fué montada en el sostén de bloques y observada con el microscopio estereoscópico, con la finalidad de eliminar el exceso de medio de inclusión el cual fué removido usando una hoja de rasurar nueva para formar una pirámide truncada que proporcionó soporte en el momento del corte. A continuación, se realizó el corte de los bloques en un ultramicrotomo (ultracut E) provisto de una cuchilla de vidrio para obtener cortes de fase cuyos grosores oscilan entre los 150 y 200 nm (azul y púrpura), los cortes fueron colocados con ayuda de un asa de inoculación en un portaobjetos sobre una gota de agua destilada para ser teñidos con azul de toluidina y examinados con el microscopio de luz de manera que la zona final para el corte pudiera ser seleccionada. Cuando se localizó esta zona el exceso de material se recortó del bloque empleando una hoja de rasurar . La zona seleccionada para el corte se mantuvo lo más pequeña posible,

conservando la forma de pirámide truncada . Cuando se delimitó la zona de corte se obtuvieron cortes de un grosor entre los 60-150nm de espesor (dorados o plateados). Estos se recogieron en rejillas de 200 - 300 mesh, una vez obtenidos los cortes fueron teñidos con la tinción electroconductiva de acetato de uranilo (Solución de Watson, 1958) y citrato de plomo (solución de Reynolds, 1963). (Nunn,1976 y 1975). Los cortes obtenidos se observaron orientados en forma transversal y longitudinal, en el microscopio electrónico de transmisión (JEM-100S), obteniéndose micrografías panorámicas (de 5000 a 10000 aumentos) y ampliaciones (de 15000 a 40000 aumentos). Se realizaron dos mediciones cuantitativas sobre la estructura mitocondrial. La primera consistió en un conteo por puntos para determinar las fracciones de volumen de las mitocondrias y consistió en la sobreposición de una hoja cuadrículada transparente sobre la micrografía en la que cada cuadro representó 1mm^2 , considerando siempre la magnificación de cada micrografía (Frances et al,1987). Se contaron los cruces que quedaron sobrepuestos a las mitocondrias y se dividieron entre el total de cruces que abarcaba la micrografía, obteniéndose la relación de volumen (Pauly's, 1987). En la segunda medición se determinó el número de mitocondrias que se encontraban en 100mm^2 . Con las mismas micrografías se obtuvieron datos semicuantitativos en cuanto al grado de daño de las mitocondrias, basándonos en los estudios realizados por Kloner y colaboradores en 1978, clasificando las mitocondrias en los siguientes grados:(Ver figura 5.5)

Grado 0= Mitocondria normal.

Grado 1= Hinchamiento manifestado por pérdida de la densidad de la matriz y separación de crestas de la mitocondria.

Grado 2= Hinchamiento masivo con ruptura de crestas y ruptura de la membrana externa e interna de la mitocondria.

También se obtuvieron datos cuantitativos de la longitud de los sarcómeros y datos semicuantitativos en cuanto al porcentaje de núcleos que presentaron migración de la cromatina nuclear .

5. RESULTADOS

5.1 MICROSCOPIA OPTICA.

La ligadura de la arteria coronaria en rata produjo cambios histológicos apreciables, observándose, que las variaciones dentro de un mismo grupo fueron mínimas mientras que las diferencias entre los tres grupos fueron bastante marcadas.

El grupo control sin oclusión (Grupo 1), nos sirvió como referencia para evaluar los cambios presentados por el grupo control con oclusión y sin fármaco (Grupo 2) y el grupo con oclusión y fármaco (Grupo 3). Estos cambios fueron:

5.1.1. Cambios en las fibras miocárdicas

Las observaciones muestran la presencia de necrosis coagulativa en los grupos 2 y 3. La zona de infarto se caracterizó por la presencia de gránulos de proteínas desnaturalizadas dentro de la fibra, que no pierde su estructura. (figura 5.1b). En los márgenes de la zona infartada, las fibras mostraron ondulación y adelgazamiento severo en ambos grupos, y en algunos casos la separación entre las fibras es ocupada por líquido intersticial. (figura 5.1c). Las zonas restantes de ambos grupos mostraron cambios moderados ya que solamente algunas fibras presentaron las alteraciones antes mencionadas

5.1.2 Infiltración de células inflamatorias

El ventrículo izquierdo de los grupos 2 y 3 presentaron una marcada proliferación de linfocitos y neutrófilos en la zona del pericardio, observándose una infiltración de dichas células a la zona del miocardio infartado principalmente en el grupo control con oclusión, en tanto que la infiltración de estas células fue moderada en el Área alejada del infarto de ambos grupos

5.1.3 Macrófagos

Principalmente, se observaron macrófagos en los grupos 2 y 3 en el área alejada a la zona de infarto . La presencia de estas células fué mayor en el grupo 3, ver fotografía 5.1d.

5.1.4 Cambios tisulares

Específicamente, los cambios tisulares evaluados fueron :Edema, congestión y hemorragia (figuras 5.2a y 5.2b). La proliferación mas abundante de estos cambios se observó en la zona de infarto y fue disminuyendo gradualmente al alejarse de esta zona, este comportamiento se observó en los grupos 2 y 3. Dichos cambios son más severos en el grupo 2 que en el grupo 3.

5.1.5 Fibroblastos y fibras de colágeno

La presencia de fibroblastos se observó en su mayoría en los espacios dejados por la fibras que sufrieron adelgazamiento. En el márgen de la zona infartada el grupo 2 mostró una severa proliferación de fibroblastos disminuyendo notablemente en el ventrículo derecho. En tanto que el grupo 3 presentó una proliferación moderada de fibroblastos la que fue uniforme en todas las porciones estudiadas (ver figura 5.2c). La tinción utilizada permitió observar fibras de colágeno en las zonas adyacentes al área infartada principalmente en el grupo 2.

Los resultados del estudio a nivel de microscopia óptica se muestran en las tablas 5.1 y 5.2.

Tabla 5.1 Cambios Observados a Nivel de Microscopia Óptica en la Zona 2 del corazón

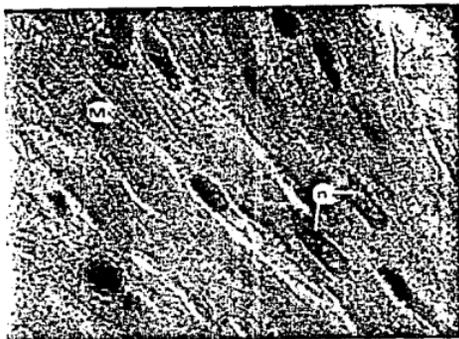
	Ventrículo Izquierdo		Ventrículo Derecho			
	Zona de infarto	Zona alejada del infarto	II	III	II	III
Necrosis coagulativa	2	2	1	1	1	1
Ondulación de Fibras	2	2	1	2	1	1
Adelgazamiento de fibras	2	2	1	1	1	1
Edeema	?	1	1	1	0	1
Infiltración de Polinorionucleares	2	1	1	1	1	1
Fibroblastos	2	1	2	0	1	0
Macrófagos	1	1	0	2	0	0
Hemorragia y congestión	2	1	2	2	2	1

2= Daño Severo, 1=Daño moderado, 0=Ausencia de Daño
 II = Grupo 2 : Con oclusión III = Grupo 3: Con oclusión y fármaco

Tabla 5.2 Cambios Observados a Nivel de Microscopía Óptica en la Zona 5 del corazón

	<i>Ventrículo Izquierdo</i>				<i>Ventrículo Derecho</i>	
	Zona de Infarto		Zona alojada del infarto		II	III
	II	III	II	III		
Necrosis coagulativa	2	2	1	1	1	1
Ondulación de Fibras	2	2	1	1	1	1
Adelgazamiento de fibras	2	1	1	1	1	1
Edema	1	1	2	1	1	1
Infiltración de Polimorfonucleares	2	2	1	1	1	1
Fibroblastos	2	1	2	1	1	1
Macrófagos	1	1	1	1	1	0
Hemorragia y congestión	2	2	2	1	1	1

2= Daño Severo, 1=Daño moderado, 0=Ausencia de Daño
 II = Grupo 2: Con ocluz III = Grupo 3: Con ocluzión y fármaco



A



B



C



D

Figura 5.1 Músculo cardíaco de rata. Tinción Tricrómica de Masson (x100) A Sección longitudinal. Aspecto normal. Se aprecia la disposición central de los núcleos (n), miofibrilas (M) dispuestas paralelamente. B Sección longitudinal. Daño isquémico. Se observa el espacio denuclear (E), núcleo (n) y necrosis coagulativa (N). C Sección longitudinal. Daño isquémico. Se aprecia el adelgazamiento (A) y ondulación (o) de fibras, necrosis coagulativa (N) y fibras de colágeno (c). D Sección transversal. Daño isquémico, es evidente la necrosis coagulativa (N), se observa un moteado (m) y fibras de colágeno (c).



Figura 5.2 Músculo cardíaco de rata con daño isquémico. Unión Incrómica de Masson A Sección semilongitudinal, es evidente la compresión (c) y adelgazamiento de las fibras (A) B Sección transversal, se observa proliferación de células sanguíneas entre las fibras, lo que se denomina hemorragia (H) C Sección longitudinal, se aprecian miofibrillas dispuestas paralelamente (M), núcleos coagulativos (N), fibroblastos (F) y fibras de colágeno (c). Magnificaciones : A y B x40 C x100

5.2 MICROSCOPIA ELECTRONICA

5.2.1 Resultados Cualitativos

La figura 5.3 muestra la comparación entre las estructuras celulares del grupo control sin oclusión (Grupo 1), el grupo sometido a un proceso isquémico de 4 horas (Grupo 2) y el grupo con oclusión y fármaco (Grupo 3).

Las células miocárdicas del grupo 1, presentaron una morfología normal. La figura 5.3a corresponde a una micrografía del grupo 1, en la que se puede observar la ultraestructura de una célula normal caracterizada por su aspecto compacto, por la presencia de mitocondrias de forma alargada compacta y distribuidas a lo largo de las miofibrillas las cuales se encuentran en estado de relajación, también se puede observar un sistema de tubulos T bastante evidente. Otra característica de estas células fueron los núcleos con cromatina dispersa (figura 5.4a).

El tejido correspondiente al grupo con oclusión se ilustra en la figura 5.3b en la que se pueden apreciar cambios cualitativos en la estructura celular resultado del daño provocado por el proceso isquémico, se puede apreciar: la pérdida de la arquitectura celular, edema y lisis mitocondrial, edema interniofibrilar, ausencia de sistema de tubulos T, y ruptura de miofibrillas. Se observaron algunas zonas con miofibrillas en estado de contracción. En la figura 5.4b se puede observar un núcleo

característico de este grupo en el que se observa la marginación y espiralización de la cromatina nuclear (figura 5.4b).

El aspecto del tejido sometido a un proceso isquémico en presencia de propranolol se muestra en la figura 5.3c en éste es evidente el edema intermiofibrilar, hinchamiento mitocondrial. Aunque hay lisis de algunas miofibrillas existe una mayor conservación de la estructura miofibrilar. Cabe destacar que dentro de este grupo predominaron los núcleos con migración y espiralización de la cromatina nuclear. Figura 5.4b.

5.2.2 Resultados Cuantitativos

Tabla 5.3 Resultados del Estudio a nivel Ultraestructural

Grupo	Número de mitocondrias en 100µ	Vr mitocondrias	Grado de Daño (%)			Marginación de cromatina (%)	Longitud de sarcómero (µ)
			0	1	2		
1	25.09 ± 5.5	11.04 ± 3.0	99.20	00.71	00.00	0	2.4552 ± 0.2501
2	24.80 ± 3.3	25.44 ± 1.3	30.12	51.78	18.08	100	2.3569 ± 0.0635
3	22.48 ± 0.7	23.19 ± 1.7	71.30	27.18	1.53	87.1	2.4479 ± 0.1483

Grupo 1: Sin Oclusión; Grupo 2: Con Oclusión; Grupo 3: Con oclusión y fármaco

NO
EXISTE
PAGINA

**NO
EXISTE
PAGINA**

característico de este grupo en el que se observa la marginación y espiralización de la cromatina nuclear (figura 5.4b).

El aspecto del tejido sometido a un proceso isquémico en presencia de propranolol se muestra en la figura 5.3c en éste es evidente el edema interfibrilar, hinchamiento mitocondrial. Aunque hay lisis de algunas miofibrillas existe una mayor conservación de la estructura miofibrilar. Cabe destacar que dentro de este grupo predominaron los núcleos con migración y espiralización de la cromatina nuclear. Figura 5.4b.

5.2.2 Resultados Cuantitativos

Tabla 5.3 Resultados del Estudio a nivel Ultraestructural

Grupo	Número de mitocondrias en 100µ	Vr mitocondrias	Grado de Daño (%)			Marginación de cromatina (%)	Longitud de sarcómero (µ)
			0	1	2		
1	25.00 ± 5.5	11.04 ± 3.9	99.29	00.71	00.00	0	2.4552 ± 0.2501
2	24.80 ± 3.3	25.44 ± 1.3	30.12	51.78	18.08	100	2.3569 ± 0.6835
3	22.48 ± 0.7	23.19 ± 1.7	71.30	27.18	1.53	87.1	2.4479 ± 0.1483

Grupo 1: Sinclusión; Grupo 2: con inclusión; Grupo 3: con difusión y láminas

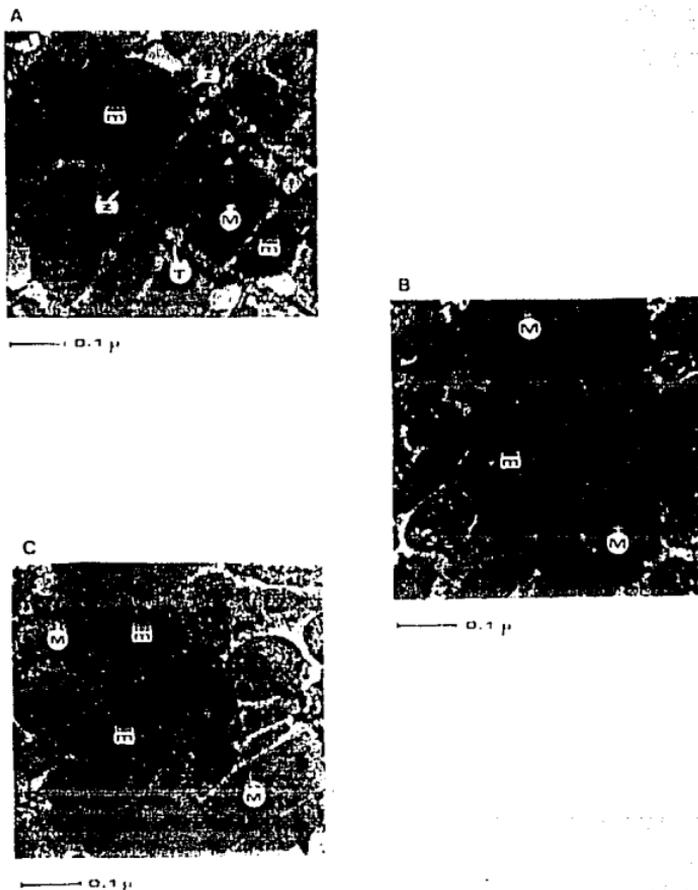


Figura 5.3 Micrografías de tinción de MÚSCULO CARIBBEÑO. A. Músculo cardíaco en reposo mostrando miofibrillas desiguales paralelas (M), sarcómeros intactos, mitocondrias remoladas (m), tubulos T (T) y línea Z (Z). B. Músculo cardíaco con daño químico mostrando desorganización de miofibrillas (M) y leos sarcoplasmial (sa) (grado 2). C. Músculo cardíaco con daño químico y tratado con propamido mostrando disposición irregular de miofibrillas (M) y mitocondrias hechas (m) (grado 1). Magnificaciones: A $\times 17,385$ B $\times 17,768$ y C $\times 17,769$.

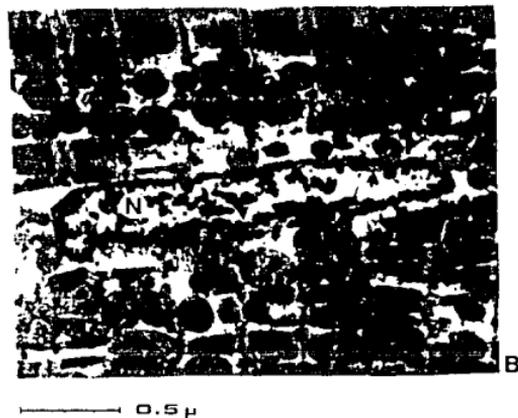
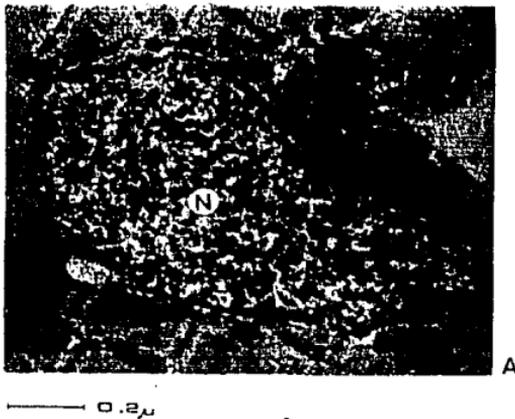


Figura 5.4 Micrografía electrónica de músculo cardíaco de rata NUCLEO A Núcleo normal de miocárdio no isquémico mostrando cromatina dispersa B Núcleo de miocárdio isquémico mostrando cumulos de cromatina y marginación de esta (flecha) Magnificaciones A x 9256 y B. x 4738



0.1 μ



0.1 μ



0.1 μ

Figura 5.5 Micrografía electrónica de músculo cardíaco de ratón. **MITOCONDRIOS**. A. Mitochondria normal de miocardio no expuesto a metachloroacetato; cristae compactas y matriz densa. B. Mitochondria de miocardio expuesto a metachloroacetato; hinchamiento y ruptura de la membrana interna (punta ?). C. Mitochondria de miocardio expuesto a metachloroacetato; hinchamiento, adelgazamiento de la matriz, y separación de cristae (punta ?). Magnificación: A, $\times 35,765$; B, $\times 35,537$; y C, $\times 29,614$.

Los resultados del análisis morfométrico (tabla 5.3) evidenciaron que el número de mitocondrias en 100 μ^2 no muestra diferencias significativas entre los tres lotes ($P < 0.05$). Figura 5.6.

La relación de volumen de las mitocondrias (V_r MIT) no presentó diferencia significativa entre el grupo con oclusión y sin fármaco (Grupo 2) y el grupo con oclusión y fármaco (Grupo 3) ($P < 0.05$), pero ambos mostraron diferencia significativa con el grupo sin oclusión (Grupo 1) ($P < 0.01$). (Tabla 5.3) (figura 5.7).

En el grupo 1, el 99% de las mitocondrias no presentaron daños en su estructura (grado de daño 0) (figura 5.5a), en el grupo 3 se encontraron 71.3% sin daño, a diferencia del grupo 2 que solamente presentó un 30% sin daño. El porcentaje de las mitocondrias que presentaron hinchamiento, pérdida de densidad de la matriz y separación de las crestas (grado de daño 1) (figura 5.5b) es de 0.71% en el grupo 1, 27.18% en el grupo 3 y de 51.78% en el grupo 2. En tanto que el porcentaje de las mitocondrias con lisis (grado de daño 2) (figura 5.5c) es de 18.08% para el grupo 2, de 1.52% para el grupo 3 y el grupo 1 no presenta mitocondrias con este grado de daño. (Figura 5.8)

En el grupo 2, se observó espiralización y marginación de la cromatina en la totalidad de los núcleos analizados, mientras que el grupo 3 presentó 87.1% de

NUMERO DE MITOCONDRIAS EN 100 μ^2

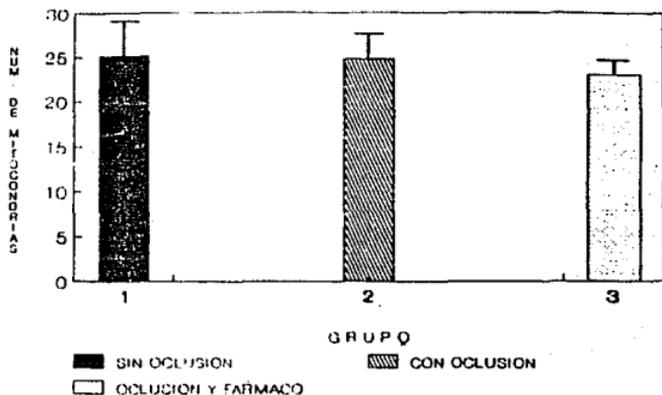


Figura 5.6 El grafico muestra el número de mitocondrias promedio en $100\mu^2$ + su desviación estandar para cada grupo observándose que no hay diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$).

RELACION DE VOLUMEN MITOCONDRIAL (%)

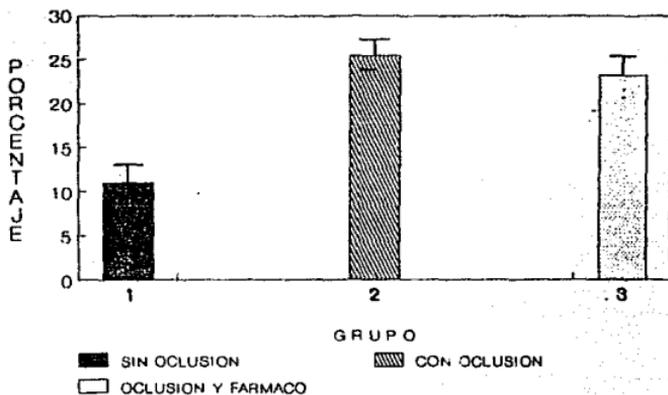


Figura 5.7 El gráfico muestra la relación de volumen mitocondrial promedio + su desviación estándar, para cada grupo, observándose que para los grupos 2 y 3 no hay diferencia significativa; pero ambos muestran diferencia significativa con respecto al grupo 1 ($p < 0.05$).

GRADO DE DAÑO MITOCONDRIAL (%)

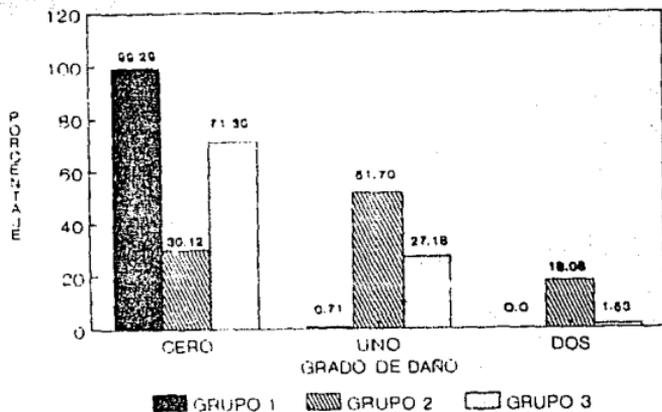


Figura 5.8 El gráfico muestra el porcentaje de grado de daño mitocondrial promedio para cada grupo. Se observa que el grupo 1 presenta mayor porcentaje de mitocondrias con estructura normal (grado 0), el grupo 2 presenta mayor porcentaje de mitocondrias con alteraciones en su estructura (grado 1), además de presentar el mayor porcentaje de mitocondrias con lisis (grado 2) entre los tres grupo y en el grupo 3 la mayoría de las mitocondrias presenta una estructura normal.

núcleos con espinización y marginación, a diferencia del sano, que no tiene núcleos con las características anteriores. (Tabla 5.3)

En cuanto a la longitud de los sarcómeros, no se observó diferencia significativa entre los grupos sin oclusión ($2.4552\mu + 0.2501$); con oclusión y sin fármaco ($2.3569\mu + 0.6635$) y con oclusión y fármaco ($2.4479\mu + 0.1463$). Con un nivel de significancia menor a 0.05 ($p < 0.05$). Cabe mencionar que para la medición de la longitud de los sarcómeros únicamente se tomaron en cuenta aquellos que se encontraban relajados. (Figura 5.9).

LONGITUD DE LOS SARCOMEROS EN μ

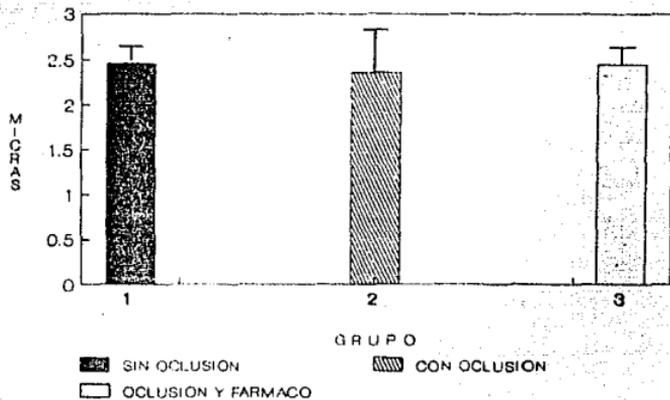


Figura 5.9 El gráfico muestra la longitud promedio de los sarcómeros + su desviación estándar, observándose que no hay diferencia significativa entre ellos ($p < 0.05$)

6. DISCUSSION

Los cambios morfológicos que se producen como consecuencia de un proceso isquémico no pueden ser directamente evaluados en el hombre por lo que se han diseñado modelos experimentales que involucran el uso de diversas especies animales. Si bien la extrapolación de los resultados obtenidos a partir de otras especies animales al hombre es discutible. Estos modelos, sí permiten el control de variables que en el hombre serían difícilmente controlables como la edad, el estado de salud, las características genéticas, etc. y además permiten el uso de técnicas que no podrían aplicarse en el hombre.

En este trabajo se utilizó el modelo propuesto por Sayle y colaboradores, para la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda, ésto provocó alteraciones estructurales importantes en un periodo de 4 horas postoclusión.

La metodología empleada en este estudio permitió la evaluación de los efectos del propranolol sobre el tejido cardiaco obteniéndose resultados congruentes con otros estudios y con los objetivos planteados al inicio de este trabajo.

Para evaluar los efectos del propranolol sobre el tejido cardiaco se realizaron dos análisis, el primero a nivel de microscopía óptica y el segundo a nivel de microscopía electrónica.

El miocárdio sometido a un estado isquémico sufre alteraciones metabólicas como son : agotamiento de sus reservas energéticas, caída de la actividad enzimática del ciclo de Krebs, pérdida de potasio intracelular, aumento de la síntesis de triglicéridos (Micheli;1971), por mencionar sólo algunos de los procesos que se ven alterados por la isquemia , aunado a ésto, también se producen numerosos cambios estructurales entre los que podemos mencionar los siguientes: disminución en el número de núcleos, la presencia de células que muestran necrosis coagulativa, pérdida de estrías, áreas con infiltración de células inflamatorias, hemorragia y congestión (Fishbein;1978). La Tinción Tricrómica de Masson empleada en este estudio mostró áreas de células muertas caracterizadas por presentar necrosis coagulativa y áreas de células sanas lo que es congruente con los reportes existentes en la literatura en los que se manifiesta el hecho de que durante las primeras horas de iniciado el infarto agudo en el hombre, la dinámica del proceso necrótico afecta en varios grados a las células miocárdicas dentro de la zona isquémica , desencadenando un infarto no homogéneo (Edwards, 1969). Cox y col. sostienen que durante el período inicial la población de células miocárdicas normales dañadas y necróticas coexiste en la misma región. (Cox et. al, 1968). A partir de los resultados obtenidos en este trabajo se pudo observar que los grupos control con oclusión presentan zonas mas extensas con fibras necróticas , ya que en éstas el daño se extendió hasta el ventrículo derecho, mientras que en las ratas con oclusión y tratamiento el daño no logra abarcar hasta el ventrículo derecho con lo que se pone de manifiesto el efecto protector del fármaco.

Como consecuencia de las lesiones que causó la isquemia, provocada por la oclusión de la arteria coronaria se inicia un proceso reparador que intenta regenerar y reestablecer la masa muscular y la función respectivamente . En un periodo de 4 horas posteriores a la oclusión, únicamente fue posible observar el comienzo de dicho proceso ya que éste es lento y puede extenderse hasta aproximadamente la séptima semana después de la oclusión, para lograr una cicatrización total del tejido dañado . El proceso reparador es la respuesta del tejido para recuperar las funciones e involucra : la hipertrofia de miocitos no afectados e hipertrofia e hiperplasia de fibroblastos intersticiales y células endoteliales.

En el periodo de cuatro horas postoclusión, utilizando la tinción Tricrómica de Masson se observó una proliferación de fibroblastos mucho más marcada en el grupo control con oclusión a diferencia del grupo tratado, debiéndose a la menor extensión del tejido dañado.

Una de las lesiones que se producen durante los primeros minutos de isquemia es el fenómeno de ondulación de las fibras musculares en la zona del borde del infarto, lo que algunos autores suponen es consecuencia de las contracciones sistólicas de las fibras sanas que están situadas inmediatamente adyacentes a las fibras muertas y que por lo tanto han perdido su capacidad contráctil . Aunque las observaciones realizadas en tejido de rata sin oclusión nos muestran cierta ondulación de las fibras, en las ratas sujetas a oclusión esta ondulación se encuentra presente pero de una manera más severa.

El proceso de necrosis que se desencadena en el tejido dañado trae como consecuencia una respuesta inflamatoria, que se caracteriza por una dilatación de los vasos sanguíneos, así como un aumento en la permeabilidad vascular que permite la extravasación del plasma y por último provoca la diapedesis de células inflamatorias como son los linfocitos, los monocitos y los polimorfonucleares (PMN).

El estudio publicado por Toledo-Pereyra (1991), reporta que en las primeras horas de creada esta respuesta, se observan predominantemente neutrófilos que se adhieren al endotelio vascular, para migrar luego hacia los sitios lesionados en fases posteriores y después de que muchos neutrófilos han sido destruidos, predominan los monocitos y los macrófagos, la presencia de estas células en los sitios de inflamación representan un factor crítico en la patogenia del infarto miocárdico. En general estas alteraciones fueron mas severas en el grupo control con oclusión, en comparación con el grupo tratado en donde la evidencia de necrosis es menor.

A partir de los resultados obtenidos en el estudio a nivel de microscopía electrónica se pueden inferir algunos aspectos relacionados con el efecto que ejerce el propranolol sobre las estructuras celulares.

Los resultados obtenidos a partir del grupo control con oclusión, ponen de manifiesto que uno de los organelos que recibe en mayor medida el efecto que

produce la falta de oxígeno es la mitocondria, ya que un gran porcentaje de mitocondrias (18.08%) presentó cambios estructurales muy marcados que incluso llegan a la lisis mitocondrial. Por otra parte, el grupo que recibió el fármaco presentó una marcada disminución en el porcentaje (1.53%) de mitocondrias dañadas. El mecanismo por el que el propranolol protege la estructura mitocondrial es desconocido. Tal vez pueda estar relacionado con la capacidad del fármaco para reducir la demanda de oxígeno. Este posible mecanismo se apoya en el hecho de que si las necesidades de oxígeno de las células miocárdicas se ven reducidas durante la isquemia por el efecto del fármaco, la mitocondria (el mayor Proveedor de ATP para la célula), puede exhibir anomalías morfológicas menos severas. (Kloner et al 1977). En un estudio realizado por Obeld y colaboradores en 1976 encuentra que el propranolol preseva las reservas de ATP en el miocardio isquémico lo que apoya la idea de que la conservación mitocondrial es posible. Por otra parte, se ha demostrado que el propranolol disminuye la actividad mitocondrial in vitro por medio de la inhibición de la forma reducida de la nicotín adenin dinucleotido (NADH) (Sakurada et al, 1972), aunque no se ha establecido si el efecto de preservación de la estructura mitocondrial obedece a este mecanismo en particular.

Otro de los aspectos que se evaluó en la estructura mitocondrial fue la relación de volumen, es decir, el volumen que ocupa la mitocondria con respecto al resto de la célula como una medida del hinchamiento que sufre la mitocondria en respuesta al proceso isquémico. El hinchamiento mitocondrial es reportado por algunos autores como la respuesta inicial al daño isquémico ya que ocurre durante los primeros

minutos de iniciado el proceso (Spinale y col 1989) (Greve y col 1990). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran un hinchamiento mitocondrial severo tanto en el grupo con oclusión como en el grupo al que se le administró el fármaco. Es posible suponer que el fármaco no posee un efecto muy marcado sobre este parámetro en particular.

Finalmente, se evaluó el número de mitocondrias en $100\mu^2$ no observándose cambios significativos en los tres lotes. Lo que suponemos se puede deber a que en este periodo de tiempo, los cambios en el número de mitocondrias no son evidentes. Desafortunadamente, en la bibliografía no se encuentran datos que permitan considerar esta suposición y los alcances de este trabajo no permiten comprobar lo antes mencionado.

La gran mayoría de las miofibrillas observadas se encuentran en un estado de relajación uniforme lo que corrobora las observaciones hechas por Greve y col. en 1990. Existen diversas teorías que tratan de explicar esta respuesta al daño isquémico. Una de ellas, propuestas sostiene que la reducción en la contractilidad se debe a la disminución de los componentes fosfato de alta energía presente en la célula. La segunda se basa en que la isquemia reduce la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico interfiriendo de esta manera en la interacción entre el calcio y las proteínas contractiles necesarias para que ocurra la contracción (Chesnia y col. 1975). La tercera teoría sostiene que la reducción en la contractilidad, secundaria a la isquemia

es provocada por alteraciones estructurales en las proteínas contráctiles, ninguna de las teorías antes mencionadas ha sido aceptada del todo.

Cabe señalar, que en algunas muestras se observan zonas con signos de contractura isquémica en los márgenes de la zona isquémica. El hallazgo de algunas miofibrillas hipercontraídas (con longitud menor a 1.5μ) (Vander y col, 1986) en los casos de oclusión permanente, sugiere la presencia de un leve reflujo como resultado de la circulación colateral. (Fishbein, 1978). Otra explicación alternativa a este fenómeno sostiene que la hipercontractura ocurre en áreas en las cuales se ha disminuido pero no se ha eliminado el flujo colateral, el cual persiste después de la oclusión coronaria. (Bouchardy 1984).

Otro hallazgo que es importante comentar aunque es difícil de evaluar cuantitativamente con los medios disponibles, es la presencia de edema intermiofibrilar en los grupos sujetos a una oclusión, éste se debe principalmente al cambio en la oxidación de los ácidos grasos hacia la glicólisis porque todos los pasos en el uso de lípidos especialmente los de la beta-oxidación se encuentran deprimidos (Liedtke y col 1984, 1988). Como la glicólisis es incapaz de cumplir con las demandas de fosfatos de alta energía (Braasch y col 1968, Reimer y col, 1983) y un número de cambios metabólicos e iónicos conducen a incrementar la osmolaridad intracelular, lo que explica el edema celular (Wood y col. 1977; Kishimoto y col. 1983; Steenbergen y col. 1987; Jennings y col. 1985). Dependiendo de la presión osmótica dentro de varios organelos el hinchamiento puede ocurrir en diferentes grados.

Otra evidencia de daño celular severo es la espiralización y marginación de la cromatina (Spinale, 1989), los resultados obtenidos en este estudio mostraron un 100% de núcleos que presentan esta característica dentro del grupo con oclusión pudiendo observarse el efecto benéfico del fármaco sobre este parámetro ya que el porcentaje de núcleos que presentaban espiralización y marginación de la cromatina fue tan solo del 87% para este grupo.

La membrana celular es otra de las estructuras celulares que se ven afectados por el proceso isquémico. Desafortunadamente, la interpretación del daño sarcolémico como producto del proceso isquémico puede verse sujeto a confusiones ya que se ha observado que el glutaraldehído utilizado como fijador en el proceso de microscopia electrónica puede afectar la membrana sarcolémica ya que extrae los componentes lipídicos de esta, especialmente cuando el contenido de iones divalentes es bajo. (Greve y col. 1990). Algunas muestras de animales sin oclusión presentaron ligeros focos de alteraciones en la membrana por lo que en este trabajo se prefirió no considerar este parámetro ya que se podría prestar a interpretaciones erróneas.

7. CONCLUSION

CONCLUSIONES

1. El modelo de infarto por ligadura coronaria experimental nos permitió provocar daño isquémico a las 4 horas postoclusión.
2. Las técnicas de microscopía óptica y electrónica permitieron alcanzar el objetivo general de este proyecto, que fue evaluar el efecto del Propranolol sobre los cambios morfológicos provocados por el daño isquémico.
3. El estudio a nivel estructural permitió localizar la zona de infarto, su extensión y los cambios que ocurren en esta así como la capacidad del propranolol para prevenir la extensión del tejido lesionado.
4. A nivel ultraestructural se determinó que la mitocondria es el organelo que presenta mayor evidencia de daño en un período de 4 horas postoclusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda.
5. La conservación de la estructura mitocondrial puede ser un factor que evita el daño irreversible en la célula miocárdica.

- 6. Se confirmó que el propranolol tiene un efecto protector sobre el corazón ya que previene la extensión del tejido lesionado además de la conservación de la estructura mitocondrial.**

8.BIBLIOGRAFIA

1.American Heart Association, Heart Facts, American Heart Association, Dallas, 1985, pp. 1-25.

2.Anderson Peter G, Sanford B, Stanley; Transmural progression of morphologic changes during ischemic contracture and reperfusion in the normal and hypertrophied rat heart; American Journal of Pathologists; 1987: 129:152-167 .

3. Antman E M, Stone P H, Muller J E, et al; Channel blockin agents in the treatment of cardiovascular disorders: Part II. Hemodynamic effects and clinical applications; Ann Intern Med 1980; 93: 886-904.

4.Aters D and Leaperance J; Regression of coronary atherosclerosis, an achievable goal. Review of results from recent clinical trials; Am. J. Med 1991; 91 (suppl 13) 1S-10S.

5.Awan N A, Amsterdam E P, Vera Z, et al; Reduction of ischemic injury by sublingual nitroglycerin in patients with acute myocardial infarction; Circulation 1976; 54:761-765.

6.Black J W, Stephenson J S; Pharmacology of a new adrenergic β - receptor blocking compound (nethalide); Lancet 311-314.

7.Boden W E, Liang C S, Apstein C S, Hood W B; Experimental myocardial infarction. XVI. The detection of inotropic contractile reserve with post extrasystolic potentiation in acutely ischemic canine myocardium. Am J Cardiol 1978; 41: 523-30.

8.Braasch W, Gudbjarnason S, Puri P S, Ravens K G, Bing R J; Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anesthetized dogs. Circ. Res 1968, 23:429-438

9. Bristol J A; Cardiovascular Drugs . Ed John Willey & sons . United States of America 1986 . pp 419-437.
10. Campbell C A, Przklek K, Kloner R A. Infarct size reduction: A review of the clinical trials. J Clin Pharmacol 1986; 26: 317-329.
11. Cavazos- Ortega N, Del Rio-Zolezzi A, Izazola- Licea A, et al. Años de vida potencial perdidos: Su utilidad en el analisis de la mortalidad en México. Salud Pública Mex 1989; 31:610-624.
12. Connor W E, Bristow J D. Coronary Heart Disease, Prevention, Complications and treatment, Lippincot, Philadelphia, 1985.
13. Cox J L, Mc Laughlin V W, Flowers N C, et al. The ischemic zone surrounding acute myocardial infarction. Its morphology as detected by dehydrogenase staining. Am Heart J 1968; 76:650-659.
14. Cheenias JM, Combueuf E, Sauviat M P, Vassas J M. Sensitivity to H Li and Mg ions of the slow inward sodium current in frog atrial fibers J Moll Cell Cardiol 1975; 249:469-95.
15. Duncan W A, Black J W, Shanks R G ; Comparison of some properties of pronethalol and propranolol J Pharmacology 25:577-591.
16. Edwards J E What is myocardial infarction?; Circulation 1969; 40: suppl IV: IV-5-IV-11,.
17. Eilla S G, Henschke C I, Sandor T, et al ; Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion; J Am Coll Cardiol 1983; 1:1047-1055

- 18. Evans G H, Wikinson G R, Shand D G et al :** The disposition of propranolol IV. A dominant role for tissue uptake in the dose-dependent extraction of propranolol by the perfused rat liver. *J. Pharmac exp. ther.* 1973; 186:447-454.
- 19. Fishbein M D, Mc Lean D, Maroko P R;** Experimental myocardial infarction in the rat; *Am J Path* 1978; 90:57-70
- 20. Fitzgerald J D, O' Donnell S R;** Pharmacology of 4-hydroxypropranolol, a metabolite of propranolol; *Br J Pharmac* 1971; 43:222-235
- 21. Frances W D and Nan Anderson;** *Electron Microscopy in Diagnostic. A practical guide and atlas* Ed. Cambridge University Press U. S. A 1987 pp 35.
- 22. Ganong W F;** *Fisiología Médica.* Ed. El Manual Moderno, México D.F. pp 511-517.
- 23. Gaviño G, Juárez J C, Figueroa H H;** *Técnicas Biológicas Selectas de Laboratorio y de Campo,* Ed. Limusa , México 1984.
- 24. Gold H K, Leinbach R C, Maroko P R;** Propranolol -Induced reduction of signs of ischemic injury during acute myocardial infarction; *Am J Cardiol* 1976; 38: 689-95.
- 25. Grayson G, Geary M B, et al** Failure of pretreatment with propranolol to reduce the zone of myocardial infarction after 2 hours of coronary occlusion in the primate heart; *Am J Cardiol*; 1983; 52: 615-20
- 26. Greve G, Rolevaln S, Svendby K;** Early morphologic changes in cat heart muscle cells after acute coronary artery occlusion *Am. J Path* 1990;136:273-282
- 27. Holguín J A , Chavez Cossío E, Sierra M, Briones R;** Los movimientos del ion calcio en las estructuras celulares del corazón, *Arch Inst Cardiol Méx* 1980; 50:119-127

- 28. Jennings R B , Ganote C E, Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury; Circ Res; 1976; 38: 801-911**
- 29. Jhons TNP, Olson B J, Experimental myocardial infarction . A method of coronary occlusion in small animals, Ann Surg 1954;140(5):675-682**
- 30. Kishimoto A, Kajikawa N, Shiota M, Niohizuka Y: Proteolytic activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by calcium-dependent neutral protease J. Biol Chem 1983, 258:1156-1164.**
- 31. Kloner R A, Braunwald E; Observations on experimental myocardial ischaemia; Car Res 1980;14:371-395**
- 32. Kloner R A, Fishbein M C , Braunwald E; Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia; Am J Car; 1977; 41:880-886**
- 33. Levy R I , Moskowitz J. Science 1982 pp 217, 121**
- 34. Liedtke A J, Orle J E, Toggart E J: Carbohydrate and lipid metabolism in ischemia. Edited by Stone H L, Weglicki W B. Pathobiology of cardiovascular injury. From the proceedings of the meeting of the American Section of the International Society for Heart Reseach (ISHR) Oklahoma City, Oklahoma Sept. 13-15, 1984, Boston, Martinus Nijhoff Publishing, 1985, pp.190-201**
- 35. Liedtke A J: Lipid burden in ischemic myocardium. J Moll Cell Cardiol 1988, 2 (Suppl 1):65-74.**
- 36. Maroko P P, Kjekshus J K, Sobel B E, Watanabe T et al; Factors influencing infarct size following experimental coronary occlusion. Circulation ; 197143:67-82**

- 37. Miura N, Thomas R, Ganz W, et al;** The effect of delay in propranolol administration on reduction of myocardial infarct size after experimental coronary occlusion in dogs; *Circulation* 1979; 59:1148-57.
- 38. Mueller H S, Ayres S M ;** Propranolol decreases sympathetic nervous activity reflected by plasma catecholamines during evolution of myocardial infarction in man. *J Clin Invest* ; 1980; 65:338-346.
- 39. Nayler W G;** Regulation of myocardial function. A subcellular phenomenon, *J Moll Cell Cardiol* 1973; 5:213-219.
- 40. Norris R M;** Beta blockers and infarct size; *J Moll Cell Cardiol* 1976; 18:99-103.
- 41. Nunn R E;** *Microscopía Electrónica. Microtomía, tinción y técnicas especializadas;* Ed. Manual Moderno; México 1976.
- 42. Nunn R E;** *Microscopía Electrónica. Preparación de muestras biológicas;* Ed Manual Moderno, México 1975.
- 43. Obaid A, Spear R, Mookhey S et al;** The effects of propranolol on myocardial energy stores during myocardial ischemia in dogs (abstr); *Circulation* 54:Suppl II:115-159, 1976.
- 44. Ople L H, Bruynell K, Owen P.** Effects of glucose-insulin and potassium infusion on tissue metabolic changes within first hour of myocardial infarction in the baboon. *Circulation* 1975;52:49-57.
- 45. Page E, Mc Allister L P,** Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells ; *Am J Cardiology* 1973; 31

- 46. Pauly's E.** Histology and Human microanatomy. Ed John Wiley and Sons. Fifth Edition, Italy 1987.
- 47. Pitt B, Weiss J L, Schulze R A, Taylor D R, Kennedy H L, Caralis D.** Reduction of myocardial infarct extension in man by propranolol. *Circulation* 1976;54:(Suppl II), II-29.
- 48. Powell J W, Wittenberg J, Miller S W, Maturi R A, Dinsmore R E,** Assessment of drug intervention on the ischaemic myocardium; serial imaging and measurement with computerised tomography. *Am J Cardiol* 1979;44:46-52.
- 49. Reimer K A, Jennings R B:** The Wavefront phenomenon of myocardial ischemic cell death. *Lab Invest* 1979, 40:633-644
- 50. Robbins S L, Cotran R S;** Patología estructural y funcional; Ed Interamericana, 3era Ed.. México 1987, Cap 13.
- 51. Robert H, Anderson A E, Becker,** Atlas fotográfico de Anatomía cardiaca; Ediciones Doyma; Barcelona, España 1981.
- 52. Sakurada A, Voss D O, Branda O D, et al ;** Effects of propranolol on heart muscle mitochondria, *Biochem Pharmacol*, 1972, 21:535-540.
- 53. Shand D G, Nuckolls E M, Oates J A.** Plasma propranolol levels in adults with observations in four children. *Clin Phar Ther* 1970;11:112-120.
- 54. Simons L A.** Interactions of lipids and lipoproteins with coronary artery disease mortality in 19 countries. *Am J Cardiol*; 1986; 57:5-10,
- 55. Sodeman W A, Sodeman T M;** Ed. Interamericana 6ta. Ed. México 1984, Cap 8.

56. Spinale F G, Bradley A S, Crawford F A. Demonstration of early ischemic injury in porcine right ventricular myocardium. *Am J Path* 1989; 134:693-704.

57. Steenberger C, Murphy E, Levy L, London R E. Elevation of cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. *Circ. Res* 1987; 60: 700-707.

58. Vander Holde R S, Angelo J P, Altschuld R A, Ganote C E. Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Path*; 1986; 125:55-68.

59. Vokonas P S, Pirzada F A, Hood W B. Experimental myocardial infarction: XII. Dynamic changes in segmental mechanical behaviour of infarcted and non infarcted myocardium. *Am J Cardiol* 1976;37:853-859.

60. Walle T, Gaffney T E. Propranolol metabolism in man and dog mas spectrometric identification of six new metabolites. *J Pharmac Exp Ther* 1972, 182:83-92.

61. Watanabe T, Shintani F, Fu L, Fujl J, Watanabe H, Kato K; Influence of inotropic alteration on the severity of myocardial ischemia after experimental coronary occlusion

62. Wood J M, Bush B, Pitts BJR, Schwartz A: Inhibition of bovine heart Na⁺ K⁺ ATP ase by palmitoyl- Co A. *Biochem Biphys Res Comm* 1977, 74: 677-684.

63. Yusuf F, Sleight P, Held P, Mc Mahon S. Routine medical management of acute myocardial infarction: lessons from overviews of recent randomized controlled trials. *Circulation* 1990; 82:II-117-II-134.