



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**DESCRIPCIÓN DE CUATRO MODELOS ÚTILES EN INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR QUE
PUEDEN SER REALIZADOS EN RATA Y RATÓN (INVESTIGACIÓN DOCUMENTAL)**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICO VETERINARIO ZOOTECNISTA**

**PRESENTA:
Patricio Luis Hernández Malpica**

**ASESOR
Dr. Gustavo Guevara Balcázar**

**CO-ASESOR
Dr. Carlos Ignacio Soto Zárate**

Cuautitlán Izcalli, Estado de México, 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio 4 “Morfología Veterinaria y Biología Celular” de la Unidad de Investigación Multidisciplinaria de la FES Cuautitlán UNAM, con el apoyo del proyecto:

“Morfología Veterinaria y Biología Celular”
(Proyecto PIAPI 1602)

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Abreviaturas.....	2
Índice de figuras.....	3
Introducción.....	4
Objetivos.....	14
Metodología.....	15
Resultados.....	16
1.-Modelo de infarto cerebral con reperfusión.....	16
2.-Modelo de infarto en miocardio con reperfusión.....	23
3.-Modelo de nefrectomía en 5/6 para insuficiencia cardiaca.	29
4.-Modelo de hipertensión inducido por el método de Page...	32
Análisis y Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Bibliografía.....	42

RESUMEN

Los padecimientos de origen cardiovascular en la actualidad han resultado ser la principal causa de morbilidad, discapacidad y mortalidad a nivel mundial. El infarto cerebral, infarto al miocardio, insuficiencia renal y la hipertensión son parte de aquellas condiciones que ponen en riesgo la vida de un porcentaje importante de la población mundial. Las funciones orgánicas que llevan a cabo, por una parte el cerebro que es sin duda quien coordina, junto con sus anexos, todo lo que es un ser viviente y que lo conecta con el medio ambiente. El corazón, que es el órgano responsable de hacer llegar el oxígeno y demás nutrientes a todo el organismo, y adicionalmente, a través de la sangre y linfa, se transportan los desechos metabólicos hasta los riñones en donde serán retirados de la circulación y eliminados en la micción, hacen que los modelos de estudio dirigidos a estos órganos resulten de suma importancia. El investigar los padecimientos cardiovasculares mediante el uso de animales como modelos, resulta ser de suma importancia, ya que ha permitido observaciones que en pacientes humanos resultarían prácticamente imposibles. Además, en consecuencia, han permitido la experimentación de posibles medidas terapéuticas encaminadas a brindar una oportunidad para aquellos pacientes afectados. De las especies más importantes como modelos biológicos son los roedores (rata y ratón), ya que brindan una serie de ventajas que otras especies difícilmente podrían, como es el ciclo corto de vida y la posibilidad de mantenerlos en gran número en espacios reducidos, por lo que son usados con mucha frecuencia. Este trabajo tiene como objetivo describir las técnicas utilizadas para inducir modelos animales en rata y ratón de las principales afecciones cardiovasculares del humano. La metodología consistió en realizar una búsqueda exhaustiva en las principales bases de datos hemerográficas en la que se abarcó; artículos, resúmenes, libros especializados y notas. Una fuente importante de información fueron los protocolos de investigación del Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional donde además se obtuvieron las fotografías. Como resultado, se realizó la descripción de cuatro modelos de enfermedades cardiovasculares que se pueden desarrollar en rata y ratón:

- a) Modelo de infarto cerebral con reperfusión.
- b) Modelo de infarto en miocardio con reperfusión.
- c) Modelo de nefrectomía en 5/6 para insuficiencia cardiaca.
- d) Modelo de hipertensión inducido por el método de Page.

Esta revisión busca ser una fuente de información que permita difundir el conocimiento existente en esta área y despertar el interés del MVZ por desarrollarse en este campo profesional.

ABREVIATURAS

INEGI	Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
SINAIS	Sistema Nacional de Información.
NOM	Norma Oficial Mexicana.
SNC	Sistema Nervioso Central.
SNP	Sistema Nervioso Periférico.
AIT	Accidentes Isquémicos Transitorios.
SHR	Rata Espontáneamente Hipertensa.
ACM	Arteria Cerebral Media.
ACC	Arteria Carótida Común.
IAM	Infarto al Miocardio.
DM2	Diabetes Mellitus Tipo 2.
NF	Nefrona.
LEC	Líquido Extra Celular.
IRC	Insuficiencia Renal Crónica.
IP	Intraperitoneal.
ACI	Arteria Carótida Interna.
ACE	Arteria Carótida Externa.
TTC	Cloruro de Trifeniltetrazolio.
ACDAI	Arteria Coronaria Descendente Anterior Izquierda.
SC	Subcutáneo.
IM	Intramuscular.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURAS	Página
Figura 1. Esquema de la irrigación en cerebro y sujeción de los roedores para la aplicación por vía intraperitoneal	17
Figura 2. Preparación del roedor para la cirugía	18
Figura 3. Incisión sobre línea mediana cervical ventral	19
Figura 4. Colocación de la sutura en la arteria carótida común	21
Figura 5. Instrumento de corte y rodajas de cerebro	22
Figura 6. Cirugía y esquema de corazón	24
Figura 7. Proceso quirúrgico	25
Figura 8. Procesamiento del corazón infartado	26
Figura 9. Bloque de sección y cortes de corazón	28
Figura 10. Preparación del roedor para cirugía y exposición del riñón	30
Figura 11. Líneas de corte del riñón y terminación de la cirugía	31
Figura 12. Preparación e inicio de la cirugía	33
Figura 13. Colocación de la bolsa de celofán	34
Figura 14. Procedimientos finales en la técnica de Page	35
Figura 15. Equipo y procedimiento para la toma de presión arterial	36

INTRODUCCIÓN

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de muerte a nivel mundial, contribuyendo al 29% de la mortalidad total, mientras que las proyecciones para el año 2020 indican que serán el origen de 25 millones de muertes al año y que la cardiopatía isquémica se constituirá como la principal causa de morbilidad, discapacidad y mortalidad en todo el mundo (59). En México desde hace más de 40 años los padecimientos cardiovasculares se han establecido dentro de las primeras causas de muerte en mayores de 20 años. El INEGI 2008 reportó un total de 92,672 muertes por causas cardiovasculares, esto es 17% del total nacional y, de estas, 64% fueron secundarias a cardiopatía isquémica. Según el Sistema Nacional de Información en Salud (SINAIS) reporta a las enfermedades isquémicas del corazón como la segunda causa de muerte. La morbilidad ha aumentado progresivamente de un 20.3 a un 55.8 por cada 100,000 habitantes en casi 50 años. De aquí la importancia del uso de modelos animales para el estudio de estos padecimientos cardiovasculares (hipertensión arterial, obstrucción de vasos sanguíneos por trombos o émbolos, infarto al miocardio, entre otras) que resultan de suma importancia en la investigación, pues gracias a ellos, se han comprendido y descubierto una serie de aspectos fisiológicos, patológicos y farmacológicos en diversos sistemas y órganos. En el caso concreto de cerebro, corazón y riñón, son un ejemplo, que han llevado, si no a la cura, sí al tratamiento y/o entendimiento de aquellos pacientes que desafortunadamente sufren de tales condiciones.

Las funciones orgánicas que llevan a cabo, por una parte, el cerebro que es sin duda quien coordina, junto con sus anexos, todo lo que es un ser viviente y que lo conecta con el medio ambiente. El corazón, que es el órgano responsable de hacer llegar el oxígeno y demás nutrientes a todo el organismo, y adicionalmente, a través de la sangre y linfa, se transportan los desechos metabólicos hasta los riñones en donde serán retirados de la

circulación y eliminados en la micción, hacen que los modelos de estudio dirigidos a estos órganos resulten de suma importancia (2, 15, 20).

Las técnicas implementadas para desarrollar modelos animales, ha tenido su historia. Así mismo los nuevos conocimientos han servido para generar modelos más representativos de los padecimientos que se pretende estudiar.

De manera profesional, se comenzaron a generar reportes de estudios, desde 1866 por Elías Cyon, quien desarrolló la base de un corazón aislado y perfundido de rana, y que más tarde Oscar Langendorff (1897) hiciera una preparación en un corazón de mamífero (46), con el que haría una serie de descubrimientos importantes sobre la fisiología de este órgano y que serían parte de la información necesaria para, posteriormente, llegar a entender la participación del corazón en patologías relacionadas con otros órganos.

En cuanto a modelos de estudio en riñón, la primera nefrectomía quirúrgica parcial en un animal fue realizada por Theodore Tuffer en un perro al final del siglo XIX, pero en ésta no se observaron cambios en la eliminación de orina o urea a pesar de la pérdida de masa renal (9). Desde entonces el método se ha perfeccionado hasta lograr inducir signos de insuficiencia renal y la técnica se ha aplicado a otras especies. En 1939, el Dr. Irvine Page describe un modelo de hipertensión causado por una perinefritis inducida por la envoltura de los riñones en celofán (54).

Ya en el año de 1906, Santiago Ramón y Cajal y Camilo Golgi, hicieron contribuciones importantes con la descripción e interpretación de la estructura y funciones cerebrospinales (15). Aunado a esto, otras observaciones realizadas por diversos investigadores, han aportado conocimientos para establecer los principios básicos que brindan una mejor comprensión de aquellos aspectos que se pretende estudiar al momento de llevar a cabo un modelo biológico.

Como parte importante de todo este proceso, resulta fundamental la elección de la especie animal sobre la cual se pretende trabajar el modelo de estudio. Y es que, en la actualidad, de las especies más utilizadas por su relativa facilidad para criar, alojar y mantener son ratas y ratones (9). Estos tienen ventajas y desventajas, igual que cualquier otra especie, pero el uso tan intenso que han tenido en la investigación está perfectamente documentado lo que resulta favorable al momento de utilizarlos. De esta forma, la información del procedimiento para llevar a cabo cada uno de los modelos cardiovasculares, se encuentra disponible en la literatura de investigación por lo que en este trabajo se abordan cuatro modelos:

- a) Modelo de infarto cerebral con reperfusión.
- b) Modelo de infarto en miocardio con reperfusión.
- c) Modelo de nefrectomía en 5/6 para insuficiencia cardíaca.
- d) Modelo de hipertensión inducido por el método de Page.

Los procedimientos realizados en los animales cumplieron con los requerimientos que en la materia determinan la norma oficial mexicana (NOM-062-ZOO-1999; Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio) y la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) del Instituto Politécnico Nacional (IPN).

ANTECEDENTES

Sistema Nervioso Central

El sistema nervioso central (SNC) se encuentra protegido por el cráneo y la médula espinal e internamente, por tres capas de tejido conectivo denominadas meninges, las cuales están conformadas por la piamadre (la más cercana a las estructuras del SNC), la aracnoides y la duramadre, éstas van a proteger a los vasos sanguíneos y van a contener el líquido cerebroespinal, esencial para el metabolismo. Dentro del encéfalo se distinguen tres partes principales; cerebro, cerebelo y tallo encefálico. Por su parte la médula espinal se divide en cinco porciones; cervical, torácica, lumbar, sacra y caudal (15, 20).

La unidad anatómica y funcional es la neurona, la cual se especializa en la integración y transmisión de los impulsos. Presentan diferentes formas y tamaños, pero en común tienen dos tipos de proyecciones básicas; las dendritas, que se extienden alejándose del cuerpo celular, arborizan mucho y sirven para realizar conexiones (sinapsis) con otras neuronas y, el segundo, es un axón largo, que sirve para realizar conexión con otras estructuras del cuerpo (órganos) (2, 53).

Otra estirpe celular dentro del tejido del SNC, son las células denominadas gliales (neuroglia), éstas son un componente importante ya que realizan diversas funciones esenciales; primeramente sirven de soporte mecánico a las neuronas, producen la vaina de mielina, y realizan la captación rápida y, por tanto, la inactivación rápida de neurotransmisores químicos liberados por las neuronas (2, 52, 53), también intervienen en la formación de tejido cicatricial después de una lesión cerebral, en la eliminación de residuos de tejido local después de la muerte celular; entre otras funciones (2, 53).

Las diferentes partes que conforman al organismo, envían información de los ambientes interno y externo hasta alcanzar al SNC a través de diversos receptores sensoriales lo que origina cambios energéticos que hacen posible la adaptación del individuo. A través de múltiples conexiones del tejido neuronal más los mediadores químicos (Dopamina, Glutamato, Aspartato, por mencionar algunos), el encéfalo y la médula espinal van a regular el funcionamiento del resto de los órganos que constituyen a un ser viviente, gracias a la red de comunicación que mantiene conectado a cada uno de los sistemas del cuerpo con el SNC y que se denomina sistema nervioso periférico (SNP). Este sistema se encarga de captar los cambios sucedidos y los conduce al SNC donde son procesados (2).

Esta red de comunicación la constituyen los nervios que son un componente numeroso y representativo del SNP y que se dividen en dos grupos; nervios craneales y nervios espinales. Los nervios craneales son doce y su origen se localiza en el encéfalo. Por su

parte, los nervios espinales se pueden dividir en cervicales, torácicos, lumbares, sacros y caudales, según la porción de la médula espinal de la cual se originan (15, 20).

Dentro de los estímulos ambientales que podemos señalar, están; los cambios climáticos, luz, el día y la noche, reacción al peligro, la reproducción, hambre, sueño, etc., los cuales van a influir en el medio interno originando una respuesta metabólica compleja. Sin el buen funcionamiento del sistema nervioso en su conjunto, la vida de cualquier individuo sería muy difícil o prácticamente imposible (15, 20).

Todas estas funciones, llenas de complejidad en un sistema como es el SNC y, en particular, de un órgano como el cerebro, conlleva a un metabolismo acelerado y a un gran consumo de energía lo que involucra que el aporte sanguíneo debe ser en todo momento suficiente y adecuado (2).

El accidente cerebro-vascular es un grupo de condiciones causadas por la interrupción del suministro de sangre al cerebro, por lo general debido a la obstrucción de un vaso por un coágulo o debido a un vaso sanguíneo roto (9, 52, 53). La Organización Mundial de la Salud lo define como: rápido desarrollo de los signos clínicos de alteración focal (o global) de la función cerebral que dura más de 24 horas (a menos que sea interrumpido por la cirugía o la muerte), sin otra causa aparente que un origen vascular. Sin embargo, esta definición, excluye episodios isquémicos más cortos (accidentes isquémicos transitorios: AIT) (1, 9, 19, 24, 34).

El accidente cerebro-vascular es normalmente acompañado por un deterioro en los movimientos, sensibilidad o en la cognición, medidos a través de diversas escalas clínicas y neurológicas. Después de producida la isquemia, las células del cerebro son privadas de la glucosa y el oxígeno que necesitan para funcionar, la barrera hemato-encefálica se daña, causando edema, inflamación y hemorragia. La reperfusión se refiere al restablecimiento del aporte sanguíneo en la zona isquémica del cerebro. Del mismo modo, se refiere a la recanalización y restablecimiento de la permeabilidad de los vasos sanguíneos. Sin embargo, durante la reperfusión, la restauración de oxígeno y el suministro de glucosa suelen provocar una cascada de procesos bioquímicos no deseados. Tanto en la isquemia como en la reperfusión se liberan radicales libres de oxígeno altamente reactivos que exacerbaban el daño a la membrana lo que lleva a la muerte neuronal (9, 38, 61).

El estudio para la comprensión de los mecanismos patológicos y de compensación en el accidente cerebro vascular son aspectos que se pueden observar en un modelo biológico de forma controlada, asimismo la manera en la cual puede ser abordado este cuadro y el brindar un tratamiento ordinario o de tipo experimental son parte de los datos que han de brindar los estudios en modelos animales (35, 59, 60).

El modelo focal pretende inducir una región circunscrita de daño en el cerebro, como ocurre cuando la arteria cerebral media se ocluye. Este modelo se distingue del modelo global de isquemia, el cual induce una reducción del flujo de sangre a todo el cerebro, como el que se realiza a través de la oclusión de las arterias carótidas comunes y las arterias vertebrales. Los modelos focales de isquemia cerebral se cree que son más relevantes para el accidente cerebrovascular que los modelos globales que son más representativos de un paro cardíaco (9).

En los seres humanos, las principales fuentes de suministro de sangre arterial al cerebro son el sistema vertebrobasilar y el sistema de la carótida. La arteria carótida común se divide en arteria carótida externa (suministra a las partes externas de la cabeza) y la arteria carótida interna (que irriga al encéfalo). Más allá, la sangre fluye a través de la arteria cerebral media o de la arteria cerebral anterior. Como en el humano, el cerebro de roedor también es irrigado por la arteria carótida común y el sistema vertebrobasilar (9).

La investigación en los modelos animales ha sido indispensable como un paso crítico en el avance de terapias específicas (35). Actualmente, más del 90% de todos los estudios en animales de laboratorio se lleva a cabo en ratones y ratas. Obviamente, hay varias ventajas con la utilización de los roedores. En primer lugar, los roedores son más fáciles de mantener y menos costosos en comparación con especies mayores. En segundo lugar, los ratones y ratas se reproducen rápidamente con una vida útil corta (9). Además, recientemente se han desarrollado líneas genéticamente modificadas que han ampliado el rango de estudio con lo cual se intenta tener mayor certeza en las investigaciones (30).

Corazón

El corazón es una bomba muscular dividida en cuatro compartimentos, se encuentra rodeado por un saco fibroelástico llamado pericardio (53). El pericardio es una membrana inextensible, compuesta a nivel histológico de una capa fibrosa y una serosa. La capa externa fibrosa consta de tejido conectivo denso, que contiene nervios, vasos sanguíneos y conductos linfáticos; en el interior está recubierta por el pericardio seroso (lamina parietal), que es una capa de mesotelio, al igual que la capa externa del corazón (epicardio); entre este último y el pericardio seroso (lamina parietal) se encuentra el espacio pericárdico, dentro del cual hay normalmente una pequeña cantidad de líquido de tipo seroso (líquido pericárdico) (9).

Por otra parte, el miocardio está constituido por capas de fibras musculares que circunscriben al corazón en forma de espiral. Las fibras musculares se organizan en paralelo y entre ellas circulan vasos sanguíneos, linfáticos y nervios. Un sistema especializado de fibras musculares constituye el sistema de conducción. Este último se

compone por el nodo senoatrial, localizado en la unión de la vena cava superior (*vena cava craneal*) * con el ventrículo derecho; por el nodo atrioventricular que se encuentra en la base del septo interatrial, por el fascículo atrioventricular y los miocitos conducentes (2, 52).

El interior del corazón está recubierto por el endocardio, el cual está compuesto por tejido fibroso y una capa de células endoteliales. Las válvulas atrioventriculares y las válvulas semilunares también se encuentran recubiertas por este último. Unidas a los márgenes libres de las válvulas atrioventriculares se hallan abundantes cuerdas de colágeno recubiertas por el endocardio, las cuales se conocen como cuerdas tendinosas; éstas se insertan en los músculos papilares y contribuyen para evitar que las cúspides se proyecten hacia los atrios durante la sístole (2, 52).

En condiciones normales, las diferentes partes del corazón laten en secuencia ordenada: la contracción de atrios y aurículas (sístole auricular) es seguida por la de los ventrículos (sístole ventricular) y, durante la diástole, se relajan las cuatro cavidades. El latido cardíaco se origina en un sistema cardíaco especializado de conducción y se propaga a través de este sistema a todas las partes del miocardio (2).

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de morbilidad y mortalidad en el mundo (6, 7, 10). Más del 80% de los infartos agudos de miocardio son consecuencia de aterosclerosis coronaria con un trombo (6). La enfermedad isquémica del corazón, también conocida como enfermedad coronaria, comprende un conjunto de cardiopatías diversas cuya alteración fisiopatológica común repercute sobre la perfusión coronaria que puede ir desde un déficit leve hasta la detención súbita del riego sanguíneo al tejido miocárdico (4, 6, 10).

Los modelos de ratón de infarto en miocardio son herramientas esenciales para el estudio de la lesión, reparación y remodelación cardíaca. En la investigación actual está establecido un enfoque para la evaluación cuantitativa de la respuesta inflamatoria y reparadora de la función cardíaca. La importancia radica en que los pacientes que sobreviven a un infarto desarrollan dilatación de las cámaras e hipertrofia de los cardiomiocitos.

*Debido a que existen diferencias en la nomenclatura aplicada en anatomía humana y veterinaria, y con el fin de facilitar la comprensión de este trabajo, se decidió incluir los nombres utilizados en ambas áreas; primero el nombre usado en anatomía humana y después, entre paréntesis y en itálicas, el de anatomía veterinaria, es preciso notar que ambos términos corresponden a lo señalado en las Nóminas Anatómicas correspondientes (Terminologia Anatomica, Federative Committee on Anatomical terminology, 1998 y Nomina Anatomica Veterinaria, 5th edition, International Committee on Veterinary Gross Anatomical Nomenclature, 2012).

A este proceso se le denomina “Remodelación post-infarto” el cual se relaciona con el desarrollo de insuficiencia cardiaca lo que aumenta la incidencia de arritmias que representan un riesgo adicional de mortalidad después de un infarto (8, 39).

Riñones

Los riñones de los mamíferos son órganos pares, complejos que están situados en el espacio retroperitoneal, adosados a la pared abdominal a ambos lados de la columna vertebral y adyacentes a las vértebras lumbares. Se encuentran cubiertos por una cápsula fibrosa que normalmente se desprende con facilidad de la superficie renal. En un corte sagital del riñón se pueden distinguir las subdivisiones de la corteza y la médula (2, 52).

La unidad funcional del riñón es la nefrona, la cual consta del corpúsculo renal, túbulo contorneado proximal, asa renal y túbulo contorneado distal. Los glomérulos y la cápsula componen el corpúsculo renal. El resto del sistema tubular (túbulos colectores), se considera que no forman parte de la nefrona, sino del sistema colector (52).

A pesar de que los riñones constituyen cerca del 0.5% del peso corporal, reciben 20 a 25% del flujo cardiaco. El riego vascular está a cargo de la arteria renal (derecha e izquierda) que sufre múltiples ramificaciones. Debido a que la arteria renal y sus ramas son arterias terminales, la oclusión de cualquier rama posibilita el infarto (2, 52).

En los riñones se filtra un líquido semejante al plasma a través de los capilares glomerulares hacia los túbulos renales (filtración glomerular). Al pasar este filtrado glomerular a lo largo de los túbulos, su volumen se reduce y su composición se altera por los procesos de resorción tubular (eliminación de agua y solutos del líquido tubular) y de secreción tubular (secreción de solutos al interior del líquido tubular), para formar la orina que llegará a la pelvis renal. Una comparación entre la composición del plasma y una muestra promedio de orina ilustra la magnitud de algunos de estos cambios y destaca cómo se eliminan las sustancias de deshecho mientras que se conserva agua, así como electrólitos y metabolitos importantes. Además, la composición de la orina puede ser variada y muchos mecanismos homeostáticos reguladores disminuyen al mínimo o evitan cambios en la composición del líquido extracelular (LEC), modificando la cantidad de agua y de varios solutos específicos en la orina (2).

De pelvis renal, la orina pasa a la vejiga y es expulsada al exterior por el acto de orinar o micción. Los riñones también son órganos endocrinos y elaboran cininas, secretan renina y eritropoyetina, y forman 1, 25-dihidroxicolecalciferol. Funciones más recientemente descubiertas; incluyen el control de la presión sanguínea a través del sistema bradiquininas - quininas y la producción de prostaglandinas (2).

El deterioro y/o la función alterada de varios órganos inducen los cambios correspondientes en el sistema cardiovascular, de tal forma que, aunque el corazón no se encuentre dañado, la enfermedad primaria, eventualmente puede afectar al riñón significativamente, por ejemplo: *diabetes mellitus*, insuficiencia renal (9, 50, 53).

La insuficiencia renal crónica (ICR) es la reducción lenta y progresiva de la filtración glomerular debido a la destrucción progresiva e irreversible de las nefronas que se asocia, a medida que avanza, con la pérdida de las funciones restantes ejercidas por el riñón hasta provocar síntomas clínicos de uremia. A escala mundial, la IRC constituye un serio problema para la salud humana debido a los efectos que produce sobre otros órganos deteriorando la calidad de vida de los pacientes afectados (9, 50, 57).

Las investigaciones biomédicas proponen la utilización de animales de laboratorio como biomodelos naturales o inducidos de diversas enfermedades los cuales ayudan al estudio y comprensión de la fisiología, patogenia y posibilidades de tratamiento, estos modelos reproducen situaciones patológicas presentes en humanos que constituyen serios problemas de salud (9, 44, 50).

Para entender mejor la IRC y sus complicaciones, se introdujeron modelos experimentales de animales en la investigación biomédica. La IRC puede ser inducida por diversos métodos, pero en general son dos: nefrectomía química en la cual se aplica una sustancia con capacidad nefrotóxica y a través de una intervención quirúrgica. De ésta última, el modelo de cinco sextos (5/6) es el más utilizado, extrapolable en condición al humano, como se ha podido observar en diferentes procesos patológicos y es de los pocos modelos que ofrece todo el espectro de evolución de la enfermedad renal: proteinuria, hipertensión arterial, pérdida de función renal e insuficiencia cardíaca (9, 44, 50, 57).

Hipertensión

Se han desarrollado y caracterizado varios modelos hipertensos inducidos por transgénesis en animales como la rata y el ratón. Uno de los modelos más comúnmente empleados es la rata espontáneamente hipertensa (SHR) que representa la hipertensión esencial. La hipertrofia ventricular es progresiva y se hace evidente a los 9 meses de vida. La cepa Dahl de ratas, es sensible a la sal, por lo que desarrolla hipertensión y, finalmente, insuficiencia cardíaca cuando se le provee una dieta alta en sal. La hipertrofia ventricular izquierda es evidente a las 4 semanas y progresa a insuficiencia cardíaca en 15 a 20 semanas (2, 9).

Este enfoque del modelo de insuficiencia cardíaca tiene ventajas y desventajas. La fisiopatología de la falla cardíaca en estas cepas de ratas es aplicable a la insuficiencia cardíaca humana, por la patología de desarrollo gradual con el tiempo y la posterior

descompensación. Sin embargo, los experimentos son relativamente caros, ya que implican tener grandes colonias de ratas que se deben mantener durante largos períodos de tiempo (9).

El método más directo para imitar los cambios patológicos en los modelos es mediante la manipulación quirúrgica (9). El modelo desarrollado inicialmente en 1939 por el Dr. Irvine Page describe un modelo de hipertensión causado por una perinefritis inducida por la envoltura de los riñones con papel celofán. Se genera un estímulo mecánico persistente en el área peri-renal, hay inflamación, se forma una membrana alrededor del riñón, ésta aumenta la presión intra-renal y se incrementa la resistencia de las arteriolas renales provocando el aumento de la presión arterial sistémica (54).

OBJETIVOS

Objetivo general:

Describir las técnicas utilizadas en investigación para inducir modelos animales en rata y ratón de las principales afecciones cardiovasculares del humano.

Objetivos particulares:

- a. Brindar una visión general de lo que representa el desarrollo de modelos animales para la investigación en el área de la salud humana.
- b. Conocer la importancia de estas técnicas para generar modelos cardiovasculares en rata y ratón en el estudio de la fisiopatología y en la experimentación clínica.
- c. Generar una guía para todo aquel profesional de la salud interesado en este tipo de procedimientos con fines de investigación.
- d. Despertar interés en el Médico Veterinario Zootecnista por el trabajo experimental desarrollado en bioterios e institutos de investigación.

METODOLOGÍA

Con el fin desarrollar este trabajo de tesis se realizaron los siguientes pasos:

1. Se realizó una búsqueda exhaustiva en las principales bases de datos hemerográficas (Science direct, Pubmed, Medline, Willey) en la que se abarcó; artículos, resúmenes, libros especializados y notas, que abordaban los procedimientos utilizados para generar los modelos animales que serían descritos en este trabajo.
2. Una fuente importante de información fueron los protocolos de investigación del Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional.
3. La mayoría de las fotografías que complementan este trabajo se obtuvieron en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular, aquellas que tienen otro origen se mencionan los créditos correspondientes en el pie de figura.
4. Finalmente se organizó el material obtenido y se elaboró el trabajo escrito.

RESULTADOS

DESCRIPCIÓN DE LAS TÉCNICAS.

1. MODELO DE INFARTO CEREBRAL CON REPERFUSIÓN

El accidente cerebro vascular tiene su origen en la oclusión de algún vaso sanguíneo, debido a; aterosclerosis, embolismo cardiaco, pequeña oclusión de vasos a consecuencia de otra etiología determinada o desconocida (9, 59).

El mecanismo más común de accidente cerebro vascular en la inducción de animales es la inserción de un filamento a través de la arteria carótida común hasta el punto de origen de la arteria cerebral media (9, 19) (Fig. 1.A).

Una vez que se tiene el roedor, se coloca en la balanza para registrar el peso y poder determinar la dosis del anestésico. En la mayoría de éstos, se requiere la utilización de un anestésico inhalado, que principalmente se trata de isoflurano, ya que ofrece ventajas respecto a otros, como es mantener mejor las funciones cardiovasculares y un margen de seguridad superior en cuanto a la depresión y sensibilidad del miocardio a catecolaminas (17, 48). La concentración de aplicación va de 1.5% a 5%. Sin embargo, su utilización requiere de un equipo especial que no se encuentra disponible en muchos laboratorios, por lo que se puede hacer uso de una segunda opción igualmente útil, la combinación de ketamina con xilazina, que brinda un buen nivel de analgesia, relajación muscular, sedación y duración prolongada con efectos secundarios menores (17, 48). En ratones se maneja una dosis de 90-150 mg/kg de ketamina y de 7.5-16 mg/kg de xilazina. En la rata se usan de 40-80 mg/kg de Ketamina y de 5-10 mg/kg de xilazina, en ambas especies se puede usar la vía intraperitoneal (IP) o la vía intramuscular (IM) (17) (Fig. 1.B y C).

Cuando el animal se encuentre relajado, se procede a rasurar la porción ventral del cuello y se intuba con una sonda vía oro-traqueal para mantener libres las vías respiratorias (Fig. 2.A).

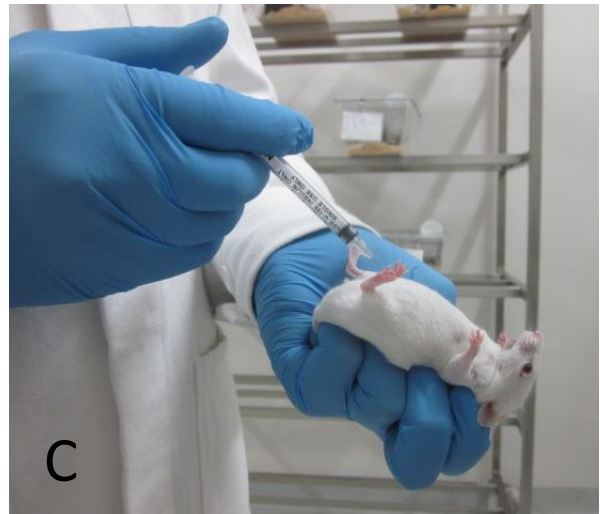
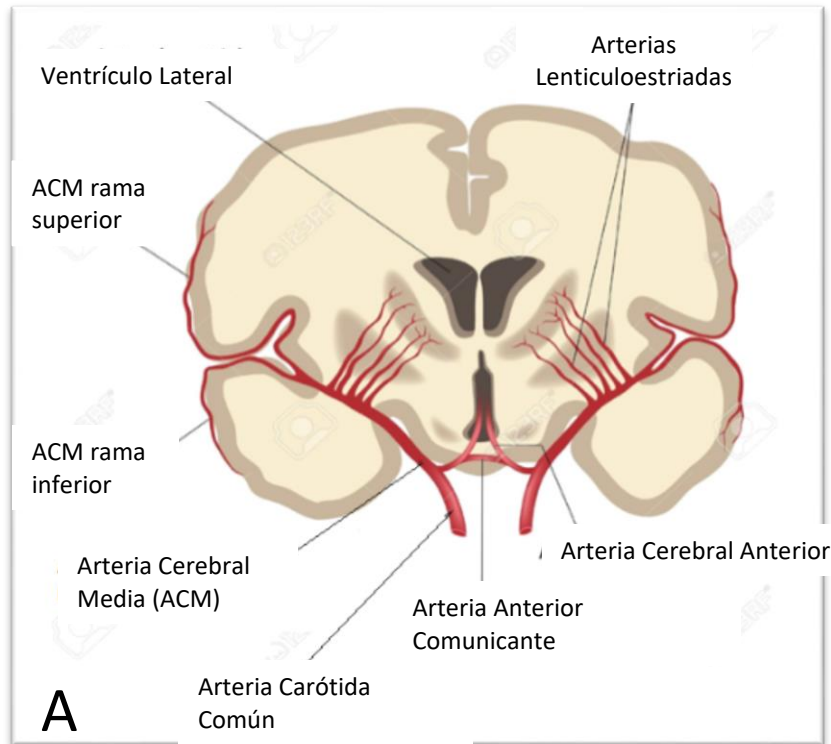


Figura 1. Esquema de la irrigación en cerebro y sujeción de los roedores para la aplicación por vía intraperitoneal. **A.** Vista sagital de cerebro con sus principales arterias. **B.** Inyección intraperitoneal en rata. **C.** Forma de sujetar un ratón para la aplicación vía intraperitoneal. Imagen; A, tomada de https://www.123hrf.com/photo_13404943_stock-photo.html y modificado por Hernández Malpica PL. Fotografías; B y C, Dr. Crisóforo Mercado Márquez.



Figura 2. Preparación del roedor para la cirugía. A. Sondeo orotraqueal. **B.** Roedor en posición decúbito dorsal con la región cervical ventral rasurada. **C.** Pinzamiento de cola para verificar el nivel de sensibilidad. Fotografía; B, Tomada de Procedimientos Quirúrgicos Comunes en Roedores. Marcel Perret-Gentil. [Vpr.utsa.edu/larc/index.php](http://vpr.utsa.edu/larc/index.php).

El animal se coloca en posición decúbito dorsal (Fig. 2.B), se le puede colocar una jeringa o algo similar por debajo de la nuca, esto ayuda a exponer el vaso sanguíneo y facilita el proceso. Se realiza la limpieza de la zona con un antiséptico convencional a base de yodo con algodón y gasa estéril. Para verificar que el roedor se encuentra en plano quirúrgico, se hace una ligera presión en la cola con una pinza y se verifica el reflejo palpebral (54), y no debe haber respuesta ante estos estímulos (Fig. 2.C).

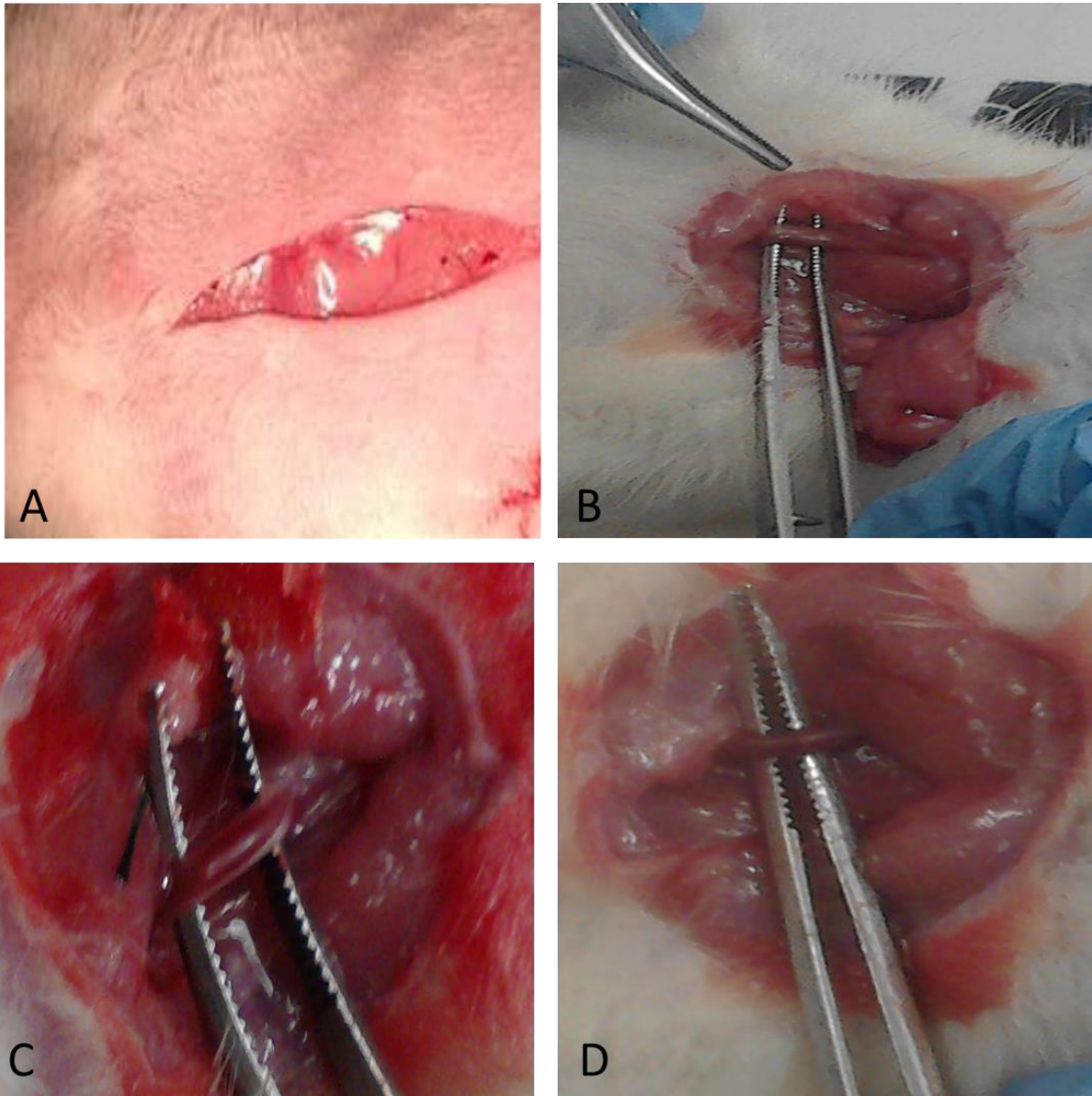


Figura 3. Incisión sobre la línea mediana cervical ventral. A. Incisión en piel. **B.** Disección roma de los músculos. **C.** Arteria carótida común (estructura de color rojo) y nervio vago (estructura muy delgada de color blanco). **D.** Arteria carótida común aislada.

Entonces se incide con bisturí sobre la línea mediana cervical ventral (Fig. 3.A) y se separan los músculos esternohioideo, esternocleidomastoideo y digástrico con incisión roma (Fig. 3.B).

Cuidadosamente se disecciona y se identifica a la arteria carótida común (ACC), esta maniobra se debe realizar con mucho cuidado para no dañar al nervio vago. La ACC es grande y el nervio vago se ubica sobre la cara lateral de esta arteria (Fig. 3.C).

Se expone la ACC en sentido craneal hasta descubrir la bifurcación e identificar a la arteria carótida interna (ACI) y a la carótida externa (ACE) (14, 23, 30, 33, 60, 64) (Fig. 3.D).

Una vez que se han identificado y aislado las carótidas, en la ACC se coloca una sutura con un amarre de jareta proximal y se sujeta con la mano o con una pinza (Fig. 4.A).

En seguida se realiza un pequeño corte longitudinal con bisturí sobre el vaso sanguíneo (Fig. 4.B) y se introduce el filamento calibre 4-0 (es el más utilizado), se hace avanzar a través de la ACI (Fig. 4.C) hasta sentir una leve resistencia lo que señala que se ha llegado a la arteria cerebral anterior (*arteria cerebral rostral*) *, es entonces que queda obstruido el flujo de sangre a la arteria cerebral media.

La reperusión es permitida después de un lapso de tiempo que varía dependiendo de la conveniencia de la investigación, pero que en la mayoría de los casos es de 60 a 90 minutos. Se retira el filamento y se aplica una gota de pegamento comercial “Kola-loka” en el lugar de la incisión como coagulante, entonces se retira la sutura puesta en jareta, se verifica que no haya sangrado y se cierra la herida de piel con puntos separados.

Después de la cirugía el animal es alojado en un espacio cómodo, como tratamiento post-operatorio se administra buprenorfina a una dosis de 0.05-0.5 mg/kg en rata y de 2mg/kg en ratón por vía subcutánea (SC) o intraperitoneal (IP), en una sola aplicación como analgésico (17).

La evaluación del déficit neurológico se lleva a cabo a las 3 y 24 horas después de la inducción de la isquemia y se anota en una escala de 7 puntos: 0, sin déficit neurológico; 1, no extiende la pata delantera izquierda completamente; 2, da vueltas a la izquierda de manera inconstante; 3, vueltas a la izquierda; 4, con caídas a la izquierda; 5, no camina espontáneamente y con disminución del nivel de conciencia; y 6, muerte del animal (3, 13, 19, 40, 60).

Pasado este periodo de observación, el animal se eutanasia con una sobredosis de pentobarbital sódico vía intraperitoneal y se extrae el cerebro, se coloca en congelación durante una hora. El cerebro se corta en rebanadas de 2 mm de espesor, utilizando un bloque de secciones de corte (Fig. 5.A).

Se tiñe con la solución de trifeniltetrazolio (TTC) (2,3, 5-trifenil-2H-tetrazolio cloruro) al 1% durante 30 minutos a 37° C, seguido por inmersión durante la noche en formaldehído al 4%. Las áreas de infarto se identifican como zonas sin teñir (color pálido) y se expresa como el porcentaje del tejido infartado en comparación con el total del cerebro (3, 14, 19, 25, 27, 31, 33, 36) (Fig. 5.B y C).

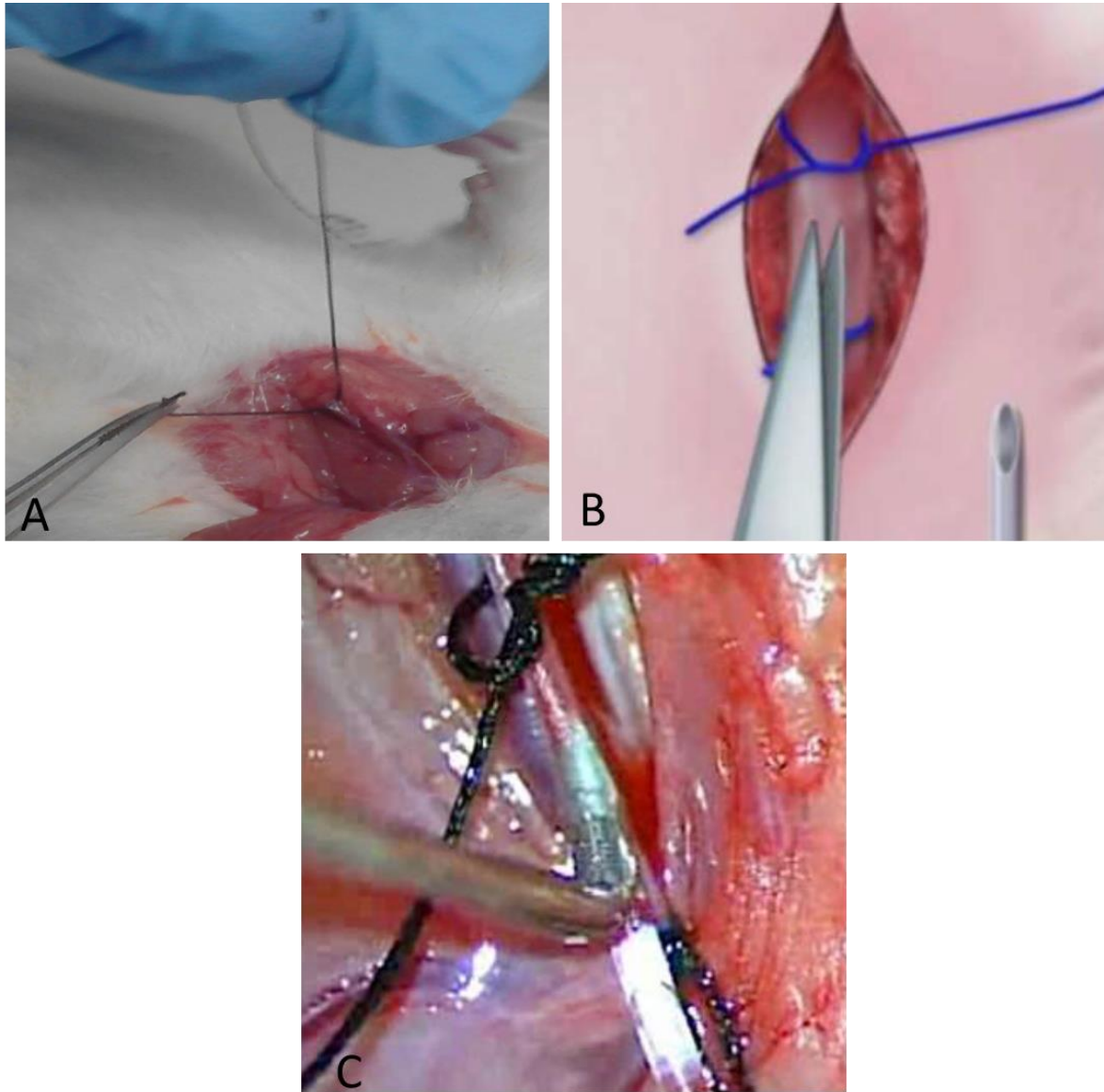


Figura 4. Colocación de la sutura en la arteria carótida común. A. Colocación del primer hilo. **B.** Vista de las dos suturas para realizar el corte. **C.** Introducción del filamento a través del vaso sanguíneo. Fotografía; B y C, Tomadas de Procedimientos Quirúrgicos Comunes en Roedores. Marcel Perret-Gentil. vpr.utsa.edu/larc/index.php.

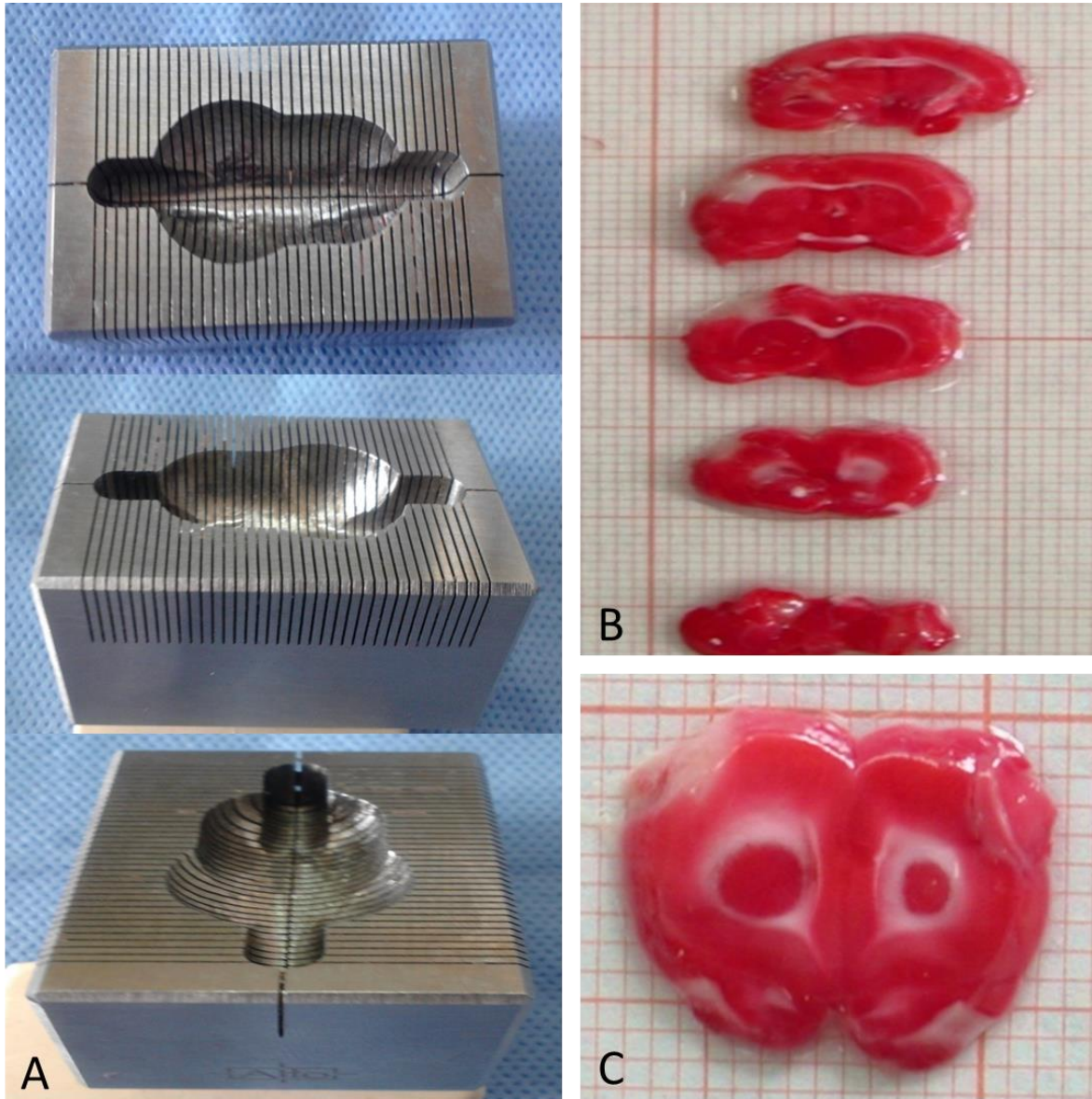


Figura 5. Instrumento de corte y rodajas de cerebro. A. Bloque metálico para sección de cerebro. **B.** Cortes de cerebro teñidos con trifeniltetrazolio que muestra la zona de infarto (área sin color). **C.** Aproximación a una Imagen donde se aprecia la zona de infarto en la esquina superior izquierda en color blanco. Fotografía; B y C, Dra. Guadalupe Cleva Villanueva López.

2. MODELO DE INFARTO EN MIOCARDIO CON REPERFUSIÓN.

Las enfermedades cardiovasculares representan la causa principal de morbilidad y mortalidad, y de éstas, la enfermedad coronaria del corazón es la más importante. El estrechamiento de las arterias con el tiempo a causa de aterosclerosis o la oclusión aguda de la arteria coronaria por trombosis representan más del 80% de los infartos agudos de miocardio (7), asimismo, la diabetes y la obesidad son condiciones de riesgo (18, 45).

Una vez que se tiene el roedor, se pesa en la balanza y se determina la dosis de anestesia. Aunque el uso de isoflurano brinda múltiples ventajas (17), el no contar con el equipo adecuado hace necesaria la utilización de pentobarbital sódico, ya que es accesible, de bajo costo, induce la anestesia rápidamente y de fácil aplicación por vía intraperitoneal (Fig. 1.B y C) a roedores de distintas edades y pesos corporales, pero además esta vía resulta benéfica ya que son menos pronunciados los efectos cardiovasculares (19). Se aplica a una dosis de 40-60 mg/kg en la rata y de 30-50 mg/kg en ratón (17).

Cuando el roedor se encuentre relajado, se rasura perfectamente la porción ventral del tórax y se intuba vía orotraqueal lo cual brinda una vía aérea permeable (Fig. 2.A). El animal se conecta a un respirador para roedores (Harvad Apparatus) calibrado a una frecuencia de 56/min en la rata y de 76/min en ratón. Se coloca en decúbito dorsal sujetando las cuatro extremidades en extensión y se coloca una goma detrás de los incisivos para mantener la cabeza con cierta extensión. Se realiza la debida asepsia en toda el área depilada (Fig. 6.A).

Se corrobora que el roedor se encuentre en plano quirúrgico, haciendo una ligera presión con una pinza en la cola (Fig. 2.C) y se verifica el reflejo palpebral, al no haber respuesta ante estos estímulos se puede comenzar (37).

Algunos autores utilizan bupivacaína como anestésico local infiltrando en el lugar de la incisión de la piel (11, 37). La cual se realiza del segundo al cuarto espacio intercostal izquierdo (63), se incide la piel para descubrir el plano muscular (Fig. 6.B). Entonces se repliegan los músculos pectoral menor y mayor (*pectoral superficial y profundo*) quedando expuesta las costillas, se incide el músculo intercostal y con los ganchos separadores se abre para acceder a la cavidad torácica y poder visualizar el corazón (Fig. 6.C).

Enseguida, con una pinza se sujeta el pericardio y se hace una incisión. Con una ligera tracción se descubre el corazón para poder identificar la rama interventricular anterior de la arteria coronaria izquierda (*rama interventricular paraconal*) (Fig. 6.D).

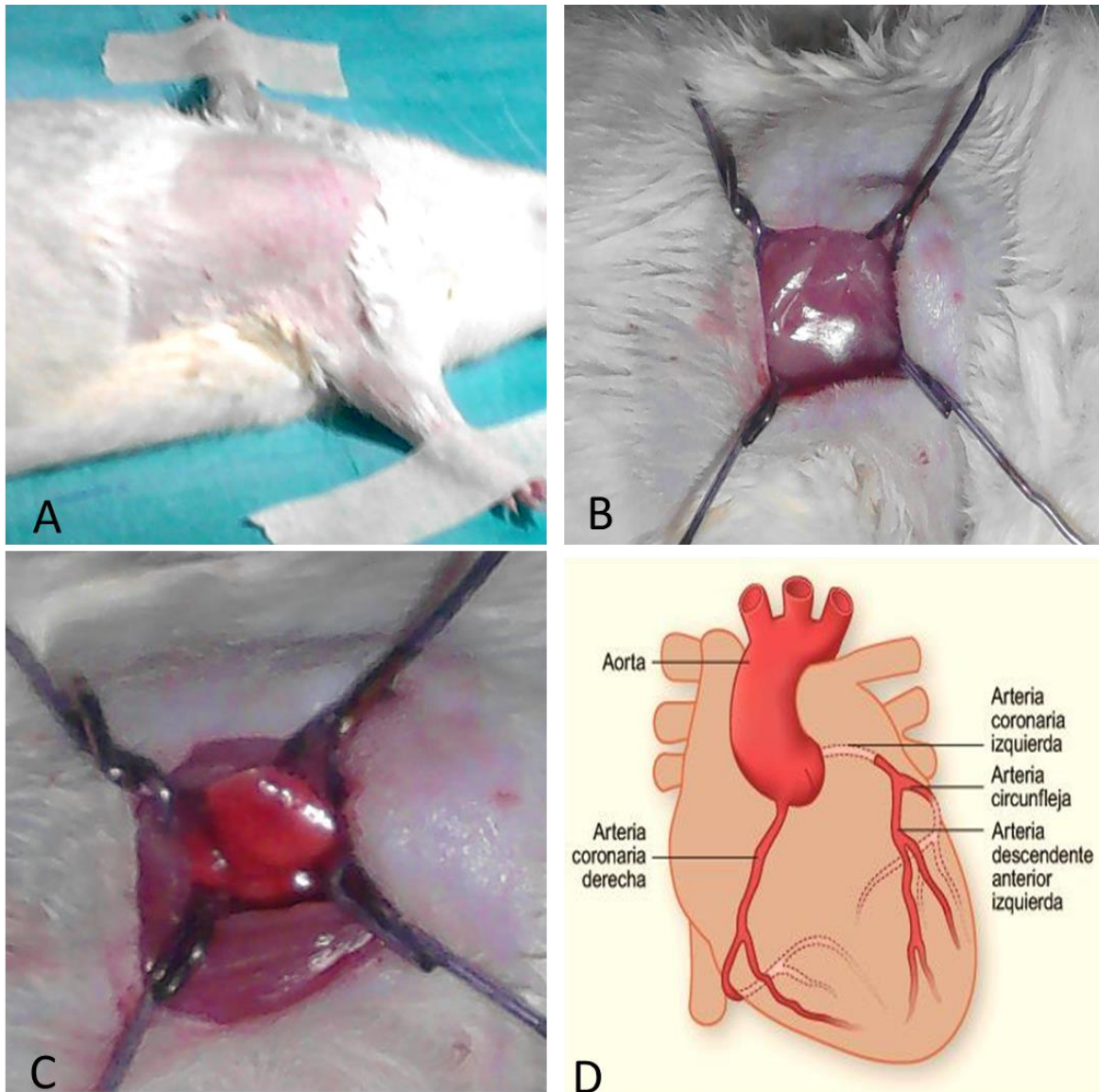


Figura 6. Cirugía y esquema de corazón. **A.** Animal preparado para la cirugía con tórax depilado. **B.** Incisión de piel mostrando el plano muscular. **C.** Cavidad torácica abierta. **D.** Esquema de corazón con su irrigación. Imagen; D, tomada de <http://g-se.com/es/prevencion-y-rehabilitacion-cardiovascular/blog/circulacion-e-irrigacion-cardiaca>.

Se coloca una ligadura alrededor de la arteria coronaria a 2-3 mm de distancia aproximadamente de su origen y se ocluye apretando la ligadura, durante 30 minutos (8) (Fig. 7.A). La ligadura puede ser de seda o de polipropileno calibre 3-0 a 6-0, siendo el más común el de 5-0 y 6-0 (7, 9, 11, 18, 47) (Fig. 7.B).

La oclusión se confirma al observar la palidez regional de la pared craneal del ventrículo izquierdo (7, 9, 11, 18). Al haber transcurrido los 30 minutos, se libera la arteria y se retira la sutura, de ésta manera comienza a fluir la sangre nuevamente (reperusión). El corazón queda en su posición y mediante succión directa se desaloja el aire y líquido de la cavidad.

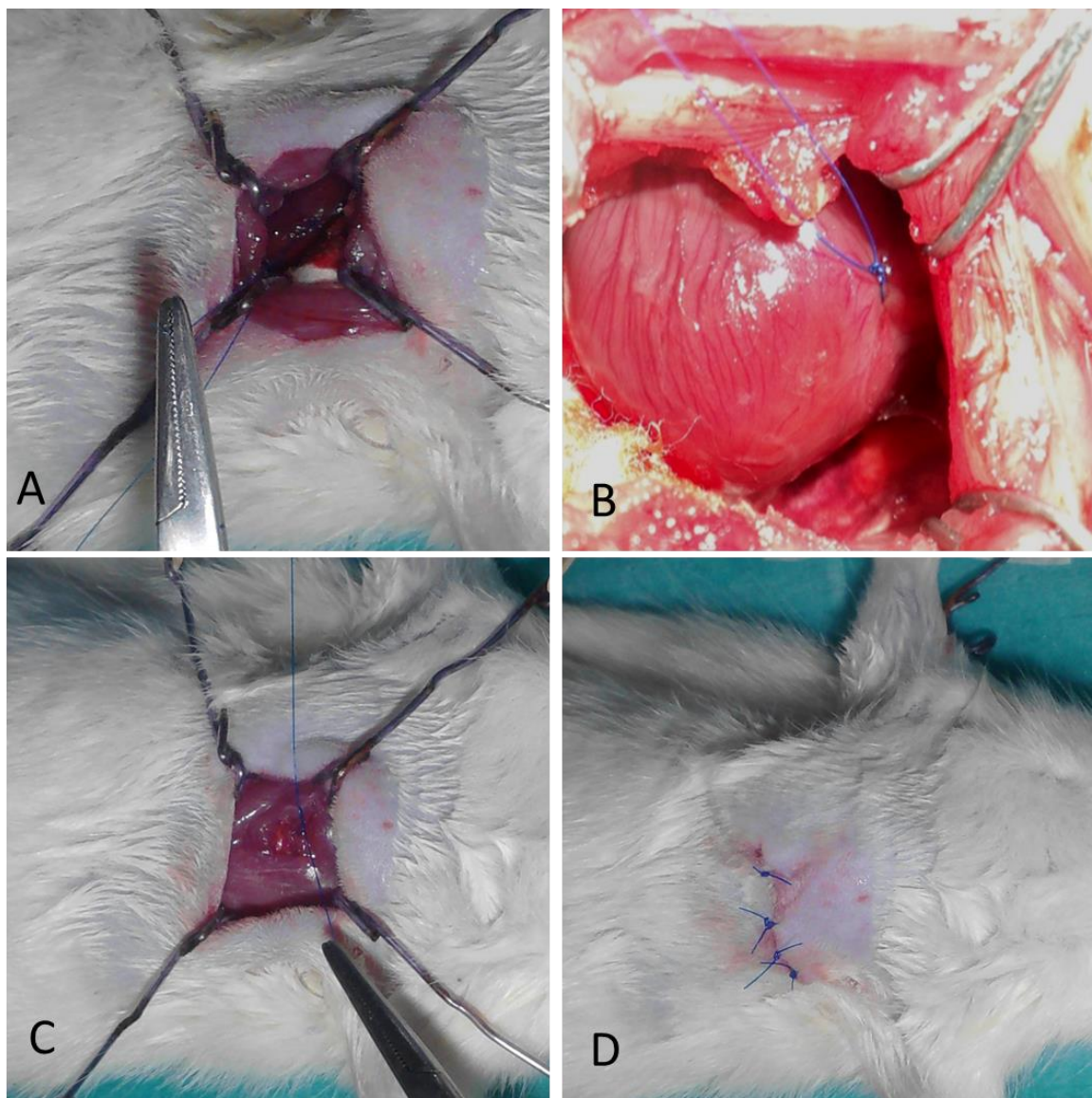


Figura 7. Proceso quirúrgico. A. Colocación de la sutura en la rama interventricular paraconal. B. Vista cercana de la ligadura en la rama interventricular paraconal. C. Plano muscular suturado. D. Piel cerrada con puntos simples separados.

Se sutura parcialmente la cavidad con el fin de que antes de completar el último punto en los músculos intercostales se pueda recuperar la presión negativa. Para ello, se apaga un momento el respirador y se hace ligera presión sobre las costillas con los dedos índice y pulgar, con esto se desaloja el aire y en seguida se prende nuevamente el respirador de tal manera que los pulmones se inflen ocupando todo el espacio de la cavidad, para entonces continuar con la sutura de la capa muscular (sutura continua) y piel (puntos separados) (Fig. 7.C y D).

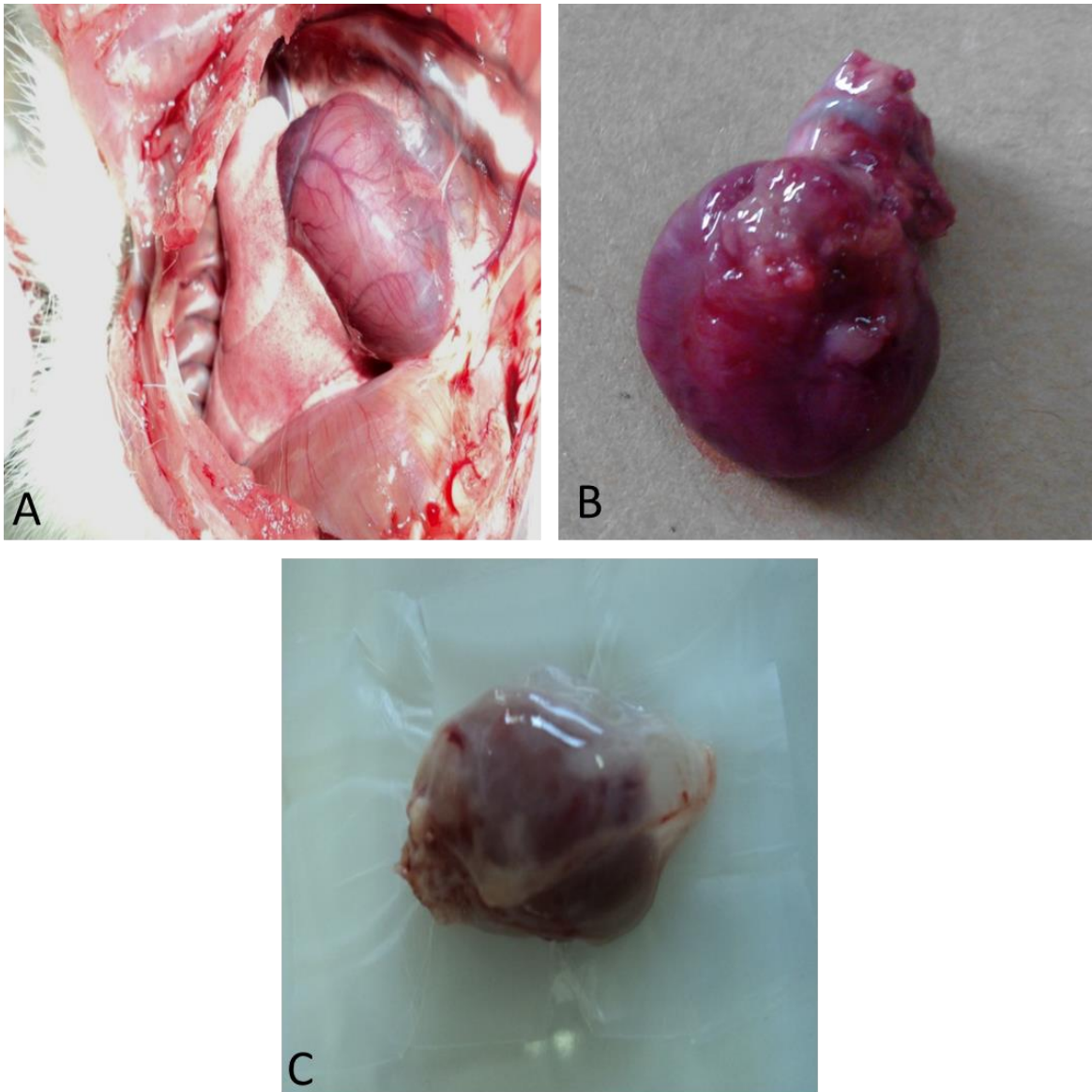


Figura 8. Procesamiento del corazón infartado. A. Tórax abierto que muestra el corazón infartado después de dos semanas. B. Corazón extraído donde se aprecia la zona de infarto de tono más pálido. C. Corazón envuelto en plástico y congelado.

Posteriormente como analgésico se aplica buprenorfina en una dosis de 2 mg/kg en ratón y 0.5 mg/kg en rata por vía IP o SC, una o dos aplicaciones (17, 21). Otras opciones son; ketoprofeno a una dosis de 5 mg/kg en ratón vía SC y meloxicam a una dosis de 0.2 mg/kg vía IM en rata (17, 37). Entonces se coloca el animal en un espacio preparado, templado, limpio y cómodo para que se recupere de la anestesia, se brinda agua y alimento a libre acceso una vez que se haya recuperado de la anestesia.

Una vez que ha transcurrido el período contemplado en el proyecto donde se está utilizando el modelo, finalmente el animal se eutanasia con una sobredosis de anestésico y el corazón es extraído para realizar el estudio histológico. Al ser expuesto el corazón, se nota la presencia de adherencias resultado de la intervención (Fig. 8.A), entonces es extraído (Fig. 8.B) y se realiza la tinción con cloruro de trifeniltetrazolio (TTC), la cual resulta ser una de las más utilizadas para cuantificar el tamaño del infarto (9).

Después de extraer el corazón se coloca en una envoltura de plástico de color claro como la utilizada para los alimentos y se congela a -20°C por 1-2 horas (Fig. 8.C).

Cuando el tejido es congelado puede ser cortado con mayor facilidad en rodajas de entre 2 a 3 mm, utilizando el bloque para seccionar (Fig. 9.A).

Las rodajas de corazón son incubadas con trifeniltetrazolio a $37-38^{\circ}\text{C}$ durante 15 a 20 minutos, dando movimiento a las rodajas. Pasado este periodo, se nota que el tejido vivo es de color rojo y el tejido infartado es pálido (9) (Fig. 9.B). Después se fija el corte con formol, el cual además aclara el tejido aumentando el contraste. Una vez que el contorno del infarto se ha trazado, es necesario calcular el área (planimetría) con el programa Imagen J (National Institutes of Health).

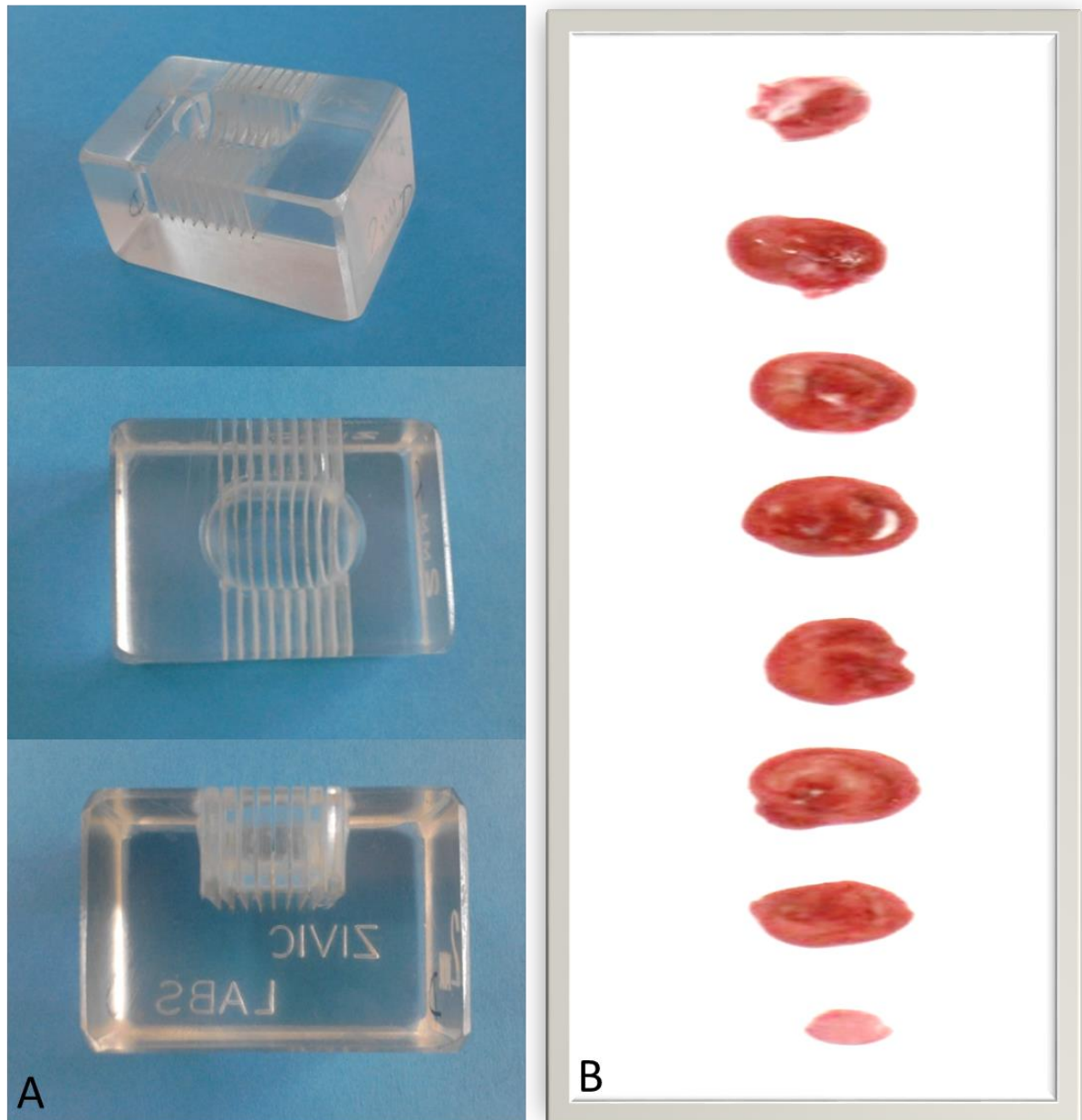


Figura 9. Bloque de sección y cortes de corazón. A. Bloque de sección para cortes de corazón. B. Cortes de corazón teñidos con trifeníltetrazolio que muestran la zona de infarto en tono pálido a diferencia del tejido viable de color rojo.

3. MODELO DE NEFRECTOMÍA EN 5/6 PARA INSUFICIENCIA CARDIACA.

La insuficiencia renal crónica (IRC) es la incapacidad de los riñones para excretar los productos de deshecho y para mantener el agua, electrolitos y el equilibrio ácido-básico en condiciones basales (2, 9, 52, 53). La inadecuada función trae como consecuencias complicaciones cardiovasculares como hipertensión, hipertrofia ventricular izquierda, disfunción sistólica y diastólica e insuficiencia (9, 44, 50, 58). A escala mundial la IRC representa un serio problema para la salud humana y los pacientes experimentan una alta tasa de mortalidad por enfermedades cardiovasculares y el riesgo aumenta con la progresión de la enfermedad renal (2, 9, 53, 58).

Para realizar esta técnica se toma el animal y se pesa para dosificar la anestesia, que para este caso el anestésico más utilizado es pentobarbital sódico a una dosis de 40-60 mg/kg en rata y de 30-50 mg/kg en ratón IP (9, 50). Para la administración intraperitoneal se toma el animal por el dorso y la jeringa se dispone oblicuamente, en un ángulo de 45°, de tal manera que la aguja sea introducida en forma inclinada en el abdomen (Fig. 1.B y C).

Una vez que el animal se encuentra totalmente relajado, se rasura la porción ventral del abdomen y se coloca la sonda orotraqueal para mantener la vía aérea libre (Fig. 2.A).

Entonces, se coloca en posición dorso-ventral con abdomen y miembros fijos, se realiza la asepsia completa de la zona con antiséptico yodado convencional (Fig. 10.A).

Después de verificar la profundidad de la anestesia mediante la evaluación de la respuesta al reflejo palpebral y a la presión en la cola (Fig. 2.C). Se realiza una incisión en la línea mediana abdominal ventral, 1 cm por debajo del proceso xifoides del esternón (de 2-3 cm de largo aproximadamente) (Fig. 10.B).

Se accede a la cavidad abdominal y con ayuda de los separadores se busca el riñón y se retira con precaución del espacio retroperitoneal. Se remueve el tejido conectivo circundante al riñón (Fig. 10.C y D), poniendo especial cuidado en el polo superior (*extremo craneal*) del riñón para prevenir cualquier posibilidad de daño a la glándula adrenal.

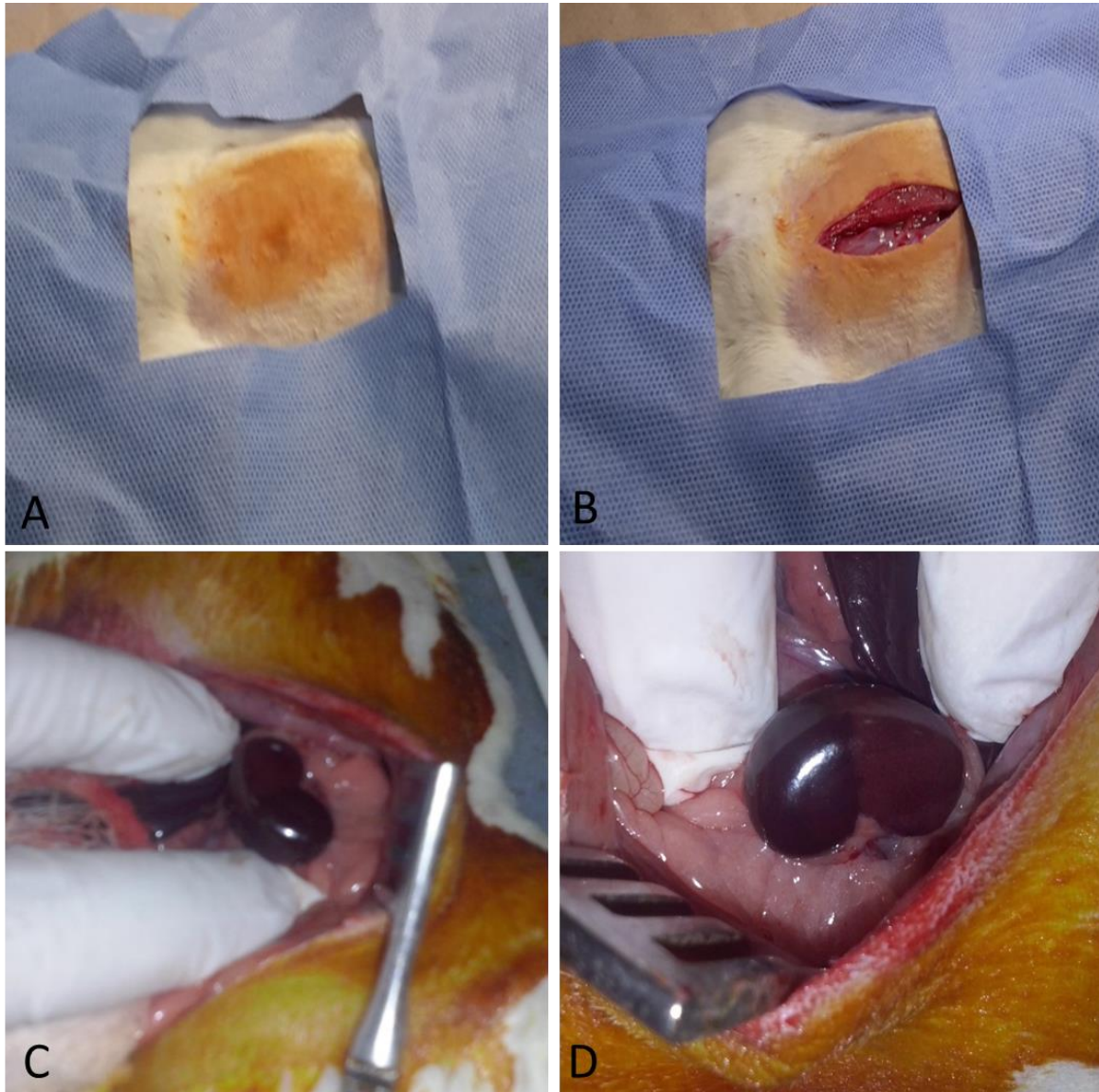


Figura 10. Preparación del roedor para cirugía y exposición del riñón. A. Roedor con vientre listo para la cirugía. **B.** Incisión en piel y músculos para acceder a cavidad abdominal. **C.** Exposición del riñón. **D.** Vista cercana de uno de los riñones.

Los vasos renales se sujetan con una pinza microvascular (Lyostypt) no traumática y los dos extremos (dos tercios de la masa renal) se resecan por cortes perpendiculares al eje longitudinal (Fig. 11.A).

La superficie de corte se cauteriza con pinza hemostática. Después de haber controlado el sangrado, la pinza microvascular se retira y el muñón renal es devuelto al retroperitoneo y se sutura la herida de la pared abdominal en capas con monofilamento (Fig. 11.B).

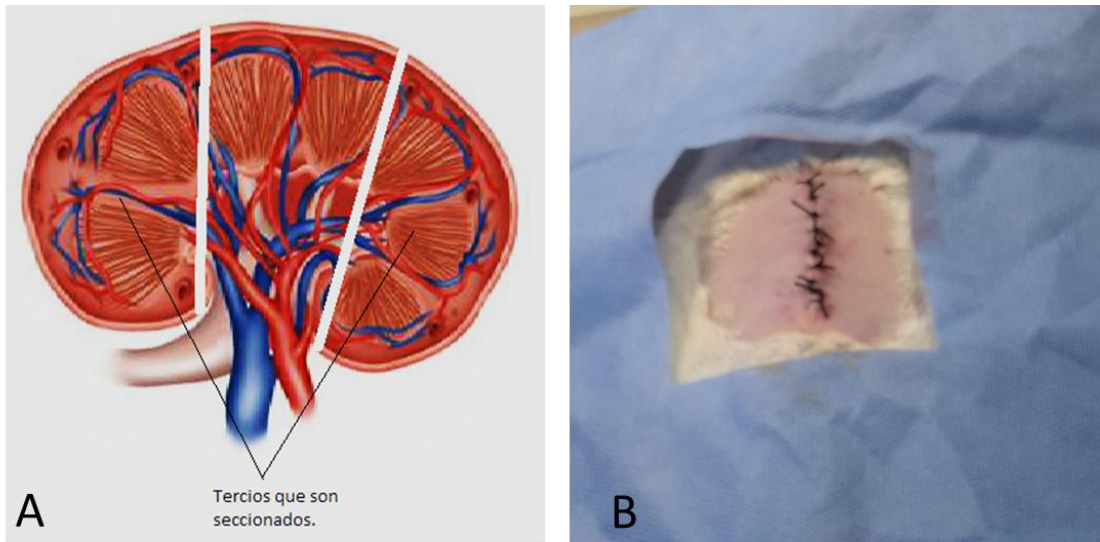


Figura 11. Líneas de corte del riñón y terminación de la cirugía. A. Esquema del riñón con los sitios de sección indicados con dos líneas blancas. **B.** Cavidad cerrada y con puntos en piel de tipo separados simples. Imagen; A, Tomada de Procedimientos Quirúrgicos Comunes en Roedores. Marcel Perret-Gentil. [Vpr.utsa.edu/larc/index.php](http://vpr.utsa.edu/larc/index.php) y modificada por Hernández-Malpica PL.

Se deja recuperar en un alojamiento limpio, cómodo y se aplica el antibiótico marbofloxacina a una dosis de 5 mg/kg SC, se deja con libre acceso a comida y agua (9, 44, 50).

Dos semanas después de la nefrectomía parcial, el riñón derecho se expone por el mismo procedimiento, los vasos renales se ligan con una sutura de monofilamento no absorbible y se extrae el riñón en su totalidad para así lograr en cinco sextas partes la reducción de la masa renal total. El resto del procedimiento se realiza como ya se indicó con anterioridad.

Diez semanas después de la segunda cirugía se reportan los cambios ocurridos como consecuencia de haber reducido la masa renal funcional. Estos cambios comprenden; insuficiencia cardíaca, aumento significativo de la creatinina y urea en suero, poliuria y disminución en la filtración glomerular, tasa medida por el aclaramiento de creatinina que indica un deterioro grave de la función renal, cambios morfológicos en el riñón remanente y remodelación del tejido (57). Posteriormente, el animal se mantiene con vida sólo el tiempo necesario establecido por el protocolo del tipo de estudio que se lleva a cabo y finalmente se eutanasia con una sobredosis de anestésico.

4. MODELO DE HIPERTENSIÓN INDUCIDO POR EL MÉTODO DE PAGE.

La hipertensión arterial es un factor de riesgo importante para el accidente cardiaco, renal o cerebrovascular (6, 9, 54).

Se toma el roedor y se coloca en la balanza para ser pesado y poder calcular la dosis de anestesia. Aquí se utiliza una combinación de diazepam con ketamina debido a que son mínimos los efectos cardiovasculares, en especial el efecto hipotensor. La dosis es de 40 mg/kg de ketamina por 5 mg/kg de diazepam en la rata por vía IP. En ratón es 100 mg/kg de Ketamina y 5 mg/kg de diazepam por vía IP (17).

Se sujeta el animal por el dorso y se aplica el líquido manteniendo la jeringa inclinada (Fig. 1.B y C).

Cuando el animal se encuentra totalmente relajado, se rasura abdomen (Fig. 12.A) y se intuba vía orotraqueal (Fig. 2.A).

Entonces se coloca en decúbito dorsal con una goma por detrás de los dientes para mantener la cabeza en extensión y se realiza la asepsia de la región abdominal ventral a intervenir (Fig. 12.B).

Se comprueba la profundidad de la anestesia mediante el pinzamiento de la cola (Fig. 2.C) y reflejo palpebral, de no haber respuesta, se comienza con la técnica (37).

Se realiza una incisión en la línea mediana abdominal ventral, 1 cm por debajo del proceso xifoides del esternón y con ayuda de los separadores se localizan y exponen los riñones, uno a la vez (Fig. 12.C y D)

Después de haber expuesto el riñón se retira el peritoneo y la cápsula adiposa que lo rodea para dejarlo descubierto (Fig. 13.A).

Se debe contar con una bolsa prefabricada de celofán de aproximadamente 4 x 3 cm, la cual ya cuenta con hilo de algodón para que pueda ser fijada al hilio renal.

Se introduce el riñón en la bolsa sin ejercer presión sobre éste y se cierra la bolsa sobre el hilio mediante el hilo de algodón (Fig. 13.B).

Para que la bolsa se ajuste a la periferia renal, los excedentes de celofán se sellan con una pinza caliente, teniendo precaución de no tocar el riñón con ella (Fig. 13.C).

Una vez sellada la bolsa, se ajusta a la periferia del riñón y se corta el borde sobrante, teniendo la precaución de no abrir la bolsa (Fig. 13.D).

Por último, se deja el riñón en su posición anatómica original y se repite el mismo procedimiento con el riñón contralateral (Fig. 14.A).

Finalmente, se cierra la cavidad abdominal con hilo quirúrgico catgut calibre 3-0 y la piel se cierra con seda trenzada de 3-0 con puntos simples separados (54) (Fig. 14.B y C). El animal se medica con meloxicam como analgésico en una dosis de 0.2mg/kg para la rata por vía SC ó IM y de 1-10 mg/kg en ratón vía IP, en una sola aplicación.

Se pone al animal en un espacio limpio y cómodo para que se recupere de la anestesia y se le deja libre acceso a comida y agua.

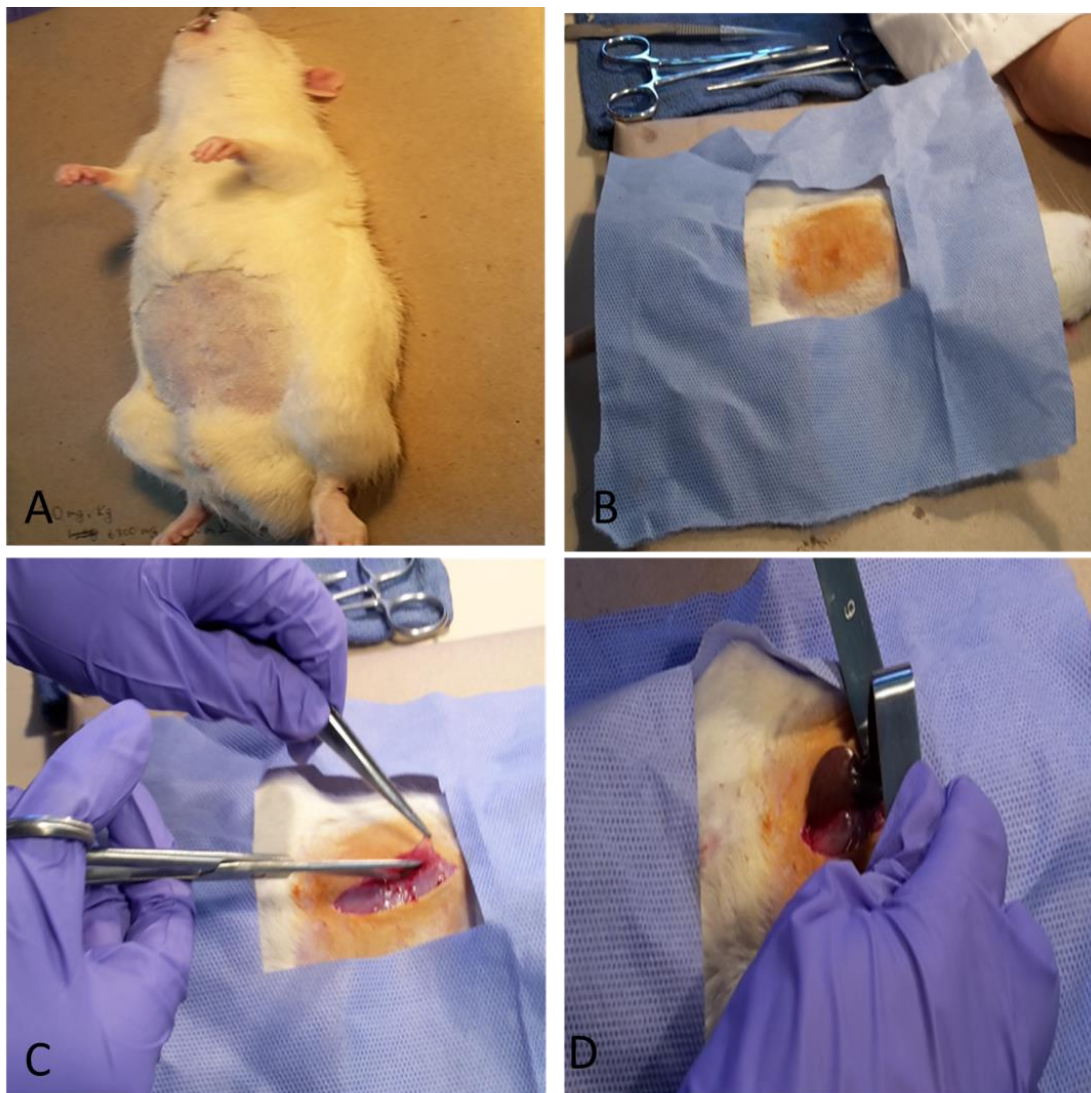


Figura 12. Preparación e inicio de la cirugía. A. Depilación de abdomen una vez que el animal está relajado. B. En posición y listo para incidir con bisturí. C. Corte con tijera en línea mediana para acceder a cavidad abdominal. D. Con los separadores se facilita la localización del riñón.

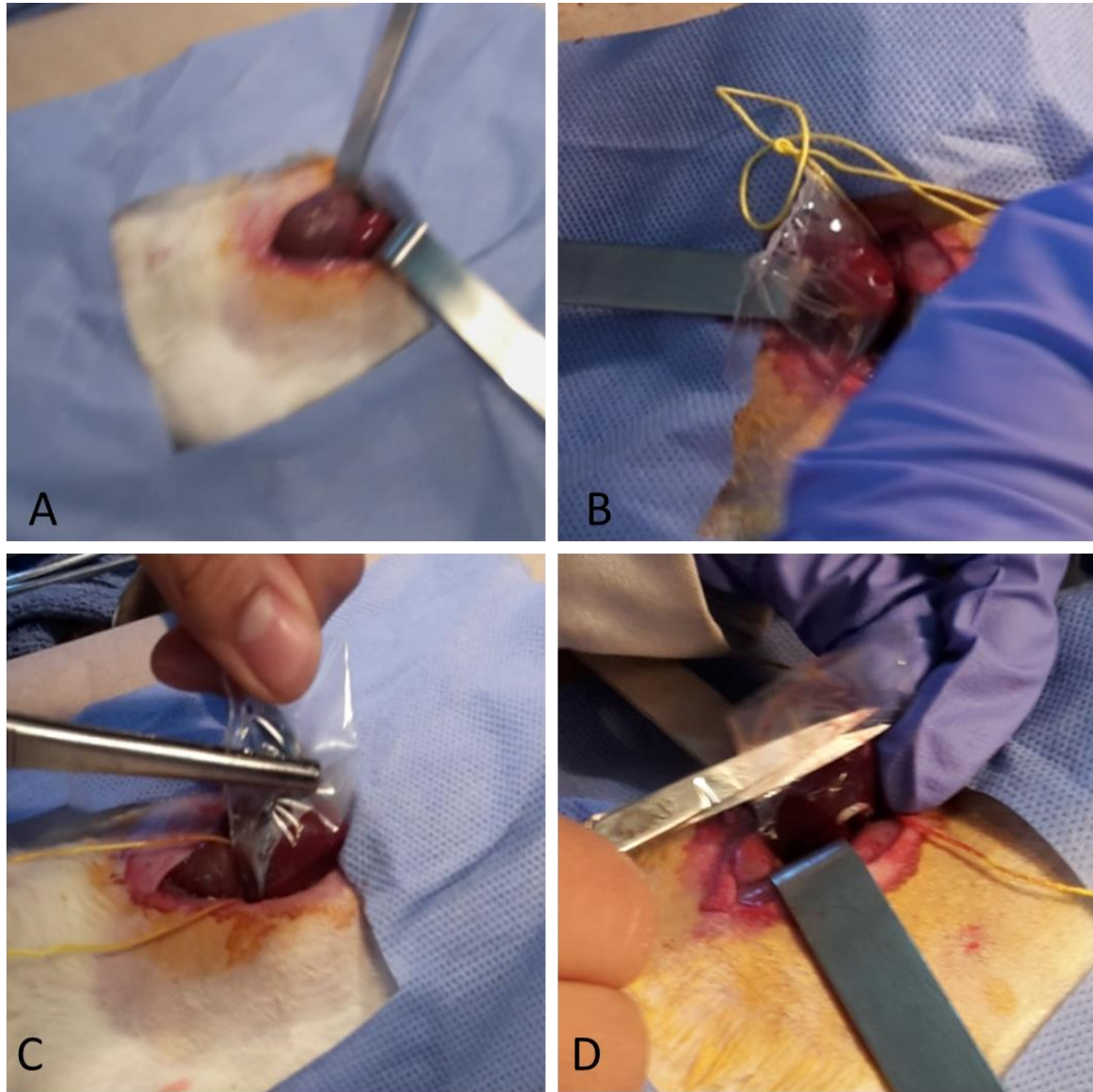


Figura 13. Colocación de la bolsa de celofán. **A.** El riñón aparece en la imagen situado a la derecha en tono rojo brillante. **B.** Colocación de la bolsa de papel celofán al riñón. **C.** Sellado de la envoltura de celofán. **D.** Corte del excedente de la envoltura de celofán.

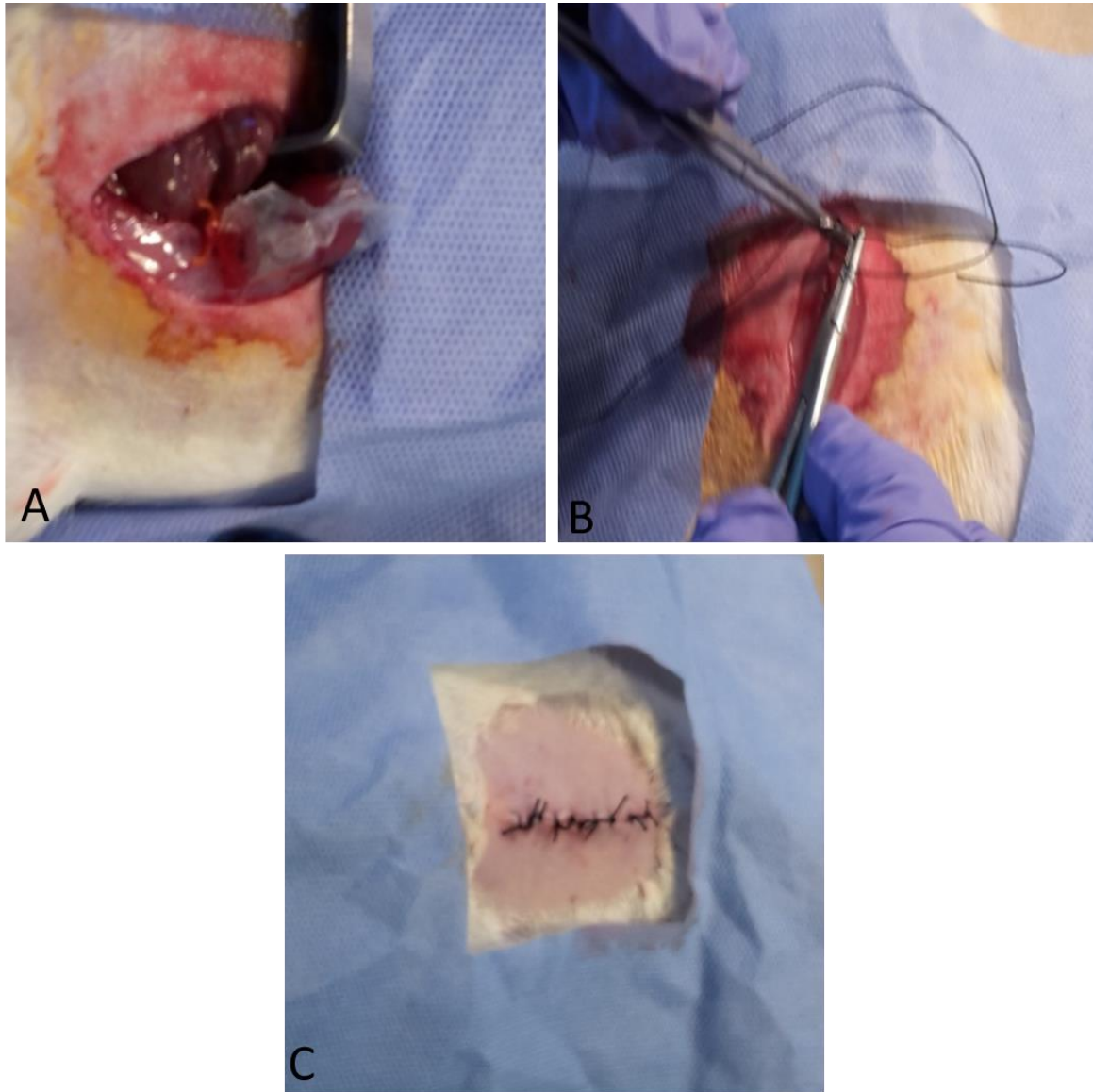


Figura 14. Procedimientos finales en la técnica de Page. A. Se regresa el riñón a la cavidad abdominal envuelto en celofán. **B.** Cierre de la pared de la cavidad abdominal utilizando puntos continuos en el plano muscular. **C.** Piel cerrada con puntos simples separados.

El estímulo mecánico persistente en el área peri-renal, genera una respuesta inflamatoria que más tarde formará una membrana de fibrina alrededor de cada riñón y ésta aumenta la presión intra-renal provocando un aumento en la resistencia de las arteriolas renales lo que provoca un aumento de la presión arterial sistémica al cabo de 5 días, pasando de 120/90 a 140-160 mm Hg, que se estabiliza en 8 días para mantenerse elevada hasta por un período de 2 a 3 meses dependiendo de la variabilidad biológica (54).

Para registrar la presión, se utiliza un baumanómetro conectado a un monitor de presión (Fig. 15.A). El animal se introduce en el contenedor (Fig. 15.B y C) y se coloca una tela para mantenerlo tranquilo. Se coloca el sensor en la cola para registrar la presión de la arteria caudal mediana (Fig. 15.D).

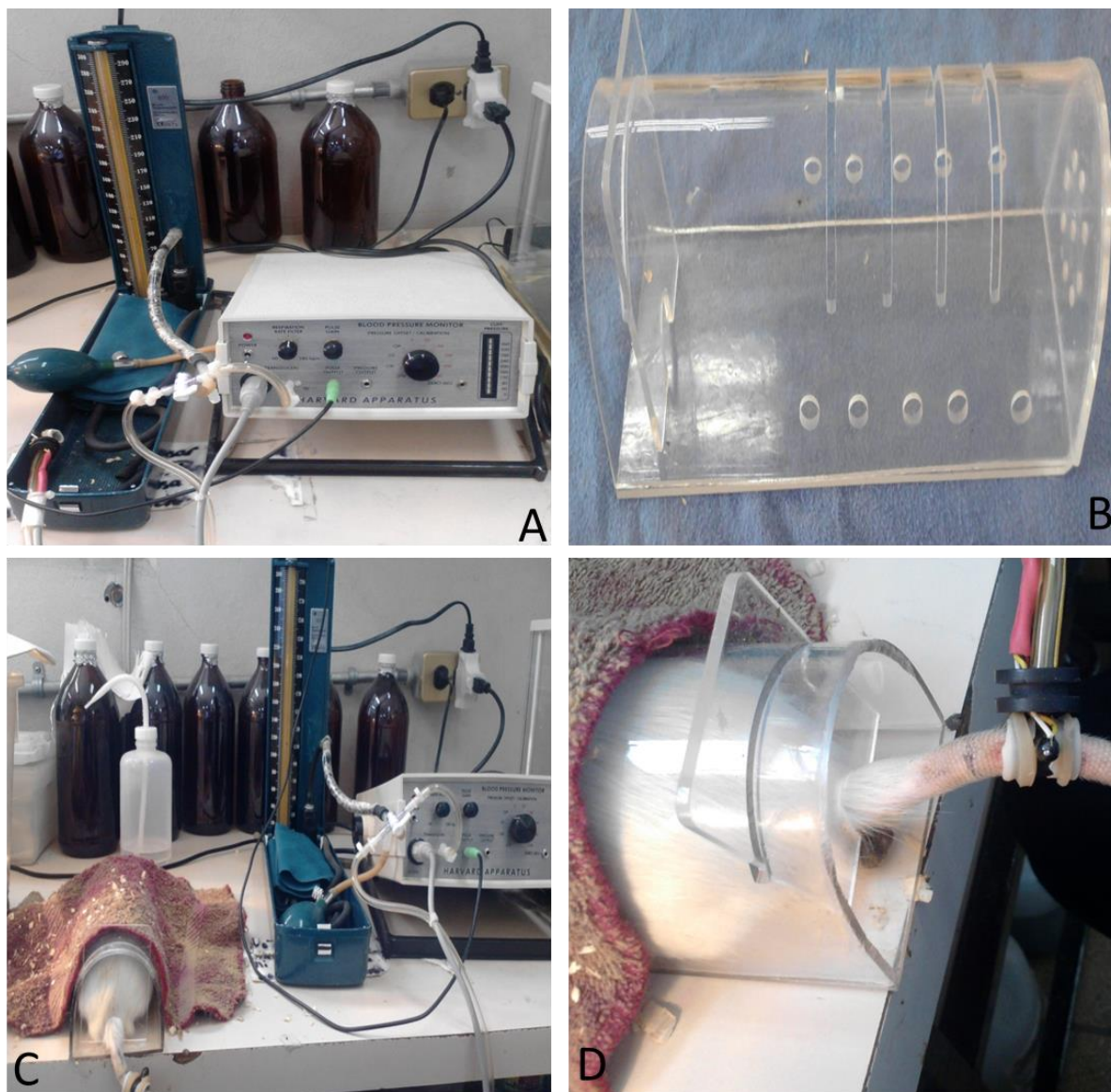


Figura 15. Equipo y procedimiento para la toma de presión arterial. A. Baumanómetro y monitor de presión. **B.** Contenedor para roedor. **C.** Animal dentro del contenedor y listo para realizar la toma de presión. **D.** Imagen cercana de la cola del roedor con el mango de toma de presión colocado.

ANÁLISIS Y DISCUSIÓN

El análisis y discusión se abordará mencionando y comentando algunas de las aplicaciones experimentales más representativas realizadas a través del uso de los modelos animales descritos.

En diversos estudios se han puesto a prueba diversos tratamientos para el accidente cerebrovascular que representa una causa importante de mortalidad y discapacidad en adultos (33, 36, 59). La gran mayoría de estos son de tipo isquémico y en humanos implica la oclusión de una arteria, comúnmente la arteria cerebral media (ACM) (1, 30). Este evento puede ser modelado en roedores haciendo avanzar un filamento de nylon por la arteria carótida común (ACC) y bloquear la ACM por un lapso de entre 60 a 90 minutos y, posteriormente, permitir la reperfusión. Así, por ejemplo, este modelo se ha empleado para estudiar el efecto de la isquemia y la reperfusión sobre el proceso de regeneración de las prolongaciones dendríticas de las neuronas (30).

Aunque en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para la lesión de isquemia / reperfusión cerebral (36), las investigaciones llevadas a cabo con los modelos animales en roedores siguen aportando valiosa información. Como en el estudio en que se ha observado que el receptor tipo Toll (TLR) media la respuesta inmune e inflamatoria durante el proceso de isquemia/reperfusión y la lesión resultante. De aquí que el objetivo resultante fue modular la actividad de dicho receptor para mejorar la supervivencia celular (36).

En otro enfoque, se utilizó el modelo de infarto-reperfusión en roedores con la aplicación de manera intermitente de cámara hiperbárica a aquellos animales que en primera instancia fueron sometidos a la oclusión de la arteria cerebral media por un lapso de 90 minutos. Los datos obtenidos señalan que con este tratamiento se atenúa la generación de radicales libres lo que se refleja en un menor daño celular. De esta manera se aceptó ampliamente que mejorar la oxigenación del tejido cerebral es una estrategia de tratamiento durante el accidente cerebrovascular (33).

El edema cerebral grave se produce en 1 a 5% de los pacientes con un infarto cerebral, el pronóstico es malo con mortalidad del 80% (23). No hay estrategias de tratamiento conservador. El tratamiento de cirugía descompresiva hecho en un modelo de rata demostró que este procedimiento reduce el volumen de infarto y mejora el flujo sanguíneo cerebral, cuando es realizado hasta 12 horas después de la oclusión de la arteria cerebral media (16, 23).

Los modelos animales de accidente cerebro-vascular trombótico son cada vez más importantes en la clínica básica y la preclínica, para el estudio de terapias potenciales (3), especialmente para aquellos que se tratan con trombolíticos y, más recientemente, con

anti-plaquetarios, ya que los trombos oclusivos de plaquetas son motivo de especial preocupación debido a que tienen poco o nada de fibrina. La prevención o eliminación de trombos de plaquetas atraen mucho el interés por lo que se están utilizando antagonistas e inhibidores de trombina para desestabilizar al fibrinógeno intraplaquetario presente en los enlaces entre la glucoproteína plaquetaria (59, 60).

Para esta patología, es común pensar, que es una enfermedad de gente adulta mayor, sin embargo, puede ocurrir en niños, aunque su incidencia se subestima, es por ello que se modeló éste estudio en ratas neonatales. Se observó edema citotóxico en la región isquémica, presente un poco después de la oclusión de la ACM y, fue seguido, por una lesión grave en la misma región, 24 horas después de la reperfusión. El núcleo isquémico fue rápidamente infiltrado por microglia reactiva y rodeado por astroglia reactiva, apoyando la noción de que tanto el episodio isquémico y la fase de reperfusión contribuyen a la lesión (12, 22).

Los radicales libres de oxígeno que se producen en condiciones patológicas como la isquemia / reperfusión o durante un derrame cerebral, juegan un papel crucial en la lesión exacerbando el daño de la membrana y la muerte neuronal (27, 25, 38, 62). Los tratamientos experimentales para tratar de remediar esto, son diversos y el uso de modelos en rata o ratón son esenciales. Se ha probado el uso de Edaravona, un eliminador de radicales libres, lo que también ha permitido que sea probado en condición de pre- o post-infarto (27, 32, 38). La Edaravona, puede atravesar la barrera hematoencefálica e interactuar con los radicales libres evitando su generación por inhibición de la peroxidación lipídica (42).

Los modelos de infarto miocárdico en roedor han permitido observar que, cuando la isquemia miocárdica sin reperfusión es severa hay necrosis de miocitos y disfunción cardíaca. Por desgracia, la reperfusión en sí puede contribuir a la lesión ya que desencadena una cascada de acontecimientos que incluyen la infiltración de neutrófilos, generación de radicales libres, liberación de citoquinas y más (3, 5, 43, 61). Se han puesto a prueba diversos tratamientos para evitar en lo posible estos daños, considerando que de por sí la lesión inicial resulta ser sumamente severa. Se han probado diversos compuestos, como la Aprotinina, un inhibidor de proteasas, con lo que se pretende limitar la lesión provocada por la cascada de enzimas generadas (5). En otro estudio se intentó controlar la inflamación con un bloqueador de la enzima convertidora de angiotensina, ya que se le ha relacionado con la liberación de monocitos del bazo que llegan a la zona de infarto. Estos promueven la eliminación de los desechos celulares y extracelulares a través de proteólisis y fagocitosis, sin embargo, la inflamación excesiva provoca un daño celular mayor, de aquí el interés por controlar el proceso inflamatorio (21, 29).

Los modelos de infarto y reperfusión en roedores también se han encaminado a lograr la inhibición de la renina. La cual, según los estudios, resulta perjudicial en caso de pacientes

hipertensos, ya que se le asocia con los eventos cardiovasculares ocurridos. El Aliskiren es el primer fármaco en actuar directamente en contra de la renina, es eficaz y ofrece beneficios en la enfermedad cardiovascular (61). El control del sistema renina-angiotensina, es importante ya que contribuye de manera significativa a disminuir las secuelas fisiopatológicas (39). Los bloqueadores de angiotensina II reducen la remodelación disfuncional del ventrículo izquierdo mejorando su función y la supervivencia. En tal caso, se estudia el efecto del tratamiento con Losartan (31), los resultados obtenidos han sido diversos y se continúa con el estudio para saber si se puede contemplar como una alternativa terapéutica. También se ha probado Omapratriat, un inhibidor de vasopresina, aquí se encontró una mejora en la remodelación y la hemodinámica cardíaca, lo cual es benéfico para la supervivencia (28).

Otras alternativas que están siendo estudiadas para la terapéutica y que se han probado en los modelos de infarto en isquemia-reperusión son; una píldora cardiotónica, la cual es un compuesto de la medicina china que protege contra las alteraciones de la microcirculación (63) y la identificación de citocinas que inducen la disfunción microvascular lo cual proporcionaría nuevas herramientas para poder limitar el daño miocárdico (6).

Durante la isquemia, se ha observado que la enzima óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), se activa para producir óxido nítrico (ON), provocando el agotamiento de L-arginina y tetrahidrobiopterina. Como consecuencia de la baja del sustrato y del cofactor, eNOS puede ser desacoplada y conducir a una alta producción de superóxido después de la reperusión y, en consecuencia, una alta producción de radicales libres y daño celular. De aquí que se estudie en modelos de rata la suplementación con albumina de suero humano en infusión intravenosa (51) o bien aplicando sólo ON en forma de gas (43) para tratar de revertir el daño post-isquemia (reperusión). En ambos estudios los resultados obtenidos mejoraron la condición (43, 51).

La respuesta inflamatoria temprana desempeña un papel importante en la isquemia miocárdica, en un modelo animal en ratones, se ha observado que hay reclutamiento de leucocitos mediado por el factor de von Willebrand (VWF) exacerbando la lesión. Por lo que si se encuentra la manera de controlar estos factores se puede originar una nueva estrategia terapéutica (42).

El uso del modelo de nefrectomía en 5/6 en roedores ha resultado esencial para estudiar diferentes aspectos de la fisiopatología de la IRC, así como algunas posibilidades terapéuticas encaminadas a tratar esta condición.

Durante la progresión de la IRC, en el modelo animal de estudio, se ha observado una disminución de los niveles de vitamina D3 en el suero, lo que repercute en la deficiencia del receptor de activación de vitamina D (VDR). Esto es un factor de riesgo para la disfunción endotelial, pues se sugiere que es modulador de las funciones cardiovasculares

y que la uremia afecta la expresión de ciertos genes ligados a la dinámica normal de la aorta. Para realizar un estudio en el cual se utilizaron diferentes agonistas de la vitamina D, se utilizó el modelo de nefrectomía de 5/6 en rata y los resultados demostraron que muchos de estos genes se normalizaron (57, 58).

Utilizando el modelo de 5/6, también se ha estudiado la calcificación vascular la cual representa en sí un estado de morbilidad y mortalidad en pacientes con IRC. La fisiopatología se asocia al metabolismo mineral (hiperfosfatemia, hiperparatiroidismo, hipercalcemia y la deficiencia de vitamina D). Los modelos animales, por lo tanto, nos permiten evaluar dentro de un entorno controlado las observaciones clínicas realizadas en seres humanos que permitirán entender mejor los contribuyentes y la importancia biológica de la calcificación vascular (44).

Con los modelos de 5/6 se han logrado monitorear una serie de parámetros de suma importancia para la comprensión de la IRC. Los aspectos que se midieron después de la cirugía son: concentración plasmática de creatinina y urea, presión arterial, frecuencia cardíaca en reposo, respuesta a la atropina, peso de ventrículos, etc. Se encontró aumento de las concentraciones séricas de creatinina y urea, disminución en la depuración de creatinina, poliuria y alteración del tejido remanente. También se encontraron cambios en parámetros cardiovasculares, como; hipertensión, elevada frecuencia cardíaca en reposo, hipertrofia de ventrículo izquierdo asociada con debilidad de contracción, etc. Todos estos datos sugieren que el modelo de nefrectomía en 5/6 puede ser una herramienta útil para el estudio de IRC y sus complicaciones cardiovasculares (50, 57).

El deterioro morfológico y funcional del miocardio resultado de IRC, se llama cardiopatía urémica y se caracteriza por hipertrofia ventricular izquierda asociada con disfunción sistólica y diastólica. El deterioro conduce a una disminución de la contractibilidad cardíaca y disminución en el gasto por función ventricular izquierda ineficiente.

Los factores que contribuyen a la patogénesis de la cardiopatía urémica son hemodinámicos (presión, sobrecarga de presión debido a la hipertensión, aterosclerosis y la sobrecarga de volumen causada por agua y retención de sodio) y no hemodinámicos o metabólicos (activación de sistema renina-angiotensina, isquemia, desequilibrio electrolítico, el efecto de las toxinas urémicas, etc.) (2, 9, 44, 50, 52, 58).

Como se puede apreciar, los modelos animales tienen un amplio panorama de aplicaciones en relación con los accidentes cardiovasculares y producto de esto, resulta preponderante el papel que están desempeñando en la investigación biomédica básica por lo que es un campo fértil donde el médico veterinario zootecnista profesional puede participar e incidir de manera determinante en la implementación de nuevos modelos.

CONCLUSIONES

- Para tener una mejor comprensión de los padecimientos cardiovasculares la investigación con modelos animales es una pieza fundamental en el desarrollo de la medicina.
- El desarrollo de modelos biológico cardiovasculares ha permitido avances importantes en la comprensión e implementación de tratamientos novedosos que podrían mejorar las probabilidades de vida y aminorar las secuelas de este tipo de padecimientos en el humano.
- La utilización de los roedores como la rata y el ratón ofrecen grandes ventajas de tal manera que son un modelo animal idóneo para la investigación biomédica por lo que son frecuentemente requeridos.
- La participación del Médico Veterinario Zootecnista profesional es importante en la investigación biomédica básica en la cual se requiere el uso de especímenes vivos.
- Contar con la literatura, suficiente, adecuada y actualizada brinda las bases necesarias para desarrollar con mayor certeza nuevos modelos animales.
- Esta revisión busca ser una fuente de información que permita difundir el conocimiento existente en esta área y despertar el interés del MVZ por desarrollarse en este campo profesional.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Arnberg F, Lundberg J, Söderman M, Damberg P, Holmin S. 2012. Imagen-Guided method in Rat for inducing cortical or striatal infarction and for controlling cerebral blood flow under MRI. *Stroke*, 43: 2437-2443.
- 2) Barret K, Barman S, Boitano S, Brooks H. 2010. *Ganong Fisiología Médica*. 23ª edición. México. Editorial El Manual Moderno.
- 3) Berny-Lang MA, Hurts S, Tucker E, Pelc LA, Wang RK, Hurn PD. 2011. Thrombin mutant W215A/E217A treatment improves neurological outcome and reduces cerebral infarct size in a mouse model of ischemic stroke. *Stroke*, 42: 1756-1741.
- 4) Bhushan S, Kondo K, Predmore BL, Zlatopolsky M, King AL, Pearce C. 2012. Selective B-Adrenoreceptor stimulation attenuates myocardial cell death and preserves cardiac function after ischemia-reperfusion injury. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 32: 1865-1874.
- 5) Buerke M, Pruefer D, Sankat D, Carter JM, Buerke U, Russ M. 2007. Effects of Aprotinin on gene expression and protein synthesis after ischemia and reperfusion in rats. *Circulation*, 116 [suppl. 1]: 121-I-126.
- 6) Burke Allen P. y Virmoni Renu. 2007. *Fisiopatología de Infarto Agudo de Miocardio*. *Med. Clin. N. AM.*, 91: 553-557.
- 7) Chinda K, Sanit J, Chattipakorn S, Chattipakorn N. 2014. Dipeptidyl peptidase-4 inhibitor reduces infarct size and preserves cardiac function via mitochondrial protection in ischemia-reperfusion rat heart. *Diabetes Vascular Disease Research*, Vol. 11 (2): 75-83.
- 8) Christian P, Bujak M, Gonzalez C, Chen W, Reddy, Dobaczewski M. 2013. Systematic characterization of Myocardial Inflammation, Repair and Remodeling in a mouse of Reperfused Myocardial Infarction. *Journal of Histochemistry Cytochemistry*, 61 (8): 555-570.
- 9) Conn P. Michael. 2013. *Animal Models for the Studio of Human Disease*. Editorial Elsevier.
- 10) Cuellas RC, Pérez PA, Pérez MC, Nieto DA, Orden JA, Fernández VF. 2004. Investigación traslacional en isquemia, infarto de miocardio y reperfusión. Universidad de León, León, España: Ibiomed
- 11) Dai W, Herring MJ, Hale SL, Kloner RA. 2015. Rapid surface cooling by ThermoSuit system dramatically reduces scar size prevents post-infarction adverse left ventricular remodeling and improves cardiac function in rats. *J. Am. Heart Assoc.*, 4: e0002265.
- 12) Diang Y. 2000. Evolution a brain injury after transient middle cerebral artery occlusion in neonatal rats. *Stroke*, 31: 1752-1761.

- 13) Ding Y, Li J, Rafols JA, Phillis JW, Díaz F. 2002. Prereperfusion Saline infusion into ischemic territory reduces inflammatory injury after transiente middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke*, 33: 2492-2498.
- 14) Doerfler A, Schwab S, Hoffmann T, Engelhorn T, Forsting M. 2001. Combination of decompressive craniectomy and mild hypothermia ameliorates infarction volume after permanent focal ischemia in rats. *Stroke*, 32: 2675-2681.
- 15) Dyce, Sack, Wensing. 1998. *Textbook of veterinary anatomy*. Philadelphia. USA: WB Saunders.
- 16) Engelhorn T, Kummer R, Reith W, Forsting M, Doerfler A. 2002. What is effective in malignant middle cerebral artery infarction-reperfusion craniotomy or both? An experimental study in rats. *Stroke*, 33: 617-622.
- 17) Fish RE, Bown M, Danneman P, Kovos A. 2008. *Anesthesia and Analgesia in Laboratory Animal*. 2a edición. American College of Laboratory.
- 18) Gao E, Hong Y, Shang X, Huang M, Zuo L, Boucher M, Fan Q, Chuprun K. 2010. A novel and efficient model coronary artery ligation and myocardial infarction in the mouse. *Circ Res*, 107: 1445-1453.
- 19) Gerriets T, Stolz E, Walberer M, Muller C, Rottger C, Kluge A, Kaps M. 2004. Complication and Pitfalls in Rat stroke models for middle cerebral artery occlusion. A comparison between the suture and the macrosphere model using magnetic resonance angiography. *Stroke*, 35: 2372-2377.
- 20) Getty R. 1982. *Anatomía de los animales domésticos de Sisson y Grossman*. Vol. II. 5a edición. Barcelona, España: Editorial Salvat.
- 21) Halade G, Yonggang M, Gao E, Zhang J, Myers V, Zincarelli C, Lei Y, Song J. 2013. Reduced BDNF attenuates inflammation and angiogenesis to improve survival and cardiac function following myocardial infarction in mice. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 305: H1830-H1842.
- 22) Hochrainer K, Jackman K, Anrather J, Iadecola C. 2012. Reperfusion rather than ischemia drives the formation of Ubiquitin aggregates after middle cerebral artery occlusion. *Stroke*, 43: 2229-2235.
- 23) Hofmeijer J, Schepers J, Veldhuis WB, Nicolay K, Kappelle LJ. 2004. Delayed descompressive surgery increases apparent diffusion coefficient and improves peri-infarct perfusion in rats with space-occupying cerebral infarction. *Stroke*, 35: 1476-1481.
- 24) Jokivarsi Kimmo T. y col. 2010. Estimation of the onset time of cerebral ischemia using T1 and MRI in Rats. *Stroke*, 41: 2335-2340.
- 25) Kamada Hisoshi y col. 2007. Influence of hyperglycemia on oxidative stress and matrix Metalloproteinase-9 activation after focal/cerebral ischemia/reperfusion in rats. Relation to blood-brain barrier dysfunction. *Stroke*, 38: 1044-1049.

- 26) Kato B, Nozawa T, Igarashi N, Nonomura M, Fujii N, Igawa A. 2004. Discrepant recovery course of sympathetic neuronal function and adrenoceptors in rat heart after reperfusion following transient ischemia. *J. Nucl. Med.*, 45: 1074-1080.
- 27) Kikuchi K, Kawahara K, Tancharoen S, Matsuda F, Morimoto Y, Ito T. 2009. The free Radical scavenger Edaravone rescues rats from cerebral infarction by attenuating the release of high-morbidity group box-1 in neuronal cells. *J. PET*, 329: 865-874.
- 28) Lapointe N, Kishimoto I, Schwenke D, Tokudome T, Horio T, Yoshida M. 2003. Effects of pre-, peri-, and postmyocardial infarction treatment with omapatrilat in rats; survival, arrhythmias ventricular function and remodeling. *Am. J. Physiol heart Circ Physiol*, 285: H398-H405.
- 29) Leuschner F, Panizzi P, Calero I, Lee W, Ueno T, Waterman P, Retamozo. 2010. Angiotensin-Converting enzyme inhibition prevents the release of monocytes from their splenic reservoir in mice with myocardial infarction. *Circ Res*, 107: 1364-1373.
- 30) Li P, Murphy T. 2008. Development/Plasticity/Repair two-photon imaging during prolonged middle cerebral artery occlusion in mice reveals recovery of dendritic structure after reperfusion. *The Journal of Neuroscience*, November 12, 28 (46): 11970-11979.
- 31) Li Z, Liu B, Yu J, Yang F, Luo YN. 2012. Ischemia postconditioning rescues brain injury caused by focal ischemia/reperfusion via attenuation of protein oxidization. *The Journal of International Medical Research*, 40: 954-966.
- 32) Lin T, Sun SW, Cheung WM, Li F, Chang Ch. 2002. Dynamic changes in cerebral blood flow and angiogenesis after transient focal cerebral ischemia in rat evaluation with serial magnetic resonance imaging. *Stroke*, 33: 2985-2991.
- 33) Liu Ch, Weaver J, Liu KJ. 2012. Rapid conditioning with oxygen oscillation neuroprotection by intermittent normobaric hyperoxia after transient focal cerebral ischemia in rat. *Stroke*, 43: 220-226.
- 34) Liu Z, Kastis G, Stevenson G, Barret H, Furenid L, Kupinski M. 2002. Quantitative analysis of acute myocardial infarct in rat hearts with ischemia-reperfusion using a high-resolution stationary SPECT system. *J. Nucl. Med*, 43: 933-939.
- 35) Loubopoulos A, Grigoriadis N, Karacostas D, Spandou E, Artemis N. 2010. Predictable ventricular shift after focal cerebral ischaemia in rats. Practical considerations for intraventricular therapeutic interventions. *Laboratory Animals*, 44: 71-78.
- 36) Lu C, Ha T, Liu L, Zhang X, Kimbrough E, Sha Z, Guan M, Schweitzer. 2014. The TLR9 ligand, CpG_OND induces protection against cerebral ischemia/reperfusion injury via activation of P13K/Akt signaling. *J. Am. Heart Assoc.*, 3: e000629.
- 37) Lujan Heidi L. y DiCarlo Stephen E. 2013. Cardiac output at rest and during exercise before and during myocardial ischemia-reperfusion and infarction in conscious mice. *Am. J. Physiol regular Integr Comp Physiol*, 304: R286-R295.

- 38) Manee MJ, Hannah R, Vitullo L, Delance N, Cipolla M. 2006. Peroxynitrite diminishes myogenic activity and is associate with decreased vascular smooth muscle F-Actin in rat posterior cerebral arteries. *Stroke*, 37: 894-899.
- 39) Mann S, bajulaiye A, Sturgeon K, Sabri A, Muthukumaran G, Libonati J. 2015. Effects of acute angiotensin II on ischemia reperfusion injury following myocardial infarction. *Journal of the Renin-Angiotensin–Aldosterone System*, Vol. 16 (1): 13-22.
- 40) Phillips JB, Williams A, Adams J, Elliot P, Tortella F. 2000. Proteasome inhibitor PS519 reduces infarction and attenuates leukocyte infiltration in a rat model of focal cerebral ischemia. *Stroke*, 31: 1686-1693.
- 41) Pourdjabbar A, Parker T, Nguyen QT, Desjardins JF, Lapointe N. 2005. Effects of pre, peri and postmyocardial infarction treatment with losartan in rats; effect of dose on survival ventricular arrhythmias function and remodeling. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 288: H1997-H2005.
- 42) Savchenko AS, Borissoff J, Martinod K, De Meyer S, Gallant M, Erpenbeck L. 2014. VWT-mediate leukocyte recruitment with chromatin decondensatio by PAD4 increases myocardial ischemia/reperfusion injury in mice. *Blood*, 123 (1): 141-148.
- 43) Shinbo T, Kokubo K, Sato Y, Hagiri S, Hataishi R, Hirose M, Kobayashi H. 2013. Breathing nitric oxide plus hydrogen gas reduces ischemia-reperfusion injury and nitrotyrosine production in murine heart. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol*, 305: H542-H550.
- 44) Shobeiri N, Adams AM, Horden RM. 2010. Vascular calcification in animal models of CKD: A Review. *Am. J. Nephrol*, 31: 471-481.
- 45) Sivaraman Virek y Yellon Derek M. 2014. Pharmacologic therapy that simulates conditioning for cardiac ischemic/reperfusion injury. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, Vol. 19 (1): 83-96.
- 46) Skrzypiec M, Grotthus B, Szelag A, Schulz R. 2007. Isolate heart perfusion according to Langerdoff-Still viable in the new millennium. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods*, 55: 113-126.
- 47) Soeki T, Kishimoto I, Schwenke D, Tokudome T, Yoshida M, Hosoda H. 2008. Ghrelin suppresses cardiac sympathetic activity and prevents early left ventricular remodeling in rats with myocardial infarction. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 294: H426-H432.
- 48) Sumano-Ocampo. 1999. *Farmacología Veterinaria*. 2a edición. México, Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- 49) Sumida A, Horiba M, Ishiguro H, Takenaka H, Ueda N, Ooboshi H, Ophosf T. 2010. Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodelling and ameliorates cardiac dysfunction. *Cardiovascular Research*, 86: 113-121.

- 50) Svirglerova J, Kuncoval J, Nalosi L, Tonar Z, Rajdi D, Stengl M. 2010. Cardiovascular parameters in rat model of chronic renal failure induced by subtotal nephrectomy. *Physiol Res.*, 59 (suppl 1): 581-588.
- 51) Treschera K, Dzilibic E, Kreibich M, Gasserb H, Aumayrc K, Kerjaschkit D. 2015. The nitric oxide donor S-nitroso human serum albumin as an adjunct to HTK-N cardioplegia improves protection during cardioplegic arrest after myocardial infarction in rats. *Interactive Cardiovascular and Thoracic Surgery*, 20: 387-394.
- 52) Trigo Tavera Francisco J. 1993. *Patología General Veterinaria*. 2ª edición. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- 53) Trigo Tavera Francisco J. 1998. *Patología Sistémica Veterinaria*. 3a edición. México: Editorial McGraw-Hill Interamericana.
- 54) Venegas V, Ferrebuz A, Quiroz Y, Rodriguez B. 2005. Hypertension in Page (cellophane-wrapped) kidney is due to interstitial nephritis. *Kidney int.*, 68: 1167-1170.
- 55) Vuohelainen V, Hamalainen M, Paavonenc T, Karisson S, Moilanen E, Mennander A. 2015. Inhibition of monoamine oxidase A increases recovery after experimental cardiac arrest. *Interact CardioVasc Thorac Surg.*, doi: 10.1093/icvts/ivv175: 1-9.
- 56) Wu-Wong J, Li X, Chen Y. 2015. Different vitamin D receptor agonists exhibit differential effects on endothelial function and aortic gene expression in 5/6 nephrectomized rats. *Journal of Steroid Biochemistry-Molecular Biology*, 148: 202-209.
- 57) Wu-wong R, Li X, Chen Yw. 2015. Different vitamin D receptor agonists exhibit differential effects on endothelial function and aortic gene expression in 5/6 nephrectomized. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology*, 148: 202-209.
- 58) Zechariah A, ElAli A, Hermann DM. 2010. Combination of Tissue-Plasminogen Activator with Erythropoietin Induces Blood-Brain Barrier Permeability Extracellular Matrix Disaggregation and DNA Fragmentation After Focal Cerebral Ischemia in Mice. *Stroke*, 41: 1008-12.
- 59) Zhang L, Chopp M, Teng H, Ding G, Jiang Q, Yang XP, Rhaleb N, Zhang Z. 2014. Combination Treatment with N-Acetyl-Seryl-Aspartyl-Lysyl-Proline and Tissue Plasminogen Activator Provides Potent Neuroprotection in Rats After Stroke. *Stroke*, 45: 1108-1114.
- 60) Zhang L, Zheng ZG, Zhang RL, Lu M, Adams J, Elliot P, Chopp M. 2001. Postischemic (6-hour) treatment with recombinant human tissue plasminogen activator and proteasome inhibitor PS-519 reduce infarction in a rat model of embolic focal cerebral ischemia. *Stroke*, 32: 2926-2931.
- 61) Zhang W, Han Y, Meng G, Bai W, Xie L, Lu H, Shao Y. 2014. Direct renin inhibition with Aliskiren protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by activating nitric oxide synthase signaling in spontaneously hypertensive rats. *J. Am. Heart Assoc.*, 3: E000606.

- 62) Zhao H, Wang R, Tao Z, Gao L, Yan F, Gao Z, Liu Z. 2014. Ischemic Postconditioning relieves cerebral ischemia and reperfusion injury. Through activation T-LAK cell originated protein kinasa / protein kinasa B pathway in rat. *Stroke*, 45: 2417-2424.
- 63) Zhao N, Liu X, Wang F, Hu BH, Sun K, Chang X, Pan CS, Fan JY. 2010. Cardiotonic pills, a compound Chinese medicine protects ischemia-reperfusion induced microcirculatory disturbance and myocardial damage in rats. *Am. J. Physiol Heart Circ Physiol*, 298: H1166-H1176.
- 64) Zhou F, Guo J, Cheng J, Wu G, Xin Y. 2011. Electroacupuncture increased cerebral blood flow and reduced ischemic brain injury; dependence on stimulation intensity and frequency. *J. Appl Physiol*, 111: 1877-1887.