



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E
INVESTIGACIÓN.



**“Efecto de la terapia de oxigenación hiperbárica y
nitroglicerina sobre la expresión de factores
proangiogénicos en un modelo experimental de infarto al
miocardio sin reperfusión en rata.”**

TESIS

Para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN FARMACOLOGÍA.

Presenta:

LUIS ALBERTO GUTIÉRREZ MARTÍNEZ

Directores de Tesis:

D. en C. ENRIQUE FERNANDO CASTILLO HENKEL

D. en C. GUSTAVO GUEVARA BALCÁZAR

MÉXICO, CIUDAD DE MÉXICO, NOVIEMBRE DEL 2018



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REGISTRO DE TEMA DE TESIS
Y DESIGNACIÓN DE DIRECTORES DE TESIS

Ciudad de México, a 15 de noviembre de 2018

El Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la E.S.M. En su sesión ordinaria No. 11 celebrada el día 07 del mes de noviembre de 2018 conoció la solicitud presentada por el alumno:

Gutiérrez
Apellido paterno

Martínez
Apellido materno

Luis Alberto
Nombre (s)

Con registro:

A	1	7	0	5	1	8
---	---	---	---	---	---	---

Aspirante de la: Maestría en Ciencias en Farmacología

- 1.- Se designa al aspirante el tema de tesis titulado:
"EFECTO DE LA TERAPIA DE OXIGENACIÓN HIPERBARICA Y NITROGLICERINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES PROANGIOGÉNICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO AL MIOCARDIO SIN REPERFUSIÓN EN RATA"

De manera general el tema abarcará los siguientes aspectos:

Resumen (versión español e inglés), Introducción (Antecedentes, Justificación y Objetivos),
Material y Métodos, Resultados, Análisis, Conclusiones y Bibliografía

- 2.- Se designan como Directores de Tesis a los Profesores:
Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel y el Dr. Gustavo Guevara Balcázar

- 3.- El trabajo de investigación base para el desarrollo de la tesis será elaborado por el alumno en:
el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular,
que cuenta con los recursos e infraestructura necesarios.

- 4.- El interesado deberá asistir a los seminarios desarrollados en el área de adscripción del trabajo desde la fecha en que se suscribe la presente hasta la aceptación de la tesis por la Comisión Revisora correspondiente:

Directores de Tesis

Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel

Dr. Gustavo Guevara Balcázar

Aspirante

Luis Alberto Gutiérrez Martínez

Presidente del Colegio

Dr. Angel Ivan Orlando Rubio Gayoso

FACULTAD DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

SIP-14-BIS

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de México siendo las 13:00 horas del día 12 del mes de noviembre del 2018 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de Tesis designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de la Escuela Superior de Medicina para examinar la tesis titulada:

“EFECTO DE LA TERAPIA DE OXIGENACIÓN HIPERBARICA Y NITROGLICERINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES PROANGIOGÉNICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO AL MIOCARDIO SIN REPERFUSIÓN EN RATA”

Presentada por el alumno:

Gutiérrez
Apellido paterno

Martínez
Apellido materno

Luis Alberto
Nombre(s)

Con registro:

A	1	7	0	5	1	8
---	---	---	---	---	---	---

aspirante de la:

Maestría en Ciencias en Farmacología

Después de intercambiar opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron *APROBAR LA DEFENSA DE LA TESIS*, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA

Directores de tesis

Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel

Dr. Pedro López Sánchez

Dr. Gustavo Guevara Balcázar

Dra. María del Carmen Castillo Hernández

Dra. Ruth Mery López Mayorga

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES

Dr. Angel Ivan Orlando Rubio Gayosso I.R.M.
SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
MEXICO, D.F.
ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
SECCION DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACION



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, el día 12 del mes noviembre del año 2018, el que suscribe **Luis Alberto Gutiérrez Martínez** alumno del Programa de **Maestría en Ciencias en Farmacología** con número de registro **A170518**, adscrito a la **Escuela Superior de Medicina**, manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del **Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel** y el **Dr. Gustavo Guevara Balcázar** cede los derechos del trabajo titulado **"EFECTO DE LA TERAPIA DE OXIGENACIÓN HIPERBARICA Y NITROGLICERINA SOBRE LA EXPRESIÓN DE FACTORES PROANGIOGÉNICOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL DE INFARTO AL MIOCARDIO SIN REPERFUSIÓN EN RATA"**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección **centinela_star@hotmail.com**, si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Luis Alberto Gutiérrez Martínez

Este trabajo fue realizado en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental perteneciente a Sección de Estudios de Posgrado e Investigación (SEPI) de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN) bajo la Dirección del Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel y el Dr. Gustavo Guevara Balcázar.

Agradecimientos:

A Dios.

A la vida.

A mis padres, Alberto Gutiérrez Marino y María Luisa Martínez Alejos por su constante apoyo y cariño incondicional, siempre impulsándome a alcanzar mis objetivos.

Al amor de mi vida.

A mis tutores, el Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel y el Dr. Gustavo Guevara Balcázar por darme la oportunidad de trabajar con ellos y brindarme siempre todo su apoyo, tanto para el proyecto como para mi persona.

A la Dra. María del Carmen Castillo Hernández, la Dra. Ruth Mery López Mayorga, el Dr. Pedro López Sánchez, la Dra. Liliana Anguiano Robledo y la Dra. Jcela Palma Lara, ya que ellos fueron parte esencial en la generación de mi gran amor por la investigación y grandes ejemplos a seguir.

A todos los maestros que han contribuido en mi crecimiento personal y profesional.

A todos los que contribuyeron con la realización de este proyecto, porque sin ustedes, nada de esto habría sido posible.

Mil gracias.

ÍNDICE

Índice de Figuras y Tablas	1
Glosario.....	5
Abreviaturas	8
Resumen.....	10
Abstract.....	12
1. Introducción.....	14
2. Antecedentes.....	16
2.1. Definición y clasificación de la enfermedad isquémica del corazón.....	18
2.2. Epidemiología y factores de riesgo de las enfermedades cardiovasculares en el Mundo.....	17
2.3. Epidemiología de las enfermedades cardiovasculares en México.....	18
2.4. Tratamiento y Problemática del IAM.....	18
2.5. Alternativas terapéuticas en el IAM.....	21
2.6. Fisiopatología del Infarto Cardíaco y sus Fases Reparación.....	22
2.7. Angiogénesis en el Infarto Agudo al Miocardio.....	24
2.7.1. Vías angiogénicas y su rol en la angiogénesis cardiaca tras IAM	
2.8. Factores de Crecimiento Implicados en la Reparación Cardíaca.....	28
2.9. Sintomas de Óxido Nítrico (NOS) y Óxido Nítrico (ON), su importancia en la reparación cardiaca.....	29
2.10 Señalización Redox entre Células Cardíacas, Importancia de NADPH oxidasas.....	33
2.11 Terapia de Oxigenación hiperbárica (HBO).....	36
2.12 HBO en el IAM.....	39
2.13 Nitroglicerina en el IAM.....	40
3. Planteamiento del problema.....	42
4. Justificación.....	42
5. Pregunta de investigación	43
6. Hipótesis.....	43
7. Objetivos	43
7.1. Objetivo General	
7.2. Objetivos Específicos	
8. Material y Métodos	44

8.1. Tipo de estudio.....	44
8.2. Modelo y diseño experimental.....	44
8.2.1. Animales.....	44
8.2.2. Formación de grupos.....	45
8.2.3. Modelo de infarto agudo al miocardio.....	46
8.2.4. Esquema de administración del parche de liberación prolongada de nitroglicerina.....	47
8.2.5. Terapia con HBO.....	48
8.2.6. Eutanasia.....	49
8.2.7. Medición de variables experimentales.....	49
8.3. Diagrama de flujo.....	51
8.4. Variables.....	51
8.5. Análisis Estadístico.....	52
8.6. Consideraciones ética.....	52
9. Resultados.....	53
10. Discusiones.....	78
11. Conclusiones.....	85
12. Perspectivas.....	85
13. Bibliografía.....	87
14. Anexos.....	91
13.1. CICUAL.....	91
13.2. Protocolo para la realización de las inmunohistoquímicas.....	92

ÍNDICE DE FIGURAS, TABLAS Y GRÁFICAS.

FIGURAS

Figura 1. Clasificación de la enfermedad isquémica del corazón.....	16
Figura 2. Manejo prehospitalario y hospitalario, y estrategias de reperfusión dentro de las primeras 24 h del primer contacto médico.....	19
Figura 3. Componentes del retraso en el tratamiento del infarto miocárdico agudo e intervalos ideales para la intervención.....	20
Figura 4. Alternativas terapéuticas para el IAM - cortesía del laboratorio de farmacología cardiovascular.....	21
Figura 5. Fases de la reparación cardíaca.....	23
Figura 6. Ilustración de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos determinantes de la angiogénesis miocárdica secundaria a la isquemia.....	25
Figura 7. Modificaciones post-traduccionales dependientes del oxígeno de los niveles de HIF-1 α	26
Figura 8. Formación de plexos vasculares.....	27
Figura 9. Familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus vías de señalización.....	29
Figura 10. Prototipo de la vía de señalización angiogénica relacionada con la producción de Óxido Nítrico (ON) endógeno y la subsecuente activación de la cascada de cinasas.....	31
Figura 11. Estímulos activadores de la vía de señalización dependiente de PKA regulando el crecimiento vascular, PKA interactúa con otras vías intracelulares como Akt y AMPK, convergiendo en la activación de eNOS.....	32
Figura 12. Interacciones de ROS derivados de Nox en el balance nitroso-redox. H ₂ O ₂ derivado de Nox-4 puede incrementar la producción de ON, por otro lado, la producción de O ₂ ⁻ por Nox 2 reacciona con ON para generar peroxinitrito (ONOO ⁻) y reduce la viabilidad del ON.....	35
Figura 13. Vías aceptadas y validadas experimentalmente de la coordinación regulada por Redox de la hipertrofia del cardiomiocito y angiogénesis en el corazón	

sometido a estrés.....	36
Figura 14. Cámara hiperbárica gigante de acero del hotel Cunningham.....	36
Figura 15. Grupos de experimentación.....	45
Figura 16. Cámara Hiperbárica Experimental del Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental ESM-IPN.....	48
Figura 17. Diagrama de flujo	50
Figura 18. Comparacion macroscópica de los corazones de los grupos control y sham.....	53
Figura 19. Comparacion macroscópica de los corazones control IAM y los que recibieron tratamiento.....	54
Figura 20. Cortes de corazón Post-IAM control y que recibieron tratamiento, teñidos con trifeniltetrazolium.....	55
Figura 21. Imágenes microscópicas de corazones del grupo Sham sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34.....	58
Figura 22. Imágenes microscópicas de corazones del grupo control IAM sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34.....	59
Figura 23. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+HBO sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34.....	60
Figura 24. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+NTG sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34.....	60
Figura 25. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+NTG+HBO sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34.....	60
Figura 26. Imágenes microscópicas de corazones del grupo Sham sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2.....	64
Figura 27. Imágenes microscópicas de corazones del grupo control IAM sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2.....	65
Figura 28. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+HBO sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2.....	66
Figura 29. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+NTG sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2.....	67
Figura 30. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+HBO+BTG	

sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2.....	68
Figura 31. Imágenes microscópicas de corazones del grupo Sham sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2.....	71
Figura 32. Imágenes microscópicas de corazones del grupo control IAM sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2.....	72
Figura 33. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+HBO sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2.....	73
Figura 34. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+NTG sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2.....	74
Figura 35. Imágenes microscópicas de corazones del grupo IAM+NTG+HBO sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2.....	75

TABLAS

Tabla 1. Definición universal del IAM.....	17
Tabla 2. Principales causas de mortalidad en México 2015.....	18
Tabla 3. Angioplastia vs Fibrinólisis.....	20
Tabla 4. Contraindicaciones de la terapia fibrinolítica.....	22
Tabla 5. Variables experimentales.....	51
Tabla 6. Comparacion del % del IAM entre los grupos de estudio.....	55
Tabla 7. Analisis Post-Hoc del % de infarto.....	57
Tabla 8. Analisis estadístico del conteo de células CD34+.....	62
Tabla 9. Analisis Post-Hoc del conteo de células CD34+.....	63
Tabla 10. Analisis estadístico del conteo de brotes vasculares VEGFR-2.....	69
Tabla 11. Analisis Post-Hoc del conteo de brotes vasculares VEGFR-2.....	70
Tabla 12. Analisis estadístico del conteo de células ERK1/2+.....	76
Tabla 13. Analisis Post-Hoc del conteo de células ERK1/2+.....	77

GRÁFICAS

Gráfica 1. Comparacion del % de área miocadica infartada.....	56
Gráfica 2. Comparacion del conteo de células CD34+.....	62
Gráfica 3. Comparacion del conteo de brotes vasculares VEGFR-2.....	69
Gráfica 4. Comparacion del conteo de células ERK1/2+.....	76

GLOSARIO (En orden alfabético)

Aurícula derecha. Cámara del corazón a la que habitualmente llegan las venas cavas (superior e inferior) y que morfológicamente se caracteriza por tener un apéndice auricular en forma de pirámide triangular de base ancha.

Aurícula izquierda. Cámara del corazón a la que habitualmente llegan las 4 venas pulmonares y que morfológicamente caracteriza por tener un apéndice auricular en forma de dedo de guante y base angosta.

Cardiomiocito. Célula apantalonada que constituye la unidad anatómo-funcional del tejido muscular del corazón. Al juntarse con otras similares, que tienen características de músculo estriado, aunque involuntario, forman un sincitio.

CD34. El CD34 es un antígeno de células precursoras del sistema hematopoyético, cuya detección a través de la inmunohistoquímica puede ser útil para identificar células leucémicas y tumores vasculares, pero igualmente ha servido para precisar el diagnóstico de numerosos tumores de partes blandas con apariencia fusocelular. El antígeno CD34 es una proteína transmembranosa, inicialmente detectada en las células del sistema linfohematopoyético, precursoras de la serie mieloide y presentes en la médula ósea. Este antígeno se observa también en el endotelio vascular, en las células dendríticas de la dermis superior, en el endoneuro, y en diversos tumores de partes blandas (como el tumor fibroso solitario, el dermatofibrosarcoma protuberans, el sarcoma epitelioides, los tumores del estroma gastrointestinal, los lipomas atípicos y fusocelulares, y el sarcoma de Kaposi).

Factor de crecimiento endotelial vascular. VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), es una proteína señalizadora implicada en la vasculogénesis (formación de novo del sistema circulatorio embrionario) y en la angiogénesis (crecimiento de vasos sanguíneos provenientes de vasos preexistentes). Como su propio nombre indica, las acciones del VEGF han sido estudiadas en las células del endotelio

vascular, aunque también tiene efectos sobre otros tipos celulares (por ejemplo, estimula la migración de monocitos/macrófagos, neuronas, células epiteliales renales y células tumorales). In vitro, se ha demostrado que el VEGF estimula la división y la migración de células endoteliales. El VEGF también es un vasodilatador e incrementa la permeabilidad vascular.

Infarto miocárdico agudo. Es una forma de síndrome coronario agudo que se caracteriza por una detención súbita del riego sanguíneo al tejido miocárdico del corazón, habitualmente producida por una enfermedad ateromatosa obstructiva de una arteria coronaria.

Oxígeno hiperbárico. Es una forma de terapia desarrollada por Boerema desde 1956, que consiste en la exposición a una presión parcial de O₂ mayor a una atmósfera lo cual aumenta la fracción inspirada y la concentración tisular de este gas. Habitualmente se lo administra a través de una cámara mono o multiplaza.

Ratas Wistar. Es un género de roedores miomorfos de la familia Muridae, que se caracteriza por ser una línea albina de la rata parda. Fue desarrollada en el Wistar Institute en 1906 para fines de investigación biomédica, y se trata de la primera rata empleada como organismo modelo (anteriormente se trabajaba con el ratón). Hoy por hoy, la mitad de las ratas de laboratorio existentes derivan de la población generada por el fisiólogo Henry Donaldson, el administrador Milton J. Greenman, y el genetista y embriólogo Helen Dean King.

Sham. Se da este nombre habitualmente a un grupo de estudio que sirve como testigo o patrón al compararlo con otro(s) grupo(s) experimental(es).

Ventrículo derecho. Cámara del corazón de la que habitualmente sale la arteria pulmonar y que morfológicamente caracteriza por tener columnas carnosas gruesas que le dan a su configuración interna un aspecto trabeculado.

Ventrículo izquierdo. Cámara del corazón de la que habitualmente sale la arteria aorta

y que morfológicamente se caracteriza por tener columnas carnosas finas que le dan a su configuración interna un aspecto liso.

ABREVIATURAS (En orden alfabético)

ANOVA	Análisis de varianza
AMI	Área miocárdica infartada
AD	Aurícula derecha
ADA	Arteria descendente anterior
AI	Aurícula izquierda
AV	Auriculo-ventricular
ATA	Atmosfera absoluta
BH4	Tetrahidrobiopterina
BH2	Dihidrobiopterina
BIAC	Balón intra-aortico de contrapulsación
CACs	Células angiogénicas circulantes
CICUAL	Comité interno de cuidado animal
CPE	Células progenitoras endoteliales
°C	Grados centígrados
DAI	Desfibrilador automático implantable
DAV	Dispositivo de asistencia ventricular
DE	Desviación estándar
ECMO	Oxigenador de membrana extracorpórea
eNOS	Sintasa de óxido nítrico endotelial
EC	Células endoteliales
FC	Frecuencia Cardiaca
FiO ₂	Fracción inspirada de oxígeno
FIH	Factor inhibidor de HIF
FGF	Factor de crecimiento fibroblástico
FR	Frecuencia respiratoria
GCs	Guanilil ciclasa soluble
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogeno
HIF	Factor inducible por hipoxia
IAM	Infarto miocárdico agudo
ICAM-1	Molecula de adhesión intercelular 1

iNOS	Sintasa de óxido nítrico inducible
LAD	Ligadura de la arteria descendente anterior
mg	Miligramos
mm ³	milímetro cúbico
NADP	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato
ON	Óxido Nítrico
NOM	Norma Oficial Mexicana
NOX	NADPH oxidasa
NTG	Nitroglicerina
HBO	Oxígeno Hiperbárico
HRE	Elemento de respuesta a Hipoxia
O ₂ -	Radical superóxido
ONOO-	Peroxinitrito
PCM	Primer contacto médico
PIC	Intervención coronaria percutánea (Percutaneous Coronary Intervention)
PIGF	Factor de crecimiento placentario
PHD	Hidroxilasa de dominios de proteínas proliil
PKA	Protein Kinase A
ROS	Especies reactivas de oxígeno (reactive oxygen species)
SCA	Síndrome coronario agudo
SDF	Factor derivado de células estromales.
STEMI	Infarto al miocardio con elevación del segmento ST
SOD	Superóxido dismutasa
VC	Volumen corriente
VD	Ventrículo derecho
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial
VI	Ventrículo izquierdo
μ ²	Micras cuadradas
10X	Diez aumentos
40X	Cuarenta aumentos

RESUMEN

ANTECEDENTES:

El infarto agudo al miocardio (IAM) es una de las principales causas de muerte en el mundo. En la actualidad, los tratamientos de reperfusión han demostrado los mejores resultados para el tratamiento del IAM dentro de su ventana terapéutica (12 horas), sin embargo, en nuestro país, pocas personas tienen acceso a ellos. Las terapias angiogénicas son posibles tratamientos alternativos, ya que han demostrado efectos benéficos en patologías de origen isquémico. La nitroglicerina (NTG) y la terapia de oxigenación hiperbárica (HBO) son tratamientos que han demostrado activar mecanismos inductores de angiogénesis.

MATERIAL Y MÉTODOS:

Para esta investigación, se utilizó un modelo experimental de IAM en ratas, en el cual se liga quirúrgicamente la arteria coronaria descendente anterior. Las ratas fueron agrupadas en 6 grupos: A(Control), B (Controles IAM), C "Sham" (Cirugía sin IAM y sin terapia), D (IAM con HBO), E (IAM con NTG) y F (IAM con NTG y HBO). Los tratamientos fueron administrados tras la finalización del procedimiento quirúrgico, el grupo D, recibió 3 sesiones de HBO, al grupo E se le aplicó un parche de NTG de liberación transdérmica, el cual fue cambiado cada 24 horas por 3 días y el grupo F, recibió ambos tratamientos. Al tercer día posterior al IAM, las ratas fueron sacrificadas, los corazones fueron extraídos para analizar el % de área miocárdica infartada (AMI) y llevar a cabo el análisis inmunohistoquímico contra CD34, VEGFR-2, y ERK1/2.

RESULTADOS:

La HBO, la NTG, y la terapia doble (HBO+NTG) demostraron disminuir el % del AMI contra el grupo control IAM (12.20 ± 1.269 , 11.83 ± 0.229 , 10.98 ± 0.988 , respectivamente vs 23.43 ± 1.398), de igual forma demostraron un incremento significativo de los marcadores angiogénicos CD34 y VEGFR-2 en comparación con el grupo control IAM. (CD34: 17.667 ± 1.76 , 36.833 ± 3.016 , 41.667 ± 2.55 vs

8.667±0.494, VEGFR-2: 16.167±1.62,24.667±133,31.50±0.76 vs 5.333±0.62). En el caso de ERK 1/2, solo los grupos E y F mostraron un incremento significativo contra el grupo B (32.50±1.232,49.833±3.96 vs 19.833±1.078).

CONCLUSIONES:

Las tres terapias probadas (HBO, NTG y HBO+NTG) disminuyeron el % de AMI e incrementaron la angiogénesis, resultados prometedores, ya que disminuirían la disfunción miocárdica y mejorarían la remodelación cardiaca. Es necesario complementar nuestros resultados con pruebas funcionales cardiacas y evaluar los cambios angiogénicos estudiados en un corazón infartado con más días de evolución para incrementar la objetividad del estudio.

ABSTRACT

BACKGROUND:

Acute myocardial infarction (AMI) is one of the leading causes of death in the world. Currently, reperfusion treatments have shown the best results for the treatment of AMI within its therapeutic window (12 hours), however, in our country, few people have access to them. Angiogenic therapies are possible alternative treatments, as well as the beneficial effects in pathologies of ischemic origin. Nitroglycerin (NTG) and hyperbaric oxygenation therapy (HBO) are treatments that have been able to induce the mechanisms leading to angiogenesis.

MATERIAL AND METHODS:

For this research, it was used an experimental model of AMI in rats, in which the anterior descending coronary artery is surgically ligated. The rats were grouped into 6 groups: A (Control), B (IAM Controls), C "Sham" (Surgery without AMI and without therapy), D (AMI with HBO), E (AMI with NTG) and F (AMI with NTG and HBO). The treatments were administered after the surgical procedure, group D, received 3 sessions of HBO, group E was applied a NTG patch of transdermal release, which was changed every 24 hours for 3 days and Group F received both treatments. On the third day after the AMI, the rats were sacrificed, the hearts were extracted to analyze the % infarcted myocardial area (IMA) and the immunohistochemical analysis was carried out against CD34, VEGFR-2 and ERK1/2.

RESULTS:

The HBO, the NTG, and the double therapy (HBO + NTG) demonstrated to decrease the % of the IMA against the AMI control group (12.20 ± 1.269 , 11.83 ± 0.229 , 10.98 ± 0.988 , respectively vs 23.43 ± 1.398), in the same way demonstrate a significant increase in the angiogenic markers CD34 and VEGFR-2 compared to the AMI control group. (CD34: 17.667 ± 1.76 , 36.833 ± 3.016 , 41.667 ± 2.55 vs 8.667 ± 0.494 , VEGFR-2: 16.167 ± 1.62 , 24.667 ± 133.31 , 50 ± 0.76 vs 5.333 ± 0.62). In the case of ERK 1/2, only groups E and F showed a significant increase against group B (32.50

$\pm 1.232.49.833 \pm 3.96$ vs 19.833 ± 1.078).

CONCLUSIONS:

The three proven therapies (HBO, NTG and HBO + NTG) decreased the % IMA and increased angiogenesis, promising results, since they would decrease myocardial dysfunction and improve cardiac remodeling. It is necessary to complement our results with cardiac functional tests and to evaluate the angiogenic changes studied in an infarcted heart with more days of evolution to increase the objectivity of the study.

1. INTRODUCCIÓN

El infarto miocárdico agudo (IAM) es la deprivación súbita del aporte sanguíneo al corazón secundario a la oclusión de las arterias coronarias o sus ramas, cuando esto sucede los procesos de isquemia, infarto y remodelación cardíaca inician.(Frangogiannis, 2008; Libby & Theroux, 2005; Nabel & Braunwald, 2012) Su tratamiento actual es la fibrinólisis y/o idealmente la angioplastia coronaria percutánea, mismas que deben ser realizadas en un intervalo recomendado de 12 horas tras el IAM.(Roffi et al., 2016; Sociedad et al., 2012) En la actualidad se buscan alternativas terapéuticas para aquellos pacientes que no son candidatos a estas terapias o que por falta de medios de transporte ó de infraestructura y recursos en los hospitales aledaños no pueden ser sometidos a las terapias mencionadas.

Las terapias proangiogenicas son una estrategia prometedora para el tratamiento del infarto agudo al miocardio, debido a que la formación de novo de microvasculatura tiene el potencial de salvar miocardio isquémico a etapas tempranas después del IAM, y es esencial para prevenir la transición a falla cardíaca a través del control de la hipertrofia y contractilidad del cardiomiocito.

La angiogénesis representa la aparición de nuevos microvasos desde capilares preexistentes, cuando las células endoteliales son expuestas a señales angiogénicas como hipoxia, factores de crecimiento y óxido nítrico son activadas(Cochain, Channon, & Silvestre, 2012; Lorier, Touriño, & Kalil, 2011).

La terapia de oxigenación hiperbárica ha reportado beneficios como terapia principal, conjunta o alternativa en diversas lesiones y condiciones médicas agudas y crónicas (Singh & Gambert, 2014). Además ha demostrado estimular la neovascularización en injertos, heridas y tejidos irradiados a través de la generación de ROS (especies reactivas de oxígeno) los cuales actúan como moléculas de señalización celular capaces de estimular la proliferación celular endotelial, y moviliza las células progenitoras endoteliales desde la medula mejorando el flujo sanguíneo y disminuyendo el tejido isquémico, a su vez la exposición a HBO ha demostrado incrementar la resistencia de los cardiomiocitos

al estrés oxidativo secundario a la reperfusión miocárdica aumentando su supervivencia por otra parte ha demostrado disminuir la infiltración de neutrófilos al atenuar la expresión de moléculas de adhesión celular como (ICAM-1 y Selectina-P) aminorando la peroxidación lipídica membranal y la respuesta inflamatoria. Por lo que dadas sus características podría ser una terapia potencial para los pacientes con IAM(Yogaratnam et al., 2006).

El óxido nítrico por otra parte, es una importante molécula cardioprotectora por sus efectos vasodilatadores, antioxidantes, antiplaquetarios, y acciones antineutrofilicas, siendo esencial para la función cardiaca normal y en años recientes se ha descubierto que juega un rol central en los procesos neovascularización isquémica por lo que su administración exógena, a través de donadores de óxido nítrico como en este caso la nitroglicerina, podría ser una estrategia potencial de tratamiento de la patología en estudio(Bir, Xiong, Kevil, & Luo, 2012).

2. ANTECEDENTES

2.1. DEFINICIÓN Y CLASIFICACIÓN DE LA ENFERMEDAD ISQUÉMICA DEL CORAZÓN

La enfermedad isquémica del corazón, conocida también como enfermedad coronaria, comprende un conjunto de cardiopatías diversas cuya alteración fisiopatológica común repercute sobre la perfusión coronaria, misma que puede ir desde un déficit leve hasta la detención súbita del riego sanguíneo al tejido miocárdico del corazón. (Libby & Theroux, 2005; Nabel & Braunwald, 2012; O’Gara et al., 2013)

Desde el punto de vista de su tiempo de evolución clínica, todas estas cardiopatías se pueden clasificar en dos grandes grupos: los síndromes coronarios agudos y los síndromes coronarios crónicos (Nabel & Braunwald, 2012; O’Gara et al., 2013) (*Fig.1*).

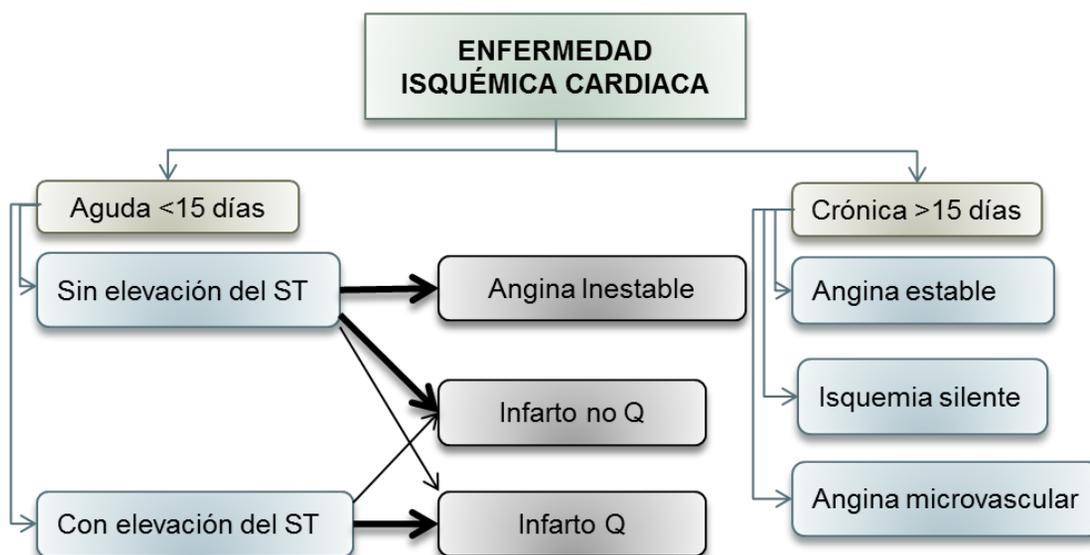


Fig.1.- Clasificación de la enfermedad isquémica del corazón

La definición de consenso internacional actual dice que el término “infarto agudo de miocardio” debe usarse cuando haya evidencia de necrosis miocárdica en un contexto clínico consistente con isquemia miocárdica. En estas condiciones, cualquiera de los criterios descritos en la tabla cumple el diagnóstico de infarto de miocardio espontáneo (**Tabla 1**). (Sociedad et al., 2012)

Tabla 1. Definición universal del IAM (Sociedad et al., 2012)

Detección de un aumento o descenso de los valores de biomarcadores cardiacos (preferiblemente troponina), con al menos uno de los valores por encima del percentil 99 del límite de referencia superior, y al menos uno de los siguientes parámetros:

- Síntomas de isquemia.
- Cambios significativos en el segmento ST nuevos o presumiblemente nuevos o bloqueo de rama izquierda nuevo.
- Desarrollo de ondas Q patológicas en el ECG.
- Evidencia por imagen de pérdida de miocardio viable de nueva aparición o anomalías regionales en la motilidad de la pared de nueva aparición.
- Identificación de un trombo intracoronario mediante angiografía o autopsia

Muerte cardiaca con síntomas sugestivos de isquemia miocárdica y cambios del ECG presumiblemente nuevos, o bloqueo de rama izquierda nuevo, pero la muerte tiene lugar antes de que se produzca liberación de los biomarcadores cardiacos sanguíneos o antes de que los valores de biomarcadores cardiacos hayan aumentado

Trombosis intra-stent asociada a infarto de miocardio cuando se detecta por angiografía coronaria o autopsia en el contexto de una isquemia miocárdica, y con aumento o descenso de los valores de biomarcadores cardiacos, con al menos uno de los valores por encima del percentil 99 del límite de referencia superior

2.2. EPIDEMIOLOGÍA Y FACTORES DE RIESGO DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN EL MUNDO.

De acuerdo a la OMS, las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en todo el mundo, Se calcula que en 2012 murieron por esta causa 17,5 millones de personas, lo cual representa un 31% de todas las muertes registradas en el mundo. De estas muertes, 7,4 millones se debieron a la cardiopatía coronaria, y 6,7 millones, a los AVC. Más de tres cuartas partes de las defunciones por ECV se producen en los países de ingresos bajos y medios. La mayoría de las ECV pueden prevenirse actuando sobre factores de riesgo comportamentales, como el consumo de tabaco, las dietas malsanas y la obesidad, la inactividad física o el consumo nocivo de alcohol, utilizando estrategias que abarquen a toda la población. (OMS, 2014)

2.3. EPIDEMIOLOGÍA DE LAS ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES EN MÉXICO.

De acuerdo a las estadísticas de mortalidad reportadas por el INEGI, para el año 2017 la principal causa de mortalidad en México la representan las enfermedades del corazón con un total de 141,619 defunciones, y de ellas las más frecuentes son las enfermedades isquémicas con una cantidad para el año descrito de 101,877 pacientes lo que representa el 71.9% (**Tabla 2**). (INEGI, 2018)

TABLA 2. Principales causas de mortalidad en México 2017. (INEGI, 2018)

Orden de Importancia	Causas	Defunciones
	Total	703,047
1	Enfermedades del corazón	141,619
	Enfermedades isquémicas del corazón	101,877
2	Diabetes mellitus	106,525
3	Tumores malignos	84,142
4	Accidentes	36,215
5	Enfermedades del hígado	38,833
6	Enfermedades cerebrovasculares	35,248
7	Agresiones	32,079
8	Enfermedades pulmonares obstructivas crónicas	22,954
9	Influenza y neumonía	21,892
10	Insuficiencia renal	13,167

De acuerdo a datos de ENSANUT 2012, el motivo más frecuente de hospitalización tanto entre hombres como entre mujeres es el tratamiento no quirúrgico de enfermedades (como diabetes, infarto, crisis hipertensiva, etc.), que representa 31.5% del total: 40.3% para el caso de los hombres y 27% para las mujeres (Ensanut, 2012). El IAM en México, al igual que en todo el mundo es la causa más frecuente de mortalidad. Esto implica un enorme problema de salud pública, ya que requiere un costo elevado para su atención.

2.4. TRATAMIENTO Y PROBLEMÁTICA DEL IAM

El tratamiento del IAM va destinado a repermeabilizar la arteria involucrada para reducir al máximo el daño miocárdico. Los tratamientos más utilizados actualmente son la fibrinólisis y/o la angioplastia coronaria percutánea (**Tabla 3**), mismas que deben ser realizadas dentro de las primeras 12 horas de

producido el IAM (ventana terapéutica) (**Fig.2**) (Roffi et al., 2016)(Sociedad et al., 2012)(Ministerio De Salud, Santiago, 2010). La falta de tratamiento oportuno del IAM pasadas las 12 horas por múltiples factores relacionados con el paciente y la logística de la atención hospitalaria generan un retraso (Sociedad et al., 2012) (**Fig.3**), que deriva en potenciales complicaciones como shock cardiogénico, arritmias mortales como la fibrilación ventricular y taquicardia ventricular, insuficiencia cardíaca isquémica, infarto ventricular derecho, complicaciones mecánicas (regurgitación mitral, ruptura septal ventricular, ruptura de la pared libre ventricular izquierda, aneurisma ventricular izquierdo), bradicardia, bloqueo auriculo-ventricular, defectos en la conducción intraventricular, pericarditis, complicaciones tromboembólicas, lesión renal aguda, hiperglucemia y muerte (O’Gara et al., 2013)(Sociedad et al., 2012). La morbimortalidad por IAM

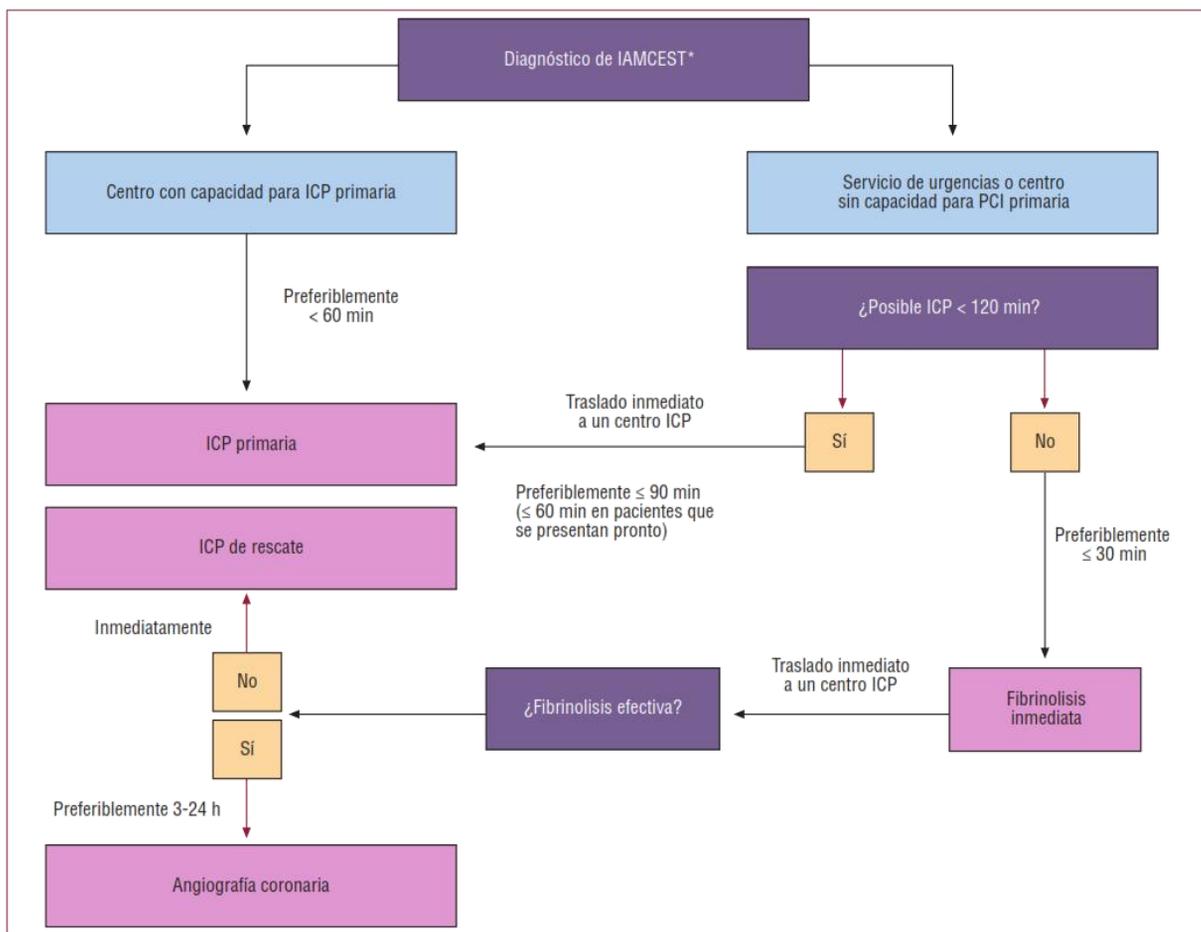


Fig.2.- Manejo prehospitalario y hospitalario, y estrategias de reperusión dentro de las primeras 24 h del primer contacto médico.(Sociedad et al., 2012)

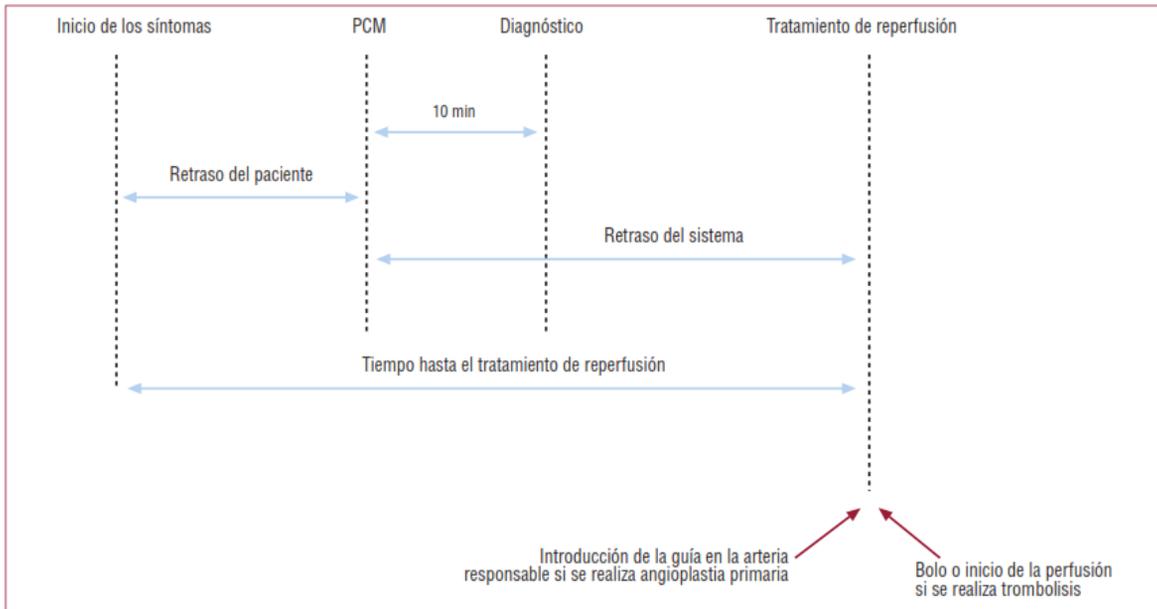


Fig.3 Componentes del retraso en el tratamiento del infarto miocárdico agudo e intervalos ideales para la intervención. (Sociedad et al., 2012)

dependerá del tiempo de retraso y de la estrategia terapéutica empleada para tratar esta patología, además tiene una relación directamente proporcional a la cantidad de cardiomiocitos afectados por la isquemia y necrosis, a mayor daño miocárdico la insuficiencia cardíaca isquémica posterior al IAM es más severa, ya que para tratarla se requieren alternativas poco accesibles, costosas y de alto riesgo para la vida.

Tabla 3. Angioplastia vs Fibrinólisis (Ministerio De Salud, Santiago, 2010)

Angioplastia se prefiere si:

Presentación de síntomas <12 horas, en hospital que cumpla los requisitos para realizar ACP.

Shock Cardiogénico

Quillio y Kimball 3

Fibrinólisis contraindicada

Presentación tardía (>3 horas del inicio de los síntomas

Fibrinólisis se prefiere si:

Presentación precoz. Dentro de las primeras 3 horas del inicio de los síntomas en:

Hospital sin disponibilidad de angioplastia (hospital que no cumple requisitos para PCI)

Tiempo de traslado prolongado para realizar ACP

Tiempo contacto-balón >90 minutos

2.5. ALTERNATIVAS TERAPÉUTICAS EN EL IAM

La trombólisis y/o la angioplastia coronaria transluminal percutánea con stent no siempre son posibles de realizar e incluso pueden estar contraindicadas (Tabla) (Sociedad et al., 2012), en esas circunstancias, se puede proponer una cirugía de revascularización miocárdica para intentar salvar los territorios isquémicos y limitar al máximo el daño miocárdico por necrosis. Cuando la falla cardíaca es importante y el paciente presenta datos de shock cardiogénico se puede usar dispositivos de asistencia ventricular como el balón intra-aórtico de contrapulsación (BIAC) o la membrana de circulación extracorpórea (ECMO) (Montes De Oca, 2014)(O’Gara et al., 2013). En ocasiones el área necrótica es reemplazada por una cicatriz arritmogénica que causa arritmias letales recurrentes que requieren del uso de dispositivos de desfibrilación automática implantable (DAI) o de resincronizadores. Una de las líneas terapéuticas más prometedoras hoy en día en el tratamiento de la falla cardíaca es el implante de células madre en el tejido necrótico con el objeto de conseguir una diferenciación de ellas en cardiomiocitos funcionales capaces de sustituir el tejido cicatricial (Estrada, Hernández, & Alarcón, 2012). También se han desarrollado otras alternativas al trasplante cardíaco con resultados no tan satisfactorios tales como la cardiomiopatía dinámica, el procedimiento de Batista, diversos dispositivos cardíacos como el Acorn y el Myosplint, y la ablación de fibrilación atrial. Por último, y como la terapia última del tratamiento de la falla cardíaca, está el trasplante cardíaco ortotópico(Roffi et al., 2016) (**Fig. 4**).

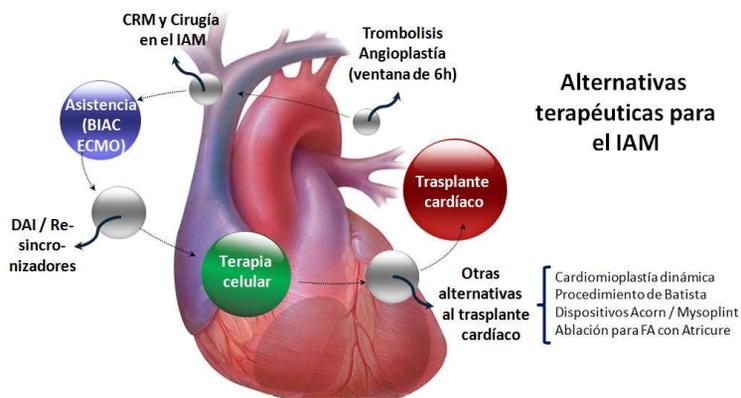


Fig. 4. Alternativas terapéuticas para el IAM- cortesía del laboratorio de farmacología cardiovascular

Tabla 4. Contraindicaciones de la terapia fibrinolítica (Sociedad et al., 2012)

Absolutas

Hemorragia intracraneal previa o accidente cerebrovascular de origen desconocido en cualquier momento.

Accidente cerebrovascular isquémico en los 6 meses precedentes.

Daño en el sistema nervioso central o neoplasias o malformación auriculoventricular.

Trauma/cirugía/lesión craneal importante recientes (en las 3 semanas precedentes).

Hemorragia gastrointestinal en el último mes.

Trastorno hemorrágico conocido (excluida la menstruación).

Diseción aórtica.

Punciones no compresibles en las últimas 24 h (p. ej., biopsia hepática, punción lumbar).

Relativas

Accidente isquémico transitorio en los 6 meses precedentes.

Tratamiento anticoagulante oral.

Gestación o primera semana posparto.

Hipertensión refractaria (presión arterial sistólica > 180 mmHg o presión arterial diastólica > 110 mmHg).

Enfermedad hepática avanzada.

Endocarditis infecciosa.

Úlcera péptica activa.

Reanimación prolongada o traumática.

El trasplante de corazón tiene muchas desventajas, ya que su supervivencia a 10 años está alrededor del 70%, con el respectivo tratamiento inmunosupresor oral de por vida. A estas limitantes se agrega la poca oferta de potenciales donadores de órganos en relación a la creciente demanda de los mismos en todo el mundo. Por lo tanto, una vez establecida la falla cardíaca isquémica después de un IAM, las alternativas de tratamiento son costosas, poco accesibles y con resultados desalentadores.

2.6. FISIOPATOLOGÍA DEL INFARTO CARDIACO Y SUS FASES REPARACIÓN.

La lesión isquémica del miocardio produce disminución de la tensión de oxígeno dentro de la célula, pérdida subsiguiente de la fosforilación oxidativa y disminución de la generación de fosfatos de alta energía. El agotamiento de la adenosina trifosfato (ATP) conduce a la falla de la bomba sodio/potasio, pérdida de potasio, entrada de sodio y agua e hinchazón celular. El cese del metabolismo aeróbico, agotamiento del ATP y la acumulación de productos de metabolismo anóxico (tales como el ácido láctico) ocurren dentro de los diez segundos de la oclusión. La

pérdida de contractilidad ocurre casi simultáneamente y es evidente dentro de los 60s minutos después del inicio de la isquemia reversible aparecen cambios ultraestructurales de los cardiomiocitos, hinchazón mitocondrial y agotamiento de glucógeno. La lesión cardiomiocitaria irreversible evidenciada por alteraciones sarcolemicas evidenciadas por la presencia de pequeñas densidades amorfas en las mitocondrias se desarrolla después de 20-40 min de isquemia severa sostenida. El mecanismo de muerte celular predominante de los cardiomiocitos es por necrosis coagulativa, aunque también es probable por apoptosis. Las células que mueren desencadenan reacciones inflamatorias activando vías reparativas que resultan en la formación de una cicatriz. Alrededor de 30% de las células dentro del corazón son cardiomiocitos, mientras que el otro 70% está conformado por células endoteliales, fibroblastos, células de musculo liso y células inmunológicas. La interacción física y altamente regulada entre las células del corazón es crítica para el correcto desarrollo cardiaco y su funcionamiento, de igual manera el crosstalk funcional entre estas células está envuelto en la fisiopatología de diversas enfermedades cardiacas (Zhang & Shah, 2014). La reparación del infarto se puede dividir en tres fases superpuestas: la fase inflamatoria, la fase proliferativa y la fase de maduración(**Fig.5**)(Frangogiannis, 2008)

Durante la fase inflamatoria, se inducen quimiocinas y citocinas en el infarto y se observa una filtración marcada de leucocitos. Los neutrófilos y los macrófagos

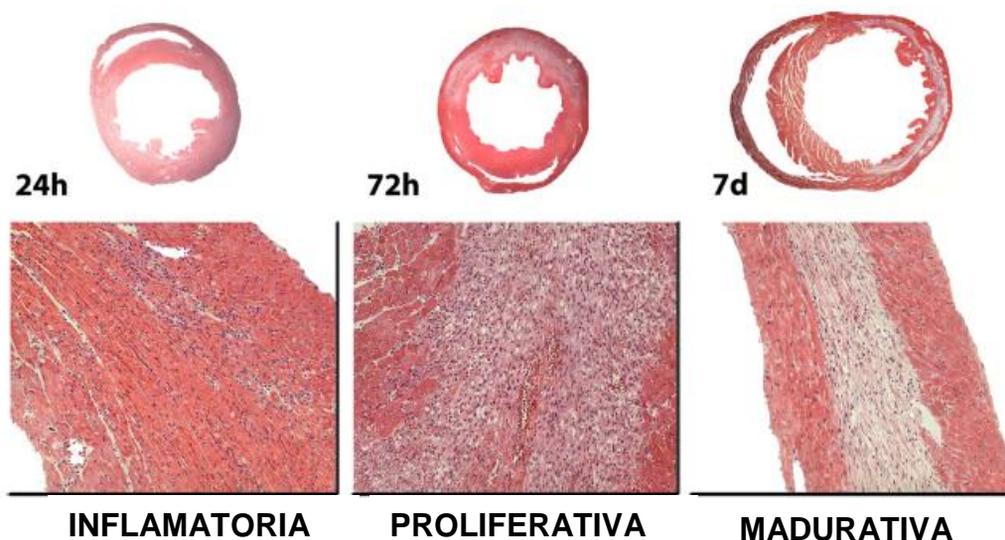


Fig 5.- Fases de la reparación cardíaca. (Frangogiannis, 2008)

limpian la herida de las células muertas y los desechos de la matriz. Durante la fase proliferativa de la curación, los macrófagos activados liberan citocinas y factores de crecimiento que conducen a la formación de tejido de granulación altamente vascularizado. En esta etapa se suprime la expresión de mediadores proinflamatorios, mientras que los fibroblastos y las células endoteliales proliferan. Los miofibroblastos activados producen proteínas de la matriz extracelular y se forma una extensa red microvascular. Finalmente, en la fase de maduración los fibroblastos y las células vasculares sufren apoptosis y se forma una cicatriz basada en colágeno. A medida que el infarto se cura, se observa un remodelado dilatador del ventrículo infartado. Los animales grandes y los seres humanos presentan cicatrización retardada en comparación con los roedores. (Frangogiannis, 2008) Schmeisser et al, demostraron que el monocito CD-34+ puede desarrollar in vitro un fenotipo endotelial y tomar forma en una estructura tubular, lo que indica un potencial papel de los monocitos en la angiogénesis (Lorier et al., 2011).

2.7. ANGIOGÉNESIS EN EL INFARTO AGUDO AL MIOCARDIO.

La angiogénesis representa una serie compleja de estímulos y de respuestas integradas con el fin de lograr la aparición de nuevos microvasos desde capilares preexistentes, cuando las células endoteliales son expuestas a señales angiogénicas como hipoxia, factores de crecimiento y óxido nítrico se activan, proliferando y migrando, a su vez, existe estimulación de la matriz extracelular, para la atracción de pericitos y macrófagos, estimulación de células musculares lisas para su proliferación, migración y formación de la estructura de nuevos vasos. (Lorier et al., 2011)(Cochain et al., 2012)

Se han descrito tres fases de la angiogénesis, 1. fase inicial: isquemia miocárdica, 2. Fase intermedia de estabilización el brote neovascular, 3. Fase final de maduración vascular.

2.7.1 Vías angiogénicas y su rol en la angiogénesis cardíaca tras IAM.

La angiogénesis es una respuesta adaptativa a la hipoxia tisular y depende de la acumulación de diversos factores en la zona de miocardio isquémico, los factores

de transcripción inducibles por hipoxia (HIF) principalmente HIF-1 α se encuentran acumulados durante la isquemia miocárdica y controlan el desarrollo de la angiogénesis postnatal, y tiene como objetivo una gama amplia de genes que incluyen genes angiogénicos, como VEGF (Factor de crecimiento vascular endotelial) y SDF-1 α (Factor derivado de células estromales 1- α), HIF aumenta hasta en 30 veces la concentración local de VEGF en pocos minutos (**Fig.6**) (Lorier et al., 2011).

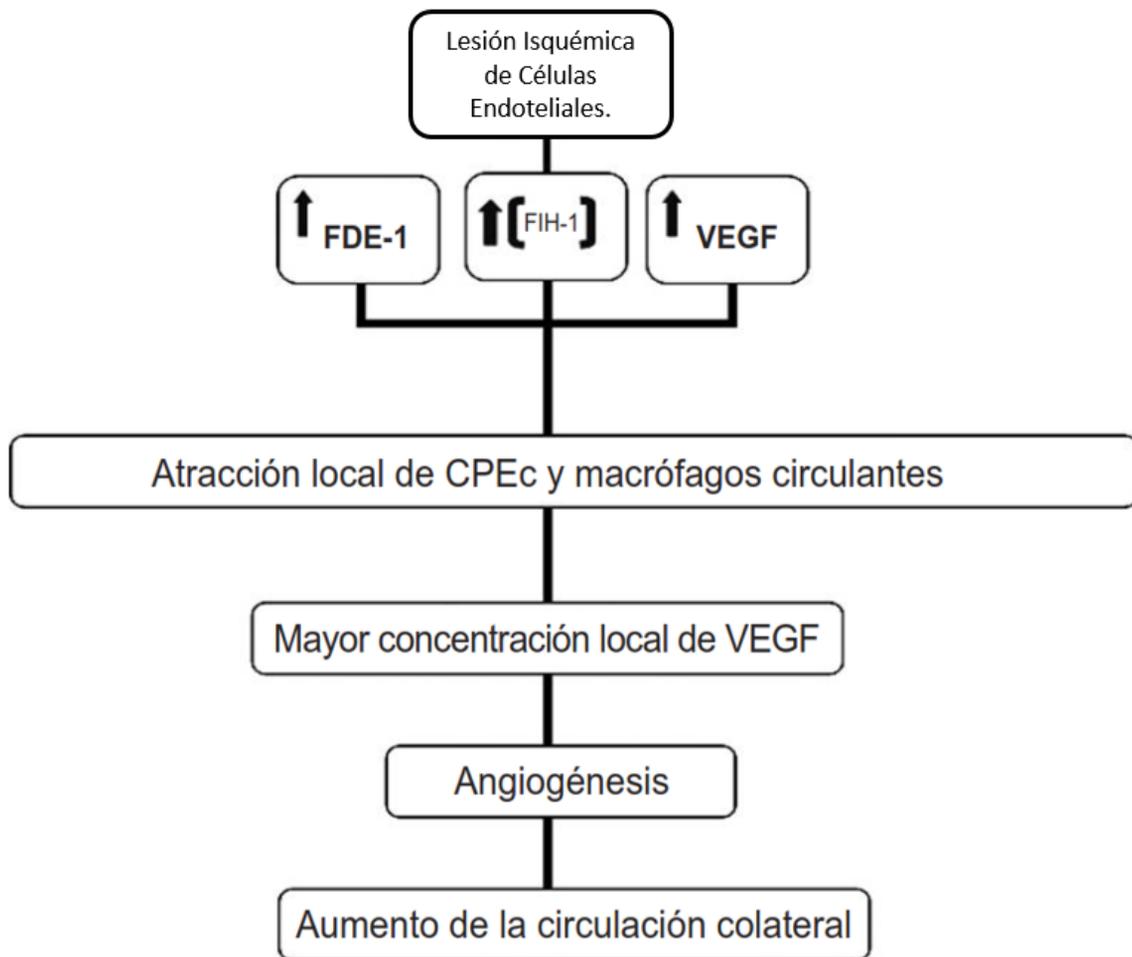


Fig.6 Ilustración de los mecanismos moleculares y fisiopatológicos determinantes de la angiogénesis miocárdica secundaria a la isquemia. (Lorier et al., 2011)

HIF-1 α y su isoforma HIF-2 α son expresadas en cardiomiocitos, células endoteliales e inflamatorias rápidamente tras el IAM, y pueden persistir hasta 4 semanas después del infarto. HIF-1 α también es esencial para el aumento de la concentración en la medula ósea de los precursores de las células endoteliales. La expresión de HIF-1 α en cardiomiocitos mejora la función cardiaca después del IAM,

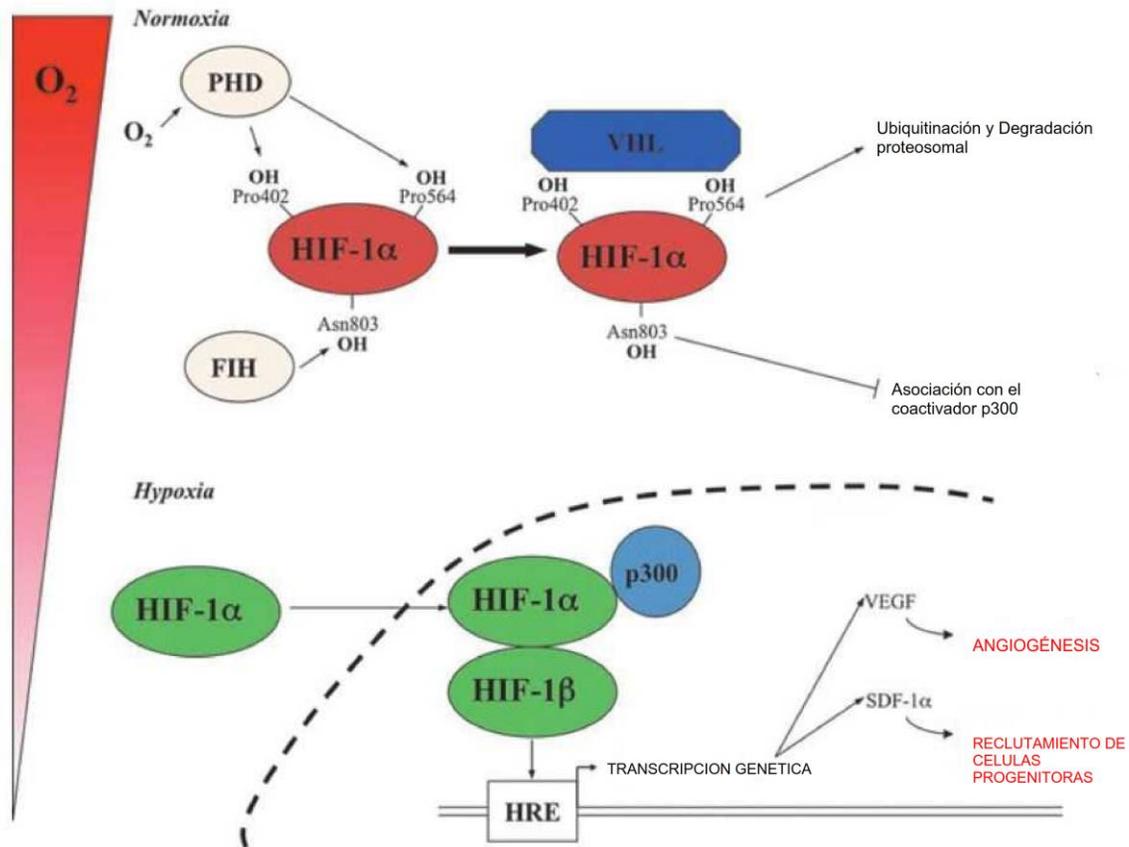


Fig.7.- Modificaciones post-traduccionales dependientes del oxígeno de los niveles de HIF-1 α . Bajo normoxia, HIF-1 α es hidroxilado (OH) sobre los residuos de prolina 402 y 564 (Pro) en el dominio de degradación dependiente de oxígeno por proteínas específicas del dominio de la prolil hidroxilasa (PHD). Una vez hidroxilado, HIF-1 α es reconocido por la proteína von Hippel-Lindau (VHL), que es parte de un complejo de ubiquitina-ligasa conocido como E3 ligase complejo, que se dirige a HIF-1 α para poli-Ubiquitinación y posterior degradación proteasomal. El residuo asparagina 803 (Asn 803) de HIF1 α también está hidroxilado por FIH (Factor inhibidor de HIF), lo que perjudica la interacción con el coactivador transcripcional p300 / CREB proteína de unión (p300) con el HIF-1 α Dominio de transactivación C - terminal. Cuando el oxígeno se limita, los residuos de prolina ya no son hidroxilados y HIF1 α se transloca en el núcleo, donde se dimeriza con HIF-1 β , y el dímero se une al elemento de respuesta a hipoxia (HRE) con las secuencias promotoras o potenciadoras de genes diana. Además, la interacción con el enlace p300 / CREB debido a la inhibición de la hidroxilación de Asn 803, aumenta la actividad transcripcional de HIF (Cochain et al., 2012).

y está asociada al incremento en la expresión de VEGF y angiogénesis en el miocardio en forma dosis-dependiente. La regulación al alta de VEGF y la sintasa endotelial de óxido nítrico (eNOS) así como el reclutamiento de células mieloides proangiogénicas, demuestra el efecto pleiotrópico de la vía de HIF-1 α en la angiogénesis. (**Fig. 7 y 8**)

HIF-1 α controla además el reclutamiento de células endoteliales progenitoras (CEP) a áreas isquémicas y la angiogénesis a través de la creación de gradientes de SDF-1. HIF-2 α también es capaz de inducir genes angiogénicos, sin embargo,

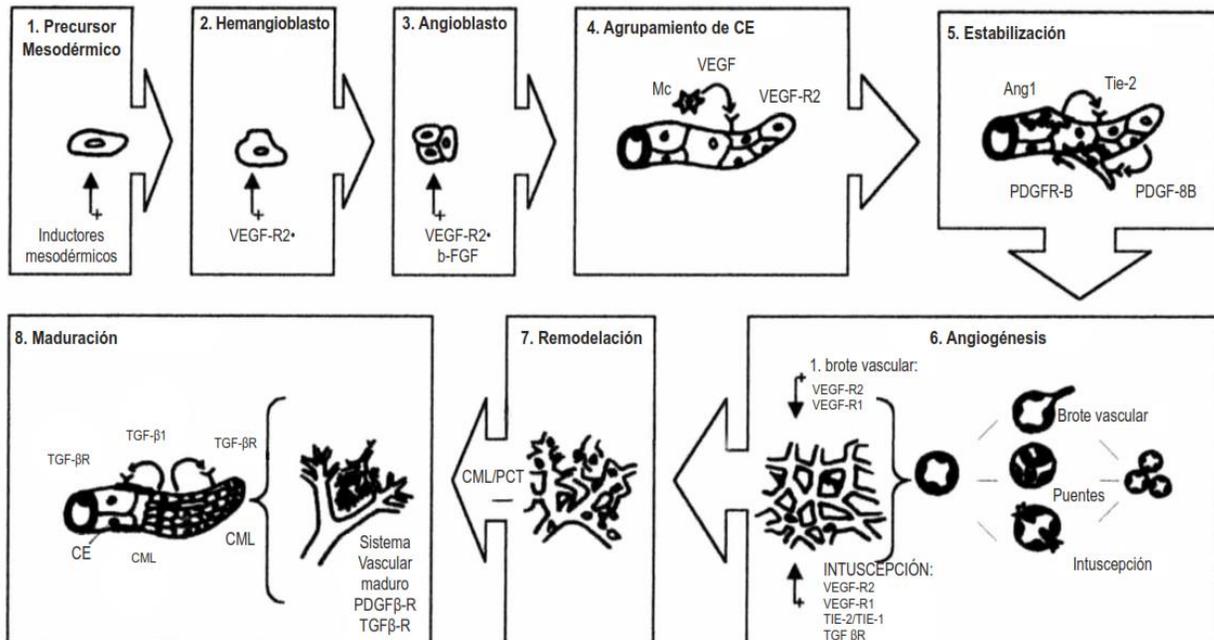


Fig.8.- Formación de los plexos vasculares primarios del mesodermo, durante la fase embrionaria. Los hemangioblastos y la bipotencialidad de sus precursores representa el paso intermedio de los precursores endoteliales (los angioblastos); en la etapa embrionaria, forman la red vascular primitiva llamada vasculogénesis y en la vida adulta, se expanden y se remodelan, conllevando a la angiogénesis. En el Cuadro 5, está la fase de estabilización, representada por la unión de las CE por la acción del VEGF y del FCDP- β , que recluta los pericitos y las células del músculo liso, cubriendo las células endoteliales durante la estabilización del vaso. La angiopoyetina – 1 (Ang-1) y FCT-b1 estabilizan el vaso naciente. La Ang-2, en la ausencia de factores de crecimiento, provoca la regresión del brote naciente. En el Cuadro 6, aparecen los procesos angiogénicos de intususcepción y por brote. En los Cuadros 7 y 8, están las fases de remodelación y maduración del vaso naciente.

CML: células del músculo liso; PCT: pericitos. Unión del VEGF con las células endoteliales (CE), FCDP- β recluta pericitos (PC).(Lorier et al., 2011)

su rol postnatal está más relacionado a modelos tumorales, recientemente se ha demostrado que su delección en células endoteliales mejora angiogénesis, pero los nuevos vasos fallan en su maduración por lo tanto da lugar a pobre perfusión tisular.(Cochain et al., 2012)(Lorier et al., 2011).

2.8 FACTORES DE CRECIMIENTO.

Los factores de crecimiento más estudiados son las familias de VEGF y el factor de crecimiento fibroblástico (FGF), sin embargo, otros factores de crecimiento como el factor de crecimiento nervioso, el factor de crecimiento similar a insulina 1, y el factor de crecimiento hepático están presentes en la isquemia cardiaca y promueven la angiogénesis disminuyendo la disfunción cardiaca después del IAM. Familia de Factores de Crecimiento VEGF.

Los miembros de la familia VEGF (**Fig. 9**) tienen un rol muy importante en la angiogénesis post-IAM (**Fig. 6**), VEGF-A, el más estudiado, actúa a través de su unión al receptor VEGFR-2, promoviendo la supervivencia celular endotelial, su proliferación y migración. La expresión de VEGF se induce rápidamente en la isquemia miocárdica en humanos y roedores, no solo por hipoxia, sino también por estiramiento mecánico. Experimentos en los que se ha administrado VEGF a porcinos han demostrado que su actividad proangiogenica está asociada a mejoramiento de la función cardiaca en modelo de IAM. Cuando VEGF actúa solo a través de VEGFR-2 estimulando la angiogénesis, forma vasos inmaduros, desorganizados y con fugas, y puede inhibir la acción del factor de crecimiento derivado de plaquetas BB, PDGF-BB sobre su receptor PDGFR β , una vía indispensable para la maduración vascular. Este fenómeno nos muestra que la angiogénesis y la arteriogenesis son procesos altamente regulados en el tiempo para la formación de una red microvascular estable. El receptor VEGFR-1 al ser activado por VEGF2 y el factor de crecimiento placentario (PIGF) estimulan los mecanismos de angiogénesis por otros 2 mecanismos, primero al activarse VEGFR-1 a través de un mecanismo de transfosforilacion activa al receptor VEGF2 , por otro lado promueve el reclutamiento de células proangiogenicas

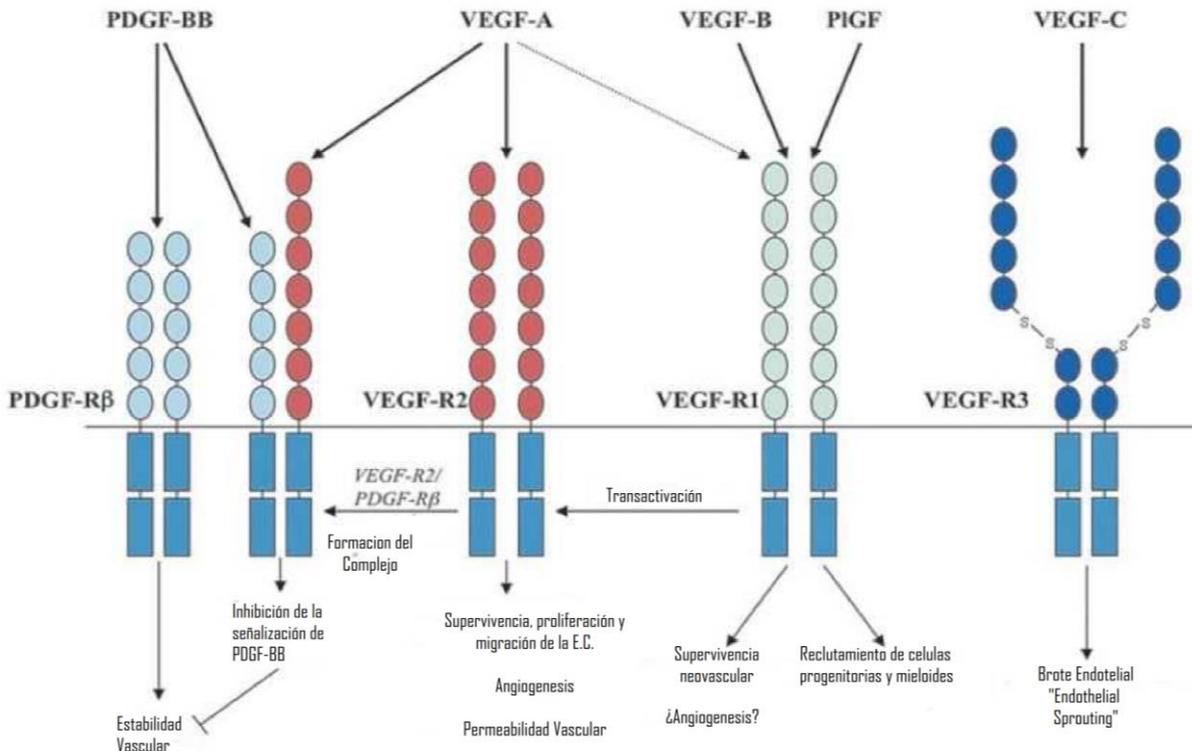


Fig. 9.- Familia de factores de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus vías de señalización. (Cochain et al., 2012)

mielomonocíticas que expresen VEGF1 en tejidos isquémicos, sin embargo su acción aún es muy controversial, estudios recientes han sugerido que VEGF-B pueden inducir angiogénesis específicamente en el corazón infartado del murino, crecimiento de la arteria coronaria, pero no angiogénesis y por otro lado, Zhang et al demostró que VEGF-B no se requería para crecimiento vascular en ratones, pero era esencial para su supervivencia a través de la inducción de varias vías antiapoptóticas.

Finalmente, la isoforma VEGF-C promueve linfangiogenesis vía su receptor VEGFR-3, y también parece participar en la angiogénesis post-IAM, datos recientes indican que induce directamente la aparición de brotes vasculares in vivo. Además, promueve la expresión de PDGF-B y la maduración vascular, por lo que se sospecha que su efecto es indirecto. (Cochain et al., 2012; Lorier et al., 2011).

2.9 SINTASAS DE OXIDO NÍTRICO (NOS) Y OXIDO NÍTRICO (ON), SU IMPORTANCIA EN LA REPARACIÓN CARDIACA.

El Óxido nítrico (ON) es una molécula mensajera en forma gaseosa sintetizada

por una familia de enzimas conocidas como NOS a partir de L-arginina, O₂, NADPH, BH₄ FAD y FMN, las cuales incluyen 3 isoformas NOS1 (neuronal, nNOS, Neuronas del SNC y SNP, neuroglías, islotes del páncreas), NOS2 (inducible iNOS, localización: Macrófagos, hepatocitos, células musculares lisas, neutrófilos y otros) y NOS3 (endotelial eNOS: Endotelio vascular, riñón, plaquetas) las cuales se expresan en diferentes tejidos (Ferrer-Viant, D., Jorge-Fonseca, C., García-Rodríguez, R., Martínez-Anglada, 1998). Desde su descubrimiento a inicios de 1980 por tres galardonados con el premio nobel, Furchgott, Ignarro y Murad, el ON ha sido reconocido como una importante molécula en la señalización celular en muchos procesos fisiológicos (Sobrevia, Ooi, Ryan, & Steinert, 2016). Las NOS han sido íntimamente implicadas en la respuesta angiogénica a la isquemia e hipoxia, en parte a través de HIF1 α y VEGF jugando un papel importante en la angiogénesis y remodelación ventricular después de un IAM. Además, en ratones con delección de eNOS (Enos^{-/-}) la angiogénesis está reducida tras un IAM, igualmente la capacidad de las estatinas conocidas por inducir angiogénesis a través de la movilización de células progenitoras endoteliales (CPE) está reducida. En ratas tratadas con un activador transcripcional de eNOS tras un IAM se ve reducida el área de infarto y el número de CPE circulantes se ve conservado, efectos que no fueron vistos en ratas Enos^{-/-}. La habilidad del cofactor de NOS, la tetrahidrobiopterina (BH₄) para mejorar la angiogénesis miocárdica tras un IAM, requiere la presencia de iNOS por lo que se sugiere que el acoplamiento de la NOS inducible es el determinante más importante del efecto de BH₄ en angiogénesis miocárdica y remodelación tras IAM. (Cochain et al., 2012) El ON también ha demostrado tener un rol anti-hipertrofico en los miocitos atenuando la hipertrofia ventricular izquierda y la disfunción contráctil tras la sobrecarga de presión. Interesantemente trabajos recientes sugieren que el ON también podría promover la hipertrofia. (Zhang & Shah, 2014) Los resultados de otros autores sugieren que la presencia de eNOS limita la disfunción y el remodelamiento ventricular izquierdo en modelos murinos animales de IAM, por un mecanismo independiente de la postcarga, en parte por disminuir la hipertrofia de los miocitos en el miocardio remoto. El óxido nítrico también ha demostrado disminuir la hipertrofia de miocitos

cardiacos en cultivos celulares en respuesta a la angiotensina II, y disminuye la expresión de receptores de angiotensina II tipo 1. La administración de un inhibidor de NOS en ratas causa hipertrofia cardiaca que no es prevenible por la reducción de la postcarga con hidralazina (Scherrer-Crosbie et al., 2001). Estudios recientes han demostrado que el óxido nítrico juega un papel central en la neovascularización a través de la generación de GMPc y la activación de muchas otras respuestas de señalización celular. Evidencia acumulada sugiere que la señalización endotelial PKA/eNOS juega un papel central en desordenes isquémicos tras promover la neovascularización por tres procesos principales: angiogénesis, arteriogenesis (colateralización), así como vasculogenesis postnatal a través de células endoteliales progenitoras circulantes (CPE) derivadas de la medula ósea (MO) (**Fig.10 y 11**) (Bir et al., 2012).

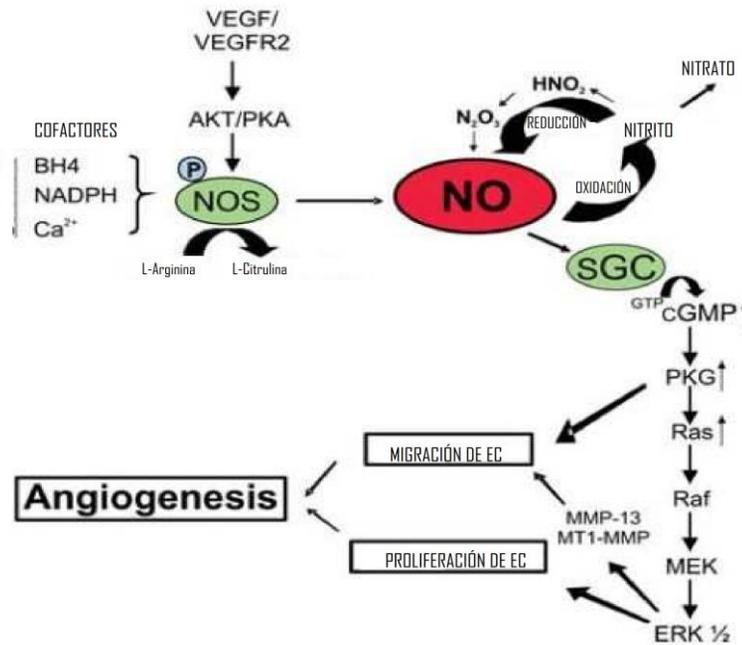


Fig 10.- Prototipo de la vía de señalización angiogénica relacionada con la producción de ON endógeno y la subsecuente activación de la cascada de cinasas. (Bir et al., 2012)

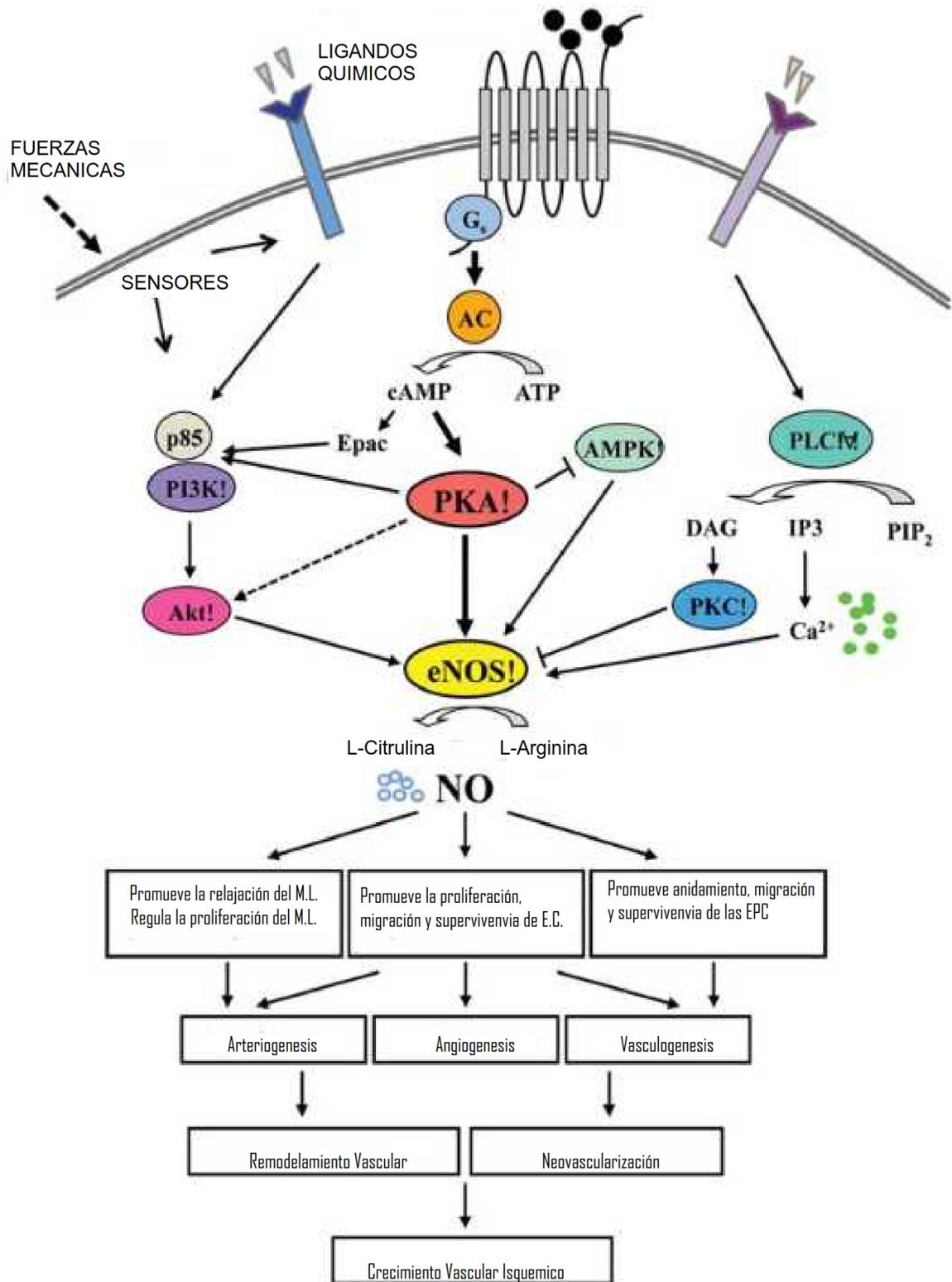


Fig 11.- Estimulos activadores de la via de señalización dependiente de PKA regulando el crecimiento vascular, PKA interactua con otras vías intracelulares como Akt y AMPK, convergiendo en la activación de eNOS. (Bir et al., 2012)

2.10. SEÑALIZACIÓN REDOX ENTRE CÉLULAS CARDIACAS, IMPORTANCIA DE NADPH OXIDASAS.

Las biomoléculas modificadas como parte de reacciones de óxido-reducción tienen influencia en muchos procesos fisiológicos y patológicos del corazón (función contráctil, crecimiento de cardiomiocitos, hipertrofia, angiogénesis y fibrosis) teniendo un rol importante en la remodelación cardiaca. Estudios recientes sugieren que el crosstalk entre cardiomiocitos y células endoteliales se da por 3 vías. 1. puede ser por difusión directa de ROS y ON; 2 ROS pueden afectar la función del cardiomiocito al afectar la ECM del corazón. 3. Puede existir alteración dependiente de ROS de la liberación paracrina de varias citocinas y factores de crecimiento desde el EC. Los ROS incluidos en la señalización Redox como el anión superóxido (O_2^-), radical hidroxilo (OH^-) y el peróxido de hidrogeno (H_2O_2), y especies reactivas de NO como peroxinitrito ($ONOO^-$) el producto de la reacción entre ON y O_2^- . Los efectos fisiopatológicos de los ROS dependen de su concentración, su proporción, localización subcelular, y el estado antioxidante endógeno. Las fuentes de ROS en células cardiacas incluyen la mitocondria, xantina oxidasa (XO), NOS desacopladas, y NADPH oxidasas (NOXs). Evidencia actual sugiere que los ROS generados por las enzimas NOXs y sus interacciones con NOS son de gran importancia en la señalización redox durante el desarrollo de la falla cardiaca. Se han identificado 7 familias de NOXs, sin embargo, las familias de NOX2 y NOX 4 son las isoformas predominantes en cardiomiocitos y EC. Ambas isoformas exhiben un flavocitocromo heterodimerico con una subunidad p22phox, pero presentan algunas diferencias en cuanto estructura, activación, función intracelular y tipo de ROS generado. La activación de NOX2 está dada por receptores agonistas acoplados a proteína G en respuesta a angiotensina II, endotelina, y agonistas α -adrenérgicos, además también se activa en respuesta a factores de crecimiento como trombina, citocinas como el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), insulina y glucosa, y fuerzas mecánicas, estos estímulos inducen la traslocación de 4 subunidades regulatorias citosólicas (p47phox, 67phox, p40phox, y Rac1) las cuales se unen al flavocitocromo e inician la producción de O_2^- . Por otro lado, NOX 4 es constitutiva y activa a bajo nivel y no requiere de unión con

otras subunidades citosólicas, sus niveles se incrementan en cardiomiocitos en respuesta a la sobrecarga de presión, y en múltiples células cardíaca por isquemia/hipoxia, hambruna, y factor de crecimiento transformante β (TGF- β), generando predominantemente H₂O₂ el cual tiene mayor estabilidad y difusibilidad y no interacciona con ON en comparación con otros ROS. NOX4 a través de la producción de H₂O₂ parece mejorar la señalización entre HIF1/VEGF y eNOS para promover la angiogénesis, a su vez activa el factor de transcripción GATA4 relacionado con un aumento en la expresión de VEGF, ha demostrado mejorar la actividad de NOS siendo potencialmente benéfica en el proceso de reparación cardíaca y estimula la liberación de Neurorregulina 1 (Nrg-1) en las CE, es un miembro de la familia de los factores de crecimiento epidermoides (EGF), y ligando de ErbB, un receptor acoplado a cinasa de tirosinas, teniendo interacciones con Erb2/Erb4 en cardiomiocitos generando efectos antiapoptóticos en las células miocárdicas mejorando así su supervivencia, también se ha encontrado que su expresión incrementa durante la etapa de hipertrofia ventricular concéntrica favoreciendo la hipertrofia de los miocitos. Por otro lado la producción de O₂⁻ por la NOX2 puede desacoplar las NOS por un mecanismo de oxidación de BH₄ ocasionando la disminución de la producción de ON y generando O₂⁻, además el exceso de O₂⁻ reacciona extremadamente rápido con el ON, incrementando las concentraciones de ONOO⁻ por lo que la vía de señalización de ON se ve interrumpida produciendo efectos patogénicos (Zhang & Shah, 2014) (**Fig 12 y 13**).

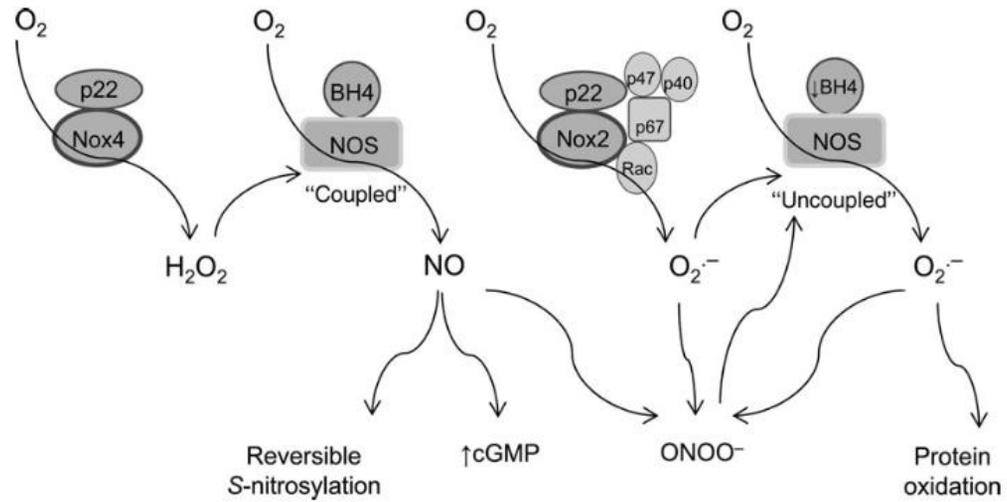


Fig.12.- Interacciones de ROS derivados de Nox en el balance nitroso-redox. H₂O₂ derivado de Nox-4 puede incrementar la producción de ON, por otro lado la producción de O₂^{-•} por Nox 2 reacciona con ON para generar peroxinitrito (ONOO⁻) y reduce la viabilidad del NO. (Zhang & Shah, 2014)

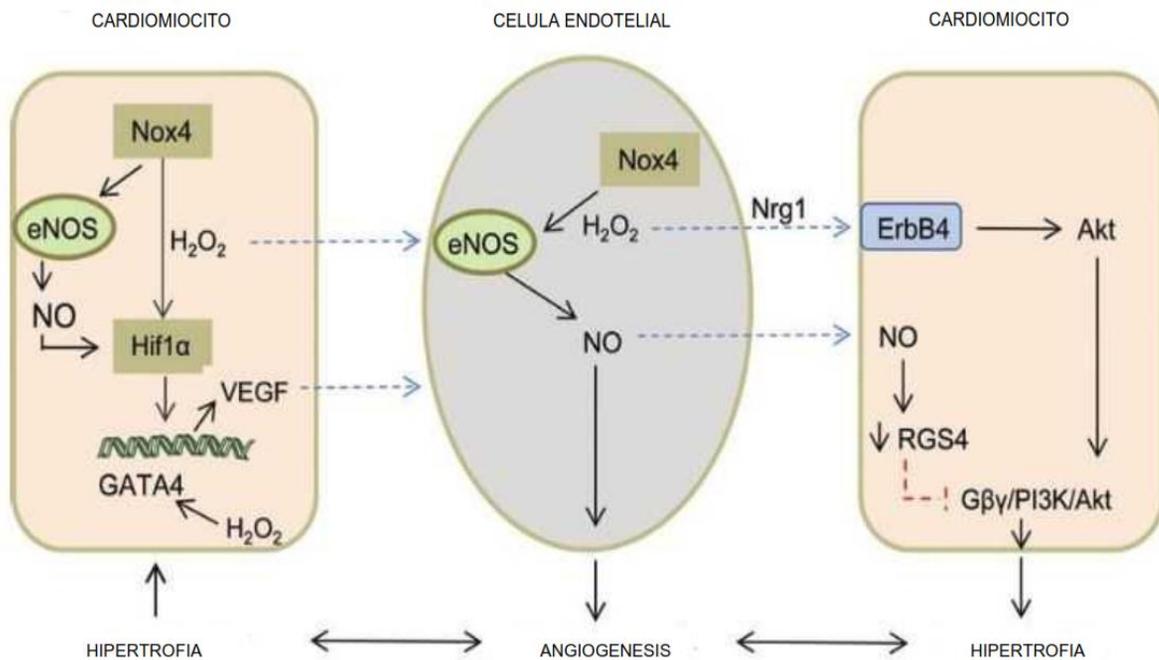


Fig.13.- Vías aceptadas y validadas experimentalmente de la coordinación regulada por Redox de la hipertrofia del cardiomiocito y angiogenesis en el corazón sometido a estrés. (Zhang & Shah, 2014)

2.11. TERAPIA DE OXIGENACIÓN HIPERBÁRICA (HBO).

La terapia de oxigenación hiperbárica ha sido usada para tratar la enfermedad por descompresión del buzo desde 1917 cuando los potenciales beneficios de esta fueron reportados por Dräger quien diseñó un sistema para tratar los accidentes por buceo, el sistema de Dräger nunca entró en producción por razones desconocidas,

fue hasta 1937 cuando Behnke y Shawn usaron la cámara de aire del hotel Cunningham tras su demolición (**Fig 14**), para tratar la enfermedad por descompresión con oxígeno hiperbárico y así la era de la terapia de la oxigenación hiperbárica empezó.

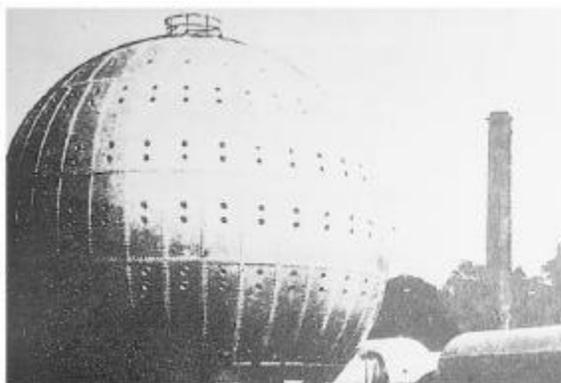


Fig.14 Cámara hiperbárica gigante de acero del hotel Cunningham. Contenia 72 cuartos.

Sin embargo, las cámaras hiperbáricas fueron desarrolladas desde 1620 por el inventor holandés Cornelius Drebbel y llamadas campanas de buceo las cuales utilizaban aire hiperbárico. El oxígeno fue descubierto hasta 1775, cuando el científico inglés Joseph Priestley separó lo que llamó “aire deflogisticado” sin embargo los efectos tóxicos del oxígeno a altas concentraciones fueron reportados por Lavoisier y Seguin en 1789 por lo que se rechazaba totalmente su uso en condiciones hiperbáricas (Jain, 2017). Boerema, el padre de la medicina hiperbárica moderna comenzó a usar la oxigenación hiperbárica para tratar otras patologías, en 1956 realizó una cirugía cardíaca en una cámara hiperbárica, y en 1960 demostró que un cerdo se podía mantener vivo sin sangre con el uso de HBO. La terapia de HBO consiste en la exposición a una presión parcial de O_2 mayor a una atmósfera lo cual aumenta la fracción inspirada de oxígeno, la cantidad de oxígeno disuelta en sangre y la concentración tisular de este gas. La terapia de HBO disminuye el gasto cardíaco y causa bradicardia como respuestas iniciales para moderar los niveles de oxígeno, incrementa la resistencia vascular sistémica por el incremento de la presión atmosférica, esto provoca a su vez un cambio transitorio de la circulación de la

sangre sistémica a la pulmonar por lo que incrementa el volumen de sangre pulmonar, la presión arterial y venosa pulmonar, a su vez aumenta la presión arterial sistémica lo que incrementa el flujo sanguíneo en tejidos isquémicos, y contrarresta el daño por reperfusión (Allen, Demchenko, & Piantadosi, 2009) e incrementa el flujo sanguíneo en tejidos isquémicos, y contrarresta el daño por reperfusión. Además, inhibe la reproducción de microorganismos anaeróbicos y micro-aerofílicos. Actualmente se han reportado beneficios del oxígeno hiperbárico (HBO) como terapia principal o conjunta en diversas lesiones y condiciones médicas agudas (Intoxicación por monóxido de carbono, enfermedad de descompresión, embolismo graso, gangrena gaseosa, isquemia periférica traumática aguda, lesiones por aplastamiento, infecciones necrotizantes progresivas, insuficiencia arterial periférica, envenenamiento con cianuro y osteoradionecrosis) y crónicas (Actinomicosis, preservación de injertos de piel, lesiones de extremidades inferiores en pacientes diabéticos y osteomielitis refractaria crónica) (Singh & Gambert, 2014). Además la HBO ha demostrado estimular la neovascularización en injertos, heridas y tejidos irradiados a través de la generación de ROS (radical superóxido y peróxido de hidrogeno) los cuales actúan como moléculas de señalización celular capaces de estimular la proliferación celular endotelial, mejorando el flujo sanguíneo y disminuyendo el tejido isquémico (Yogarathnam et al., 2006). Adicionalmente estudios experimentales en ratas han descrito un posible rol protector de la HBO en la lesión por isquemia reperfusión miocárdica, desencadenado probablemente por el mecanismo de los ROS cuya evidencia sugiere que puede involucrar la activación de PKC y modulación de la eNOS incrementando la producción de NO, regulando a la baja las moléculas de adhesión celular particularmente la ICAM-1 y selectina-P e inhibiendo la función de CD11a/18 previniendo la adhesión neutrofílica dando lugar a una disminución de la peroxidación lipídica membranal, disminuyendo la lesión e inflamación en la pared microvascular, el potencial de la HBO para inducir neovascularización, e incrementar la proliferación de células angiogénicas, y recientemente demostrar que moviliza las células progenitoras endoteliales de la medula (Sunkari et al., 2015). puede promover la reparación del daño del endotelio

vascular, ambos mecanismos podrían explicar la interrupción de la progresión de la arterioesclerosis como se ha reportado en pacientes tratados con HBO en los que ha disminuido la incidencia de angina (Yogarathnam et al., 2006), igualmente la terapia de HBO está relacionada con un aumento adaptativo en la actividad y expresión de las defensas antioxidantes (catalasa y superóxido dismutasa) lo que reduce la producción de radicales libres y la muerte en las células miocárdicas por la subsecuente anoxia-reoxigenación (Kim et al., 2001). Por lo que ha sido propuesta como una nueva terapia para tratar la isquemia miocárdica.

Efectos adversos, oxidantes y protectores de la HBO.

Además de estos efectos, el estrés oxidativo mediado por oxígeno hiperbárico también ha demostrado estimular la producción de factores de crecimiento, esto es debido al aumento en la síntesis y estabilización de los factores de transcripción HIF. Como ya se mencionó anteriormente, la expresión y regulación de HIF1 α está estrechamente regulada, y su degradación y ubiquitinación ocurre cuando la célula tiene concentraciones de oxígeno adecuadas. Sin embargo, en condiciones hipóxicas o normoxicas, los radicales libres son requeridos para la expresión de HIF y su estabilización, por lo que el oxígeno hiperbárico incrementa los niveles de HIF1 y HIF2 en células progenitoras vasculares debido al incremento de los ROS. Una de las consecuencias del incremento de los ROS es el incremento en la producción del antioxidante tioredoxina, la tioredoxina reductasa. La tioredoxina actúa como un factor de transcripción responsable de promover la expresión de HIFs. Otro mecanismo fisiológico de estrés oxidativo que actúa por la misma vía es el metabolismo del lactato. (Thom, 2011)

Sin embargo, y a pesar de los beneficios descritos de la HBO, no debemos dejar a un lado sus efectos adversos, los cuales engloban lesiones pulmonares ocasionadas por un cambio transitorio de la circulación de sangre sistémica a la pulmonar por lo que incrementa el volumen de sangre en un sistema de baja presión, aumentando así la presión arterial y venosa pulmonar provocando ruptura de capilares, edema pulmonar rico en proteínas y daño de la barrera alveolo-capilar (Allen et al., 2009), efectos en sistema nervioso central manifestados por crisis convulsivas tónico-clónicas secundarias a la vasoconstricción y disminución del

flujo sanguíneo cerebral generado por la hiperoxia (Thom, 2009) y miopía reversible por la descarga parasimpática tras la activación de los quimiorreceptores del cuerpo carotideo (Jain, 2017). Dentro de sus efectos oxidantes secundarios a la producción de ROS, el más importante es el daño oxidativo del DNA, afortunadamente, este daño solo fue detectado tras la primera sesión de HBO lo que indica un aumento en las defensas antioxidantes desde la primera exposición (Yogarathnam et al., 2006), e incluso cuando no se produce daño del DNA en la primera sesión, las defensas antioxidantes ya están presentes y las células están casi completamente protegidas para la segunda sesión, indicando que el daño al DNA no es el gatillo para el desarrollo de la protección adaptativa y existen otros mecanismos de inducción quizás a través de la vía PKC (Rothfuss & Speit, 2002). Igualmente la exposición a hiperoxia es bastante breve en los protocolos actuales (2h/día) a una presión de 2.0 a 2.4 atmósferas absolutas, por lo que estudios demuestran que las defensas antioxidantes (enzimas como superóxido dismutasa, catalasa, tioredoxinas, peroxidasa dependiente de glutatión, reductasas y antioxidantes no enzimáticos como la vitamina C, vitamina E, glutatión, ácido úrico, beta-caroteno y caroteno) son suficientes, de tal manera que el estrés bioquímico relacionado al incremento de ROS es reversible (Thom, 2009).

2.12 HBO EN EL IAM.

El HBO hiperbárico ha mostrado ser beneficioso en una serie de condiciones caracterizadas por isquemia y sus beneficios durante un IAM en curso han sido reportados por una serie de estudios preclínicos y clínicos en donde parece reducir la cantidad de cardiomiocitos infartados (Wijesinghe et al., 2008).

A una concentración del 100% y 2.5 atmósferas absolutas, la presión de oxígeno en sangre sube de 100mmHg (con oxígeno al aire ambiente) a 2200mmHg. A estas dosis se ha establecido que la terapia con HBO a nivel miocárdico puede ser favorable (Rawles & Kenmure, 1976)(Kenmure, Beatson, Cameron, & Horton, 1971)

Se han reportado los siguientes beneficios del uso de la terapia con HBO en el IAM en curso: 1) Disminución del área de infarto miocárdico, 2) Disminución de las

concentraciones séricas de GPT y GOT, y 3) Mejoría de los parámetros hemodinámicos (Davidson, Ramo, Wallace, Whalen, & Starmer, 1973)(McNulty, 2004).

2.13 NITROGLICERINA EN EL IAM

La nitroglicerina (trinitrato de glicerilo) es un fármaco del grupo de los nitrovasodilatadores o donadores de óxido nítrico utilizado para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, entre ellas, urgencias hipertensivas, cardiopatía isquémica e insuficiencia cardíaca. Fue descubierta a partir de glicerina, ácido nítrico, ácido sulfúrico y corriente de agua fría en 1847 por el italiano Ascanio Sobrero y utilizada como un explosivo muy inestable. Sus efectos terapéuticos fueron descubiertos cuando se encontró que los trabajadores que la manipulaban en la industria de los explosivos sentían dolores de cabeza. Tras investigaciones subsecuentes se encontró que los dolores de cabeza se debían a la capacidad de la nitroglicerina de producir una marcada vasodilatación. A pesar de que el fármaco ya era utilizado desde 1879 por el Dr. William Murrell del Hospital de Westminster en Londres para el alivio del ataque anginoso agudo (Tfelt-Hansen & Tfelt-Hansen, 2009), fue a partir de la década de los 70s del siglo pasado cuando se empezó a dilucidar su mecanismo de acción y otros efectos cuando se descubrió que el metabolismo hepático de los nitratos liberaba óxido nítrico (ON), investigaciones por las que Robert Furchgott, Ferid Murad y Louis J. Ignarro recibieron el premio nobel en 1998. La nitroglicerina puede disminuir los síntomas y signos de isquemia miocárdica al disminuir la precarga ventricular izquierda e incrementar el flujo sanguíneo coronario sin embargo no ha demostrado atenuar la lesión miocárdica asociada a oclusión epicárdica de las arterias coronarias a menos que el vasoespasmo juegue un rol importante en la patología. Puede ser útil para tratar pacientes con STEMI, hipertensión o falla cardíaca, pero está contraindicada en pacientes con hipotensión, bradicardia o taquicardia marcada, infarto ventricular derecho y tras el uso de inhibidores de la fosfodiesterasa 5 24 horas antes (O’Gara et al., 2013) . La Nitroglicerina presenta un metabolismo hepático intenso de primer paso, así como vascular por la enzima aldehído deshidrogenasa 2 mitocondrial

(ALDH2m) también conocida como nitrato reductasa orgánica dependiente de glutatión a través de una reacción de desnitración en la cual los nitratos se convierten en nitritos y se forman compuestos activos como el radical libre ON (Óxido nítrico) y los S-nitrosotioles (liberan óxido nítrico) así como sustancias conjugadas con glutatión menos activas como 1,3/ 1,2 gliceril dinitrato y gliceril mononitrato, el eritrocito también juega un papel importante en su biotransformación por un proceso enzimático dependiente de sulfhídrido y una interacción con la hemoglobina reducida formando el complejo hemoglobina-ON (Katzung, Masters, & Trevor, 2012). La vida media de la Nitroglicerina IV es de 1-4 minutos y sus metabolitos tienen una vida media de 2 horas. El inicio de acción y la duración del efecto varían dependiendo de la vía de administración, para el inicio de acción IV: 1-2 minutos, Sublingual:1-3 minutos, VO: 1 hora, Tópica 30 minutos, para la duración IV:3-5 minutos, Sublingual:30-60 minutos, VO:8-12 hrs y Tópica: 8-24 hrs. Su fijación a proteínas es del 60%, la nitroglicerina y sus metabolitos glucoroconjugados son excretados por vía urinaria (Hill et al., 2017). Un estudio previo que demostró disminución en el área de infarto en corazones de perro a los cuales se les indujo un IAM y posteriormente se les administro nitroglicerina intravenosa, sugiere que la protección miocárdica por la nitroglicerina no depende de la disminución en las demandas de oxígeno miocárdico, más bien del incremento en la circulación colateral resultante de un efecto vasodilatador directo en el árbol coronario. (Jugdutt et al., 1981).

3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe en la actualidad que los tratamientos más aceptados en el IAM son la angioplastia coronaria como primera opción terapéutica, y la fibrinólisis, mismos que son recomendados dentro de las primeras 12 horas de haberse instalado el evento isquémico (O’Gara et al., 2013). Si se sobrepasa este tiempo de ventana terapéutica en el IAM, sobreviene la insuficiencia cardiaca isquémica, cuya mortalidad es alta y directamente proporcional a la cantidad de tejido necrótico involucrado.

En la actualidad las terapias proangiogenicas son una estrategia prometedora para el tratamiento del infarto agudo al miocardio, debido a que la formación de novo de microvasculatura tiene el potencial de salvar miocardio isquémico a etapas tempranas después del IAM y es esencial para prevenir la transición a falla cardiaca a través del control de la hipertrofia y contractilidad del cardiomiocito.

Si bien la terapia con oxígeno hiperbárico (HBO) en el IAM en curso pareciera tener una influencia positiva en la neovascularización del cardiomiocito comprometido, existen pocos estudios que demuestren su utilidad.

Por otro lado, el óxido nítrico ha demostrado ser una molécula crucial en el proceso de angiogénesis de dos formas principales, al estabilizar HIF1- α de forma directa y en consecuencia favoreciendo la expresión de VEGF, y al incrementar la expresión de genes angiogénicos tras desencadenar la activación de su cascada de señalización.

4. JUSTIFICACIÓN

En México y a nivel mundial, la primera causa de muerte en la población son las enfermedades cardiacas y de estas, la patología coronaria ocupa el primer lugar. En la actualidad la angioplastia coronaria percutánea y la trombólisis son las medidas terapéuticas principales para su tratamiento, sin embargo, pocos pacientes son sometidos a las mismas debido a la falta de recursos y personal para llevarlas a cabo, por lo que la gran mayoría de los pacientes que sufren de un IAM evolucionan sin recibir ningún tratamiento, por lo que generan muchas comorbilidades, entre ellas, la insuficiencia cardiaca. Es por eso que la búsqueda de nuevas estrategias terapéuticas que permitan mejorar la calidad de vida de los pacientes que no fueron

sometidos a la angioplastia o trombólisis ha tomado gran importancia, y de ellas, las terapias proangiogenicas como la HBO y la nitroglicerina son alternativas viables que deben ser investigadas.

5. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Se disminuye el área miocárdica infartada y cuáles son los efectos angiogénicos que presentaran las ratas tratadas con las terapias propuestas (nitroglicerina vía transdérmica, la terapia de oxigenación hiperbárica y la combinación de ambas) en un modelo de IAM en rata?

6. HIPÓTESIS

“La terapia de oxigenación hiperbárica, la nitroglicerina y la terapia dual, disminuyen el área miocárdica infartada y promueven cambios proangiogenicos, estimulando la neovascularización del tejido isquémico cardiaco”

7. OBJETIVOS

7.1. OBJETIVO GENERAL

-Analizar los cambios proangiogenicos que ejercen la terapia de oxigenación hiperbárica, la nitroglicerina y la terapia combinada, durante la etapa proliferativa de reparación miocárdica en un modelo de IAM en rata.

7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

-Evaluar si las terapias propuestas (oxígeno hiperbárico, nitroglicerina y terapia dual), son capaces de reducir el tamaño del infarto en el corazón de la rata después de un infarto agudo al miocardio.

-Identificar si el tratamiento con oxígeno hiperbárico, nitroglicerina y la combinación de ambas, incrementan los botones vasculares marcados con VEGFR-2 mediante inmunohistoquímica en el tejido necrótico en el corazón de la rata tras un IAM.

-Determinar si el tratamiento con oxígeno hiperbárico, nitroglicerina y la combinación de ambas, incrementan el número de células endoteliales proliferantes CD34+ mediante inmunohistoquímica en el tejido necrótico en el corazón de la rata.

-Analizar la expresión de ERK 1/2 a través de inmunohistoquímica.

8. MATERIAL Y MÉTODOS

8.1 TIPO DE ESTUDIO

Se trata de un estudio preclínico fase 0, experimental, prospectivo, analítico y transversal. Este estudio se realizó en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental perteneciente a Sección de Estudios de Posgrado e Investigación (SEPI) de la Escuela Superior de Medicina (ESM) del Instituto Politécnico Nacional (IPN), en el período de enero del año 2017 a diciembre del 2019, de acuerdo a un cronograma implementado para ello.

8.2. MODELO EXPERIMENTAL

8.2.1. Animales

El estudio experimental se realizó en ratas Wistar machos cuyo peso varió entre 350 a 400gr. Las ratas fueron obtenidas del bioterio de la ESM del IPN y trasladadas para ser mantenidas bajo condiciones fisiológicas en el Laboratorio de Farmacología Cardiovascular y Medicina Hiperbárica Experimental. Se les conservó en jaulas con su debida alimentación según demanda (agua y alimento sintético para roedores en base a proteínas, grasa, fibra, Ca y P). Las jaulas tuvieron aserrín para facilitar el manejo de orina y excretas, y se encontraron a una temperatura ambiente (entre 28 a 32°C) de acuerdo a la NOM- 062- ZOO-1999. Desde estas jaulas, las ratas fueron extraídas para los procedimientos experimentales (IAM experimental y/o terapia con HBO y/o nitroglicerina), y devueltas para su conservación hasta el momento en el que se determinó su eutanasia.

8.2.2. Formación De Grupos



FIG.15 Grupos de experimentación.

Las ratas de estudio fueron divididas en los siguientes 6 grupos: Grupo A (Control), Grupo B (Controles IAM), Grupo C “Sham” (Cirugía sin IAM y sin terapia), Grupo D (IAM con HBO), Grupo E (IAM con Nitroglicerina) Grupo F (IAM con Nitroglicerina y HBO). Cada uno de los cinco grupos de estudio estuvo conformado por 6 ratas con una muestra total de 36 ratas. (**Fig.15**)

Las ratas fueron aleatoriamente asignadas a cada uno de los seis grupos de experimentación de acuerdo a las siguientes características:

8.2.2.1. Grupo A (Controles), las ratas de este grupo fueron intervenidas para producirles un IAM ni a ningún tratamiento.

8.2.2.2. Grupo B (Controles IAM), las ratas de este grupo fueron intervenidas a través de una toracotomía anterolateral izquierda para inducirles un IAM experimentalmente un IAM antero-septo-apical mediante la ligadura de la arteria descendente anterior (DA) del corazón con hilo de polipropilene 7-0 a nivel del borde inferior de la orejuela izquierda.

8.2.2.3. Grupo C “Sham” (Cirugía, no IAM, no terapia), Las ratas de este grupo fueron intervenidas a través de una toracotomía anterolateral izquierda sin inducirles experimentalmente un IAM.

8.2.2.4. Grupo D (IAM con HBO). Las ratas de este grupo fueron intervenidas a través de una toracotomía anterolateral izquierda para inducirles experimentalmente un IAM antero-septo-apical mediante la ligadura de la arteria descendente anterior (DA) del corazón con sutura polipropilene calibre 7-0 a nivel del borde inferior de la orejuela izquierda. Tras el IAM, serán sometidas a terapia con HBO al 100% con 2 atmósferas de presión por el lapso de una hora. Se realizarán 3 sesiones de terapia con HBO en total.

8.2.2.5. Grupo E (IAM con nitroglicerina). Las ratas de este grupo fueron intervenidas a través de una toracotomía anterolateral izquierda para inducirles experimentalmente un IAM antero-septo-apical, con las mismas características ya descritas para el Grupo B, tras la cirugía, se les aplico el parche de Nitroglicerina en el área dorso-cervical con las características mencionadas en el diseño experimental.

8.2.2.6. Grupo F (IAM con Nitroglicerina y HBO). Las ratas de este grupo fueron intervenidas a través de una toracotomía anterolateral izquierda para inducirles experimentalmente un IAM antero-septo-apical, con las mismas características ya descritas para el Grupo B, tras la cirugía, se les aplicara el parche de Nitroglicerina en el área dorso-cervical con las características mencionadas en el diseño experimental y serán sometidas a terapia con HBO al 100% con 2 atmósferas de presión por el lapso de una hora. Se realizarán 3 sesiones de terapia con HBO en total.

8.2.3. Modelo De Infarto Agudo Al Miocardio.

Se utilizó un modelo de infarto cardíaco agudo sin reperfusión en ratas Wistar macho de acuerdo a la literatura (Olivares R et al., 2012) como se describe a continuación:

- Anestesia por vía intraperitoneal con Xilazina 5 mg/kg y Ketamina a 40 mg/kg (Romero-Fernandez et al., 2016)
- Intubación orotraqueal y apoyo con ventilador mecánico (Ventilador Harvard Rodent Ventilator, Modelo 683) con un volumen de 2.5 a 3 ml de aire ambiental

(FiO₂=21%) a una frecuencia de 60 insuflaciones por minuto, durante el tiempo quirúrgico y hasta la recuperación anestésica.

- Toracotomía anterior en 4° espacio intercostal izquierdo.
- Pericardiectomia anterior con avulsión del pericardio mediante tracción mecánica.
- Ligadura de la arteria descendente anterior delante del borde inferior de la orejuela izquierda, colocando un punto de sutura con prolene vascular 7-0.
- Aspiración de la cavidad torácica mediante succión directa.
- Cierre del tórax izquierdo con puntos de afrontamiento costal con prolene vascular 5-0 y planos musculares con mismo material y puntos simples. Piel con puntos simples de nylon 4-0.
- Aplicación de analgesia después del IAM experimental con tramadol a dosis de 40mg/kg por vía oral después de la extubación, y con reaplicación cada 24 horas. (Duvall, 2017)

8.2.4 Esquema De Administración Del Parche De Liberación Prolongada De Nitroglicerina

A las ratas del grupo E (IAM con Nitroglicerina) se les aplicó un parche de liberación prolongada de nitroglicerina a nivel dorso-cervical inmediatamente al término de la cirugía. La tasa de liberación del parche de nitroglicerina es linealmente dependiente del área del sistema aplicado; cada sistema libera aproximadamente 0.02 mg/hr de nitroglicerina por cada cm², Las tasas de liberación del fármaco in vivo fueron descritas en términos de droga liberada por 24 horas, en estos términos, los sistemas transdérmicos de nitroglicerina (Transderm Nitro) tienen una tasa de liberación de 2.5 mg/24 hrs (0.1 mg/hr), 5 mg/24 hrs (0.2 mg/hr), 10 mg/24 hrs (0.4 mg/hr), 15 mg/24hrs (0.6mg/hr), para los parches de 5, 10 (25mg), 20 (50 mg) y 30 cm² (75 mg) respectivamente. En las ratas que tienen indicado el parche de nitroglicerina se utilizara el esquema equivalente en humano del parche de 20 cm² que provee 0.4 mg/hr de nitroglicerina ya que ha demostrado en pruebas clínicas mucha mayor actividad antianginosa que placebo, en comparación con dosis menores con actividad escasamente significativa (Novartis Co., 2006), siendo su equivalente de liberación en rata de 160 ng/min ó 9.6 ug/hr por lo que a las 24hrs

tendremos una dosis total 0.23 mg de acuerdo a artículos previamente publicados (Calatayud et al., 1999), calculando el tamaño del parche a aplicar por la siguiente ecuación.

$$\text{Tamaño del parche en rata} = \frac{10\text{cm}^2 * 0.0096 \text{ mg/hr}}{0.2 \text{ mg/hr}} = 0.48 \text{ cm}^2$$

8.2.5 Terapia Con HBO

El grupo D (IAM con HBO) fue sometido a tratamiento con HBO y este se administró con un tiempo de exposición de 60 min cada sesión por día con oxígeno al 100%, a una presión atmosférica de 2 ATA en cámara hiperbárica experimental monoplasa (MISSA) de acuerdo a publicaciones de investigadores que también trabajan con cámara de HBO (Cabigas et al., 2006; Han et al., 2008; Vlahović et al., 2004), con las siguientes especificaciones:

La presurización se llevó a cabo en un periodo de 15 minutos, transcurridos los 60 minutos la despresurización se realizó en un tiempo de 15 minutos.

Después de este periodo los animales fueron sacados de la cámara y resguardados en su jaula.



Fig.16.- *Camara Hiperbarica Experimental del Laboratorio de Farmacologia Cardiovascular y Medicina Hiperbarica Experimental ESM-IPN*

8.2.6 Eutanasia

Al tercer día del IAM y/o la terapia con HBO y/o Nitroglicerina, la eutanasia de las ratas será realizada mediante la administración de pentobarbital sódico a una dosis de 120-210 mg/kg como se indica en la NOM-062-ZOO-1999, para posteriormente ser sometidas a disección del tórax para extraer el corazón, se escogió el tercer día para encontrar los cambios proangiogenicos en la fase proliferativa de la reparación cardiaca de acuerdo a la literatura (Frangogiannis, 2008). El resto del cadáver fue eliminado conforme a la normatividad de residuos peligrosos biológicos e infecciosos (RPBI) NOM-087-ECOL-SSA1-2002.

8.2.7 Medición De Variables Experimentales

Para medir el área infartada, una vez extraídos los corazones estos fueron cortados transversalmente desde el ápex a la base con cortes de 1 mm, e incubados a 38°C en 1% de cloruro de trifeniltetrazolium (TTC) por 10 min para permitir la delimitación del tejido necrótico, la medición se realizara entre los 5 y 6mm superiores al ápex ya que distintos autores reportan que en este corte transversal se refleja el tamaño del infarto de todo el ventrículo izquierdo, de la misma manera el estudio histológico e inmunohistoquímico se realizara en este corte ya que refleja la zona más representativa del infarto(Oh, Ono, Rockman, & Ross, 1993; Zornoff, Paiva, Minicucci, & Spadaro, 2008) (Kim et al., 2001). Con ayuda del software AxioVision, se calculó el área fibrótica resultante del infarto.

Para realizar las mediciones inmunohistoquímicas, los corazones fueron sometidos a una solución de formol bufferizado al 10% que ayudara a preservar el tejido, para luego realizar el estudio histológico del infarto. Las laminillas histológicas de los corazones fueron sometidos a la técnica de inmunohistoquímica (Ver **Anexo 2**) con anticuerpos contra VEGFR-2, CD34 y ERK 1/2 debido a que son las proteínas proangiogenicas con mayor importancia de acuerdo a la literatura. Posteriormente se usó un microscopio de inmunofluorescencia para detectar las células endoteliales de los botones de neovascularización de tejido infartado para cuantificarlas por campo de observación. Se hizo el conteo microscópico a 40 aumentos (40X) con técnica de

estereología por 10 campos y se sacara el promedio para cada espécimen de estudio.

Finalmente, una vez recabadas todas las variables estipuladas en este estudio en una planilla de recolección de datos, se hará un análisis estadístico para buscar la relación entre terapia con HBO y neovascularización del tejido miocárdico después de 6 horas de un IAM experimentalmente inducido.

8.3. DIAGRAMA DE FLUJO

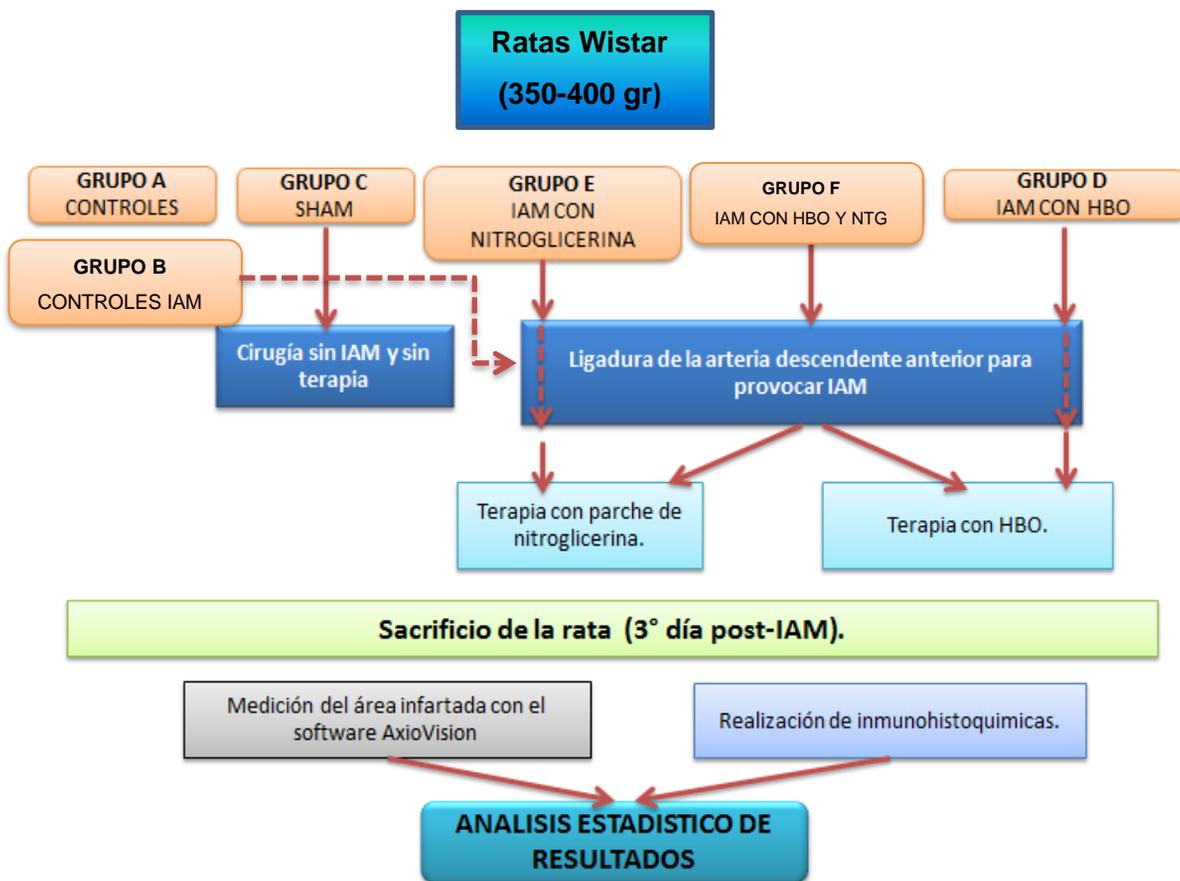


FIG.17.- Diagrama de flujo que muestra la metodología utilizada en la presente investigación.

8.4. VARIABLES

Tabla 5. Variables experimentales

Variable	Conceptualización	Operación- nalización	Tipo	Unidad de medida	Prueba Estadística
Variable independiente					
Oxígeno hiperbárico	Presencia o ausencia de terapia con oxígeno hiperbárico	Con o Sin Oxígeno hiperbárico	Cualitativa nominal dicotómica	-	
Nitroglicerina	Colocación o no del parche de liberación prolongada de Nitroglicerina	Con o Sin Parche de Nitroglicerina	Cualitativa nominal dicotómica		
Variables dependientes					
Área infartada	Medición computarizada del área infartada con un software (Axion Vision)	Identificación histológica del ancho por el largo de la zona infartada.	Cuantitativa continua	Milímetros cuadrados (mm ²)	ANOVA de una vía
Botones Vasculares VEGFR-2	Cantidad de botones vasculares estimados por estereología en un corte transversal de 1/3 medio a 6mm	Botones vasculares VEGFR-2 positivos por campo	Cuantitativa discreta	Botones vasculares por campo	ANOVA de una vía
Expresión de CD34	Cantidad células que expresan CD34 por estereología en un corte transversal de 1/3 medio a 5mm del ápex	Células que expresan CD34 por campo microscópico a 40X	Cuantitativa discreta	Células teñidas por campo	ANOVA de una vía
Expresión de ERK 1/2	Cantidad de células que expresan ERK por estereología en un corte transversal de 1/3 medio a 5mm del ápex	Células que expresan ERK por campo microscópico a 40X	Cuantitativa discreta	Células teñidas por campo	ANOVA de una vía

8.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos serán recolectados en hojas de evaluación prediseñadas para este efecto, y posteriormente serán vaciados en una planilla Excel, para ser procesados con los softwares estadísticos GraphPad Prism y SigmaPlot. Las variables continuas se presentan con medidas de tendencia central y de dispersión (promedio \pm desviación estándar con rangos de variabilidad mínimo y máximo). Para la comparación entre los tres grupos de estudio se usó la prueba de ANOVA de una vía cuando la distribución sea normal. Para las variables continuas sin distribución normal se usó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis. Los valores de p menores a 0.05 se consideraron como estadísticamente significativos. El análisis se realizó comparando los 5 grupos: Grupo A (Control), Grupo B (Controles IAM), y Grupo C “Sham” (Cirugía sin IAM y sin terapia) y Grupo D (IAM con HBO), Grupo E (IAM con Nitroglicerina), Grupo F (IAM con NTG y HBO)

8.6. CONSIDERACIONES ÉTICAS

El presente estudio fue evaluado por el CICUAL para dar cumplimiento a las normas éticas institucionales en el manejo y sacrificio de los animales de laboratorio. 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, Sagarpa; y la Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, National Research Council.

9. RESULTADOS

Se exponen los resultados de las variables macroscópicas y microscópicas que expresan con mayor objetividad el efecto de las terapias con oxígeno hiperbárico (HBO) y nitroglicerina sobre el infarto agudo de miocardio (IAM) experimentalmente inducido por ligadura de la arteria descendente anterior de las ratas Wistar.

9.1 RESULTADOS MACROSCÓPICOS

En la **Figura 18** se muestran las diferencias macroscópicas de los corazones de las ratas de los grupos de estudio Control y Sham (Grupo A y C). Se puede observar que la coloración exterior de ambos corazones es homogénea, sin adherencias pericárdicas ni depresiones en la pared cardíaca.

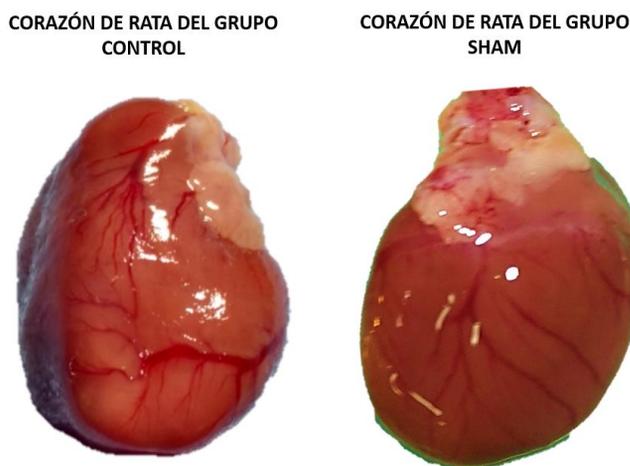


Fig.18.- Comparación macroscópica de los corazones de los grupos Control y Sham, ambos presentan el aspecto anatómico normal y sin alteraciones.

En la **Figura 19** se muestran los corazones de las ratas de los grupos IAM Control 3 días, IAM+HBO 3 Sesiones, IAM+NTG 3 días y IAM NTG+HBO 3 días (Grupos B, D, E y F). Se puede apreciar en los 4 grupos una morfología anormal, con presencia de tejido de granulación de color amarillo, así como áreas de depresión de la pared miocárdica a nivel del área de infarto, la cual está determinada por la arteria descendente anterior. El grupo que presentó los cambios morfológicos más visibles fue el grupo Control IAM (Grupo B), presentando una mayor extensión

del área con presencia de tejido de granulación, así como depresiones de la pared miocárdica.

En el caso de los grupos que fueron sometidos a las terapias propuestas, los cambios morfológicos continúan presentes, sin embargo, de manera menos evidente, las depresiones de la pared miocárdica no son apreciables, y el tamaño del área con tejido de granulación es menor. Cabe mencionar que en el caso del grupo IAM+NTG 3 días, el tejido de granulación se aprecia con una coloración amarilla menos intensa y difusa.

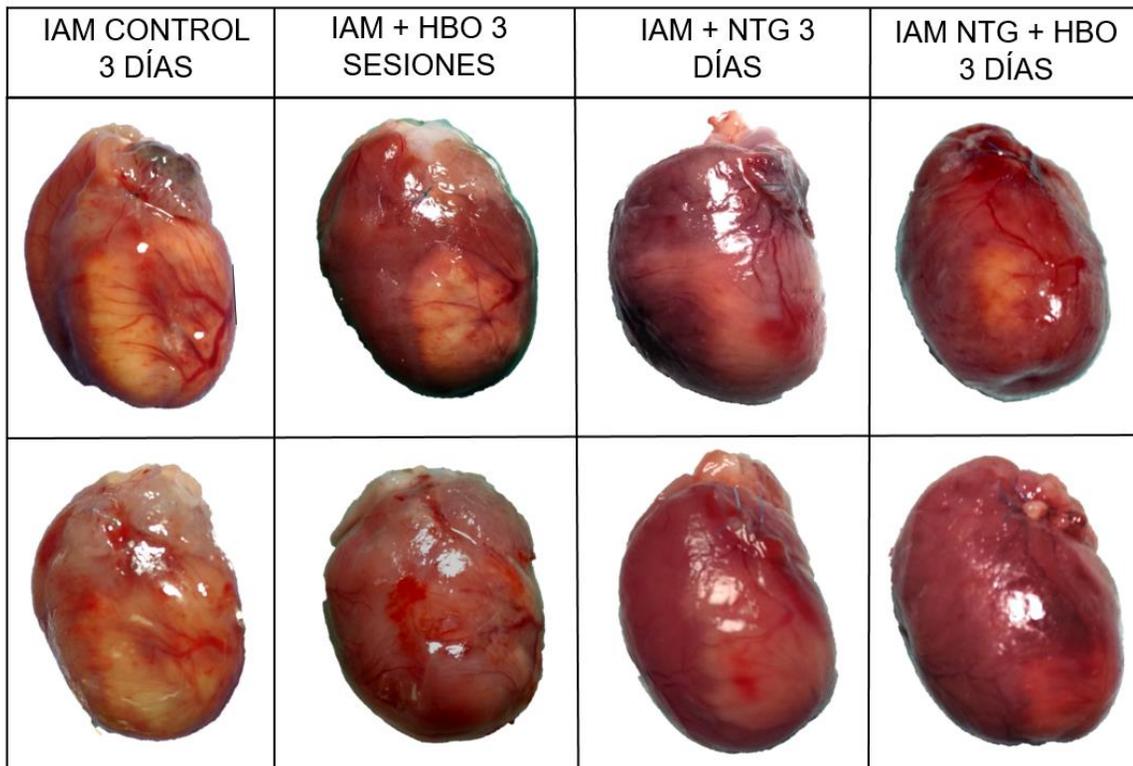


Fig.19.- Comparación macroscópica de los corazones control IAM y los que recibieron tratamiento, se puede apreciar con una coloración amarilla el tejido fibrótico secundario a la reparación miocárdica del tejido infartado.

Para objetivar el área de infarto como parte de los cambios morfológicos que se presentaron con la ligadura experimental de la arteria descendente anterior tras tres días de evolución, se realizó la tinción con solución de Trifeniltetrazolium de los cortes transversales de 2 mm de los corazones con lo que se delimitó el área infartada (**Fig. 20**) y se pudo medir a través del software AxioVision obteniéndose los valores que se muestran en la **Tabla 6**.

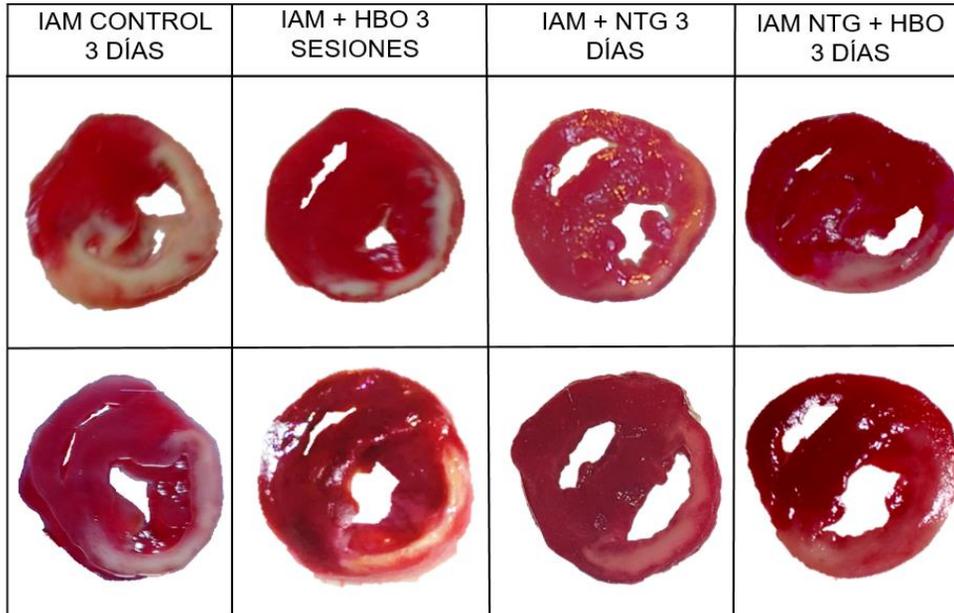
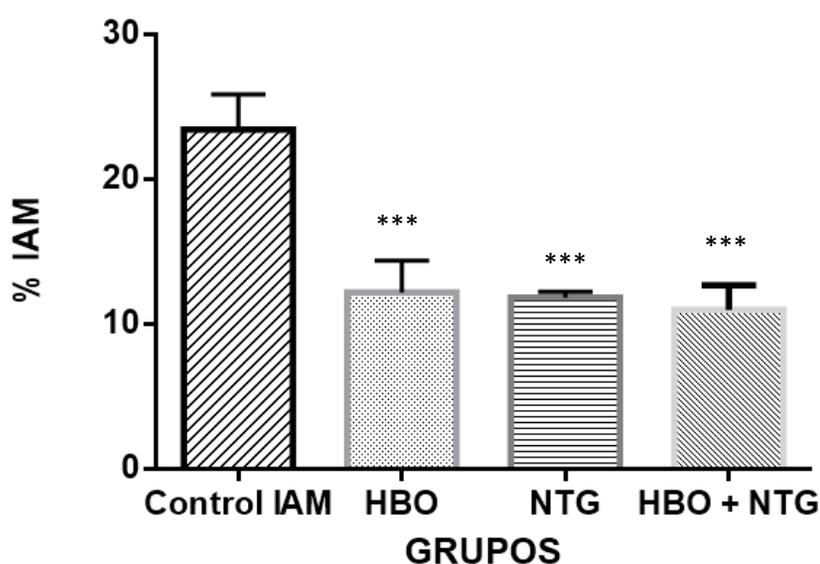


Fig.20.- Cortes de corazón post-IAM control y con tratamiento, teñidos con trifeniltetrazolium, para resaltar las áreas infartadas (Color blanco).

Tabla 6: Comparación del % del IAM entre los diferentes grupos de estudio, en la columna de la derecha se muestran los resultados del análisis estadístico.

GRUPO	Nº de rata	Área infarto (mm ²)	Área total (mm ²)	Porcentaje del IAM (%)	Porcentaje del IAM Media ± SEM
B (IAM Control 3 días)	1	90.885	368.655	24.653131	23.43 ± 1.398
	2	113.34	549.075	20.6419888	
	3	100.38	401.52	25	
D (IAM+HBO 3 SESIONES)	1	41.475	412.395	10.0571054	12.20 ± 1.269
	2	49.3275	341.4	14.448594	
	3	44.19	365.46	12.0916106	
E (IAM + NTG)	1	38.2725	328.9425	11.6350	11.83 ± 0.2296
	2	41.7495	339.636	12.2924	
	3	43.8525	378.825	11.5759	
F (IAM + NTG+ HBO 3 SESIONES)	1	52.8675	408.075	12.9553	10.98 ± 0.9886
	2	35.7675	356.3925	10.0359	
	3	40.395	406.185	9.9449	

En la Figura, se aprecia que el grupo Control IAM 3 días es el que presenta mayor área de infarto afectando la cara anterior y lateral del ventrículo izquierdo, así como el tabique interventricular, al hacer la medición con el Software, se determinó que la media del porcentaje del área infartada en los corazones de este grupo era de 23.43 ± 1.398 siendo aproximadamente el doble en comparación con los grupos que recibieron alguna de las terapias, IAM+HBO (12.20 ± 1.269), IAM+NTG (11.83 ± 0.229), IAM+HBO+NTG (10.98 ± 0.989). Al realizarse en análisis de varianza (ANOVA) se obtuvo una $p=0.0001$, con lo que podemos afirmar que existe una diferencia estadísticamente significativa entre el grupo control IAM vs los grupos IAM+HBO, IAM+NTG, IAM+NTG+HBO (B vs D, E, F) (**Grafica 1**).



Gráfica 1: Comparación del % de área miocárdica infartada entre el grupo control IAM vs IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG (B vs D, E y F). Los datos están expresados como medias \pm SEM para $n=3$. Los valores de p fueron determinados usando ANOVA con una prueba post-hoc tipo Tukey. *** $p<0.0001$

Al realizar el análisis Post-Hoc de tipo Tukey (**Tabla 7**) se determinó que los grupos que recibieron cualquiera de las tres terapias, HBO, NTG ó HBO+NTG, presentaron una reducción del área de infarto estadísticamente significativa ($p<0.001$ en los tres

casos) al compararlos con el grupo Control IAM 3 días. Por otro lado, no se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se realizó la comparación entre los grupos que recibieron terapias (HBO vs HBO+NTG: $p=0.85$, HBO vs NTG: $p=0.995$ y NTG vs HBO+NTG: $p=0.798$).

Tabla 7: Análisis post-Hoc (Tukey)			
Factores de comparación:			
GRUPOS	Diferencia de Medias	de P	P<0.050
IAM CONTROL vs. HBO+NTG	12.453	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. NTG	11.597	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. HBO	11.233	<0.001	SI
HBO vs. HBO+NTG	1.22	0.85	No
HBO vs. NTG	0.365	0.995	No
NTG vs. HBO+NTG	0.856	0.94	No

9.2 RESULTADOS MICROSCÓPICOS (INMUNOHISTOQUÍMICA)

9.2.1 CD34+ (Células Endoteliales Progenitoras)

Mediante el estudio inmunohistoquímico, se cuantifico el número de células endoteliales progenitoras CD34+ por campo óptico a una resolución de 40 aumentos (40x).

En el caso del grupo SHAM (C) (**Fig.21**), este no presento marcaje positivo ni cambios histopatológicos tras el análisis de los cortes.

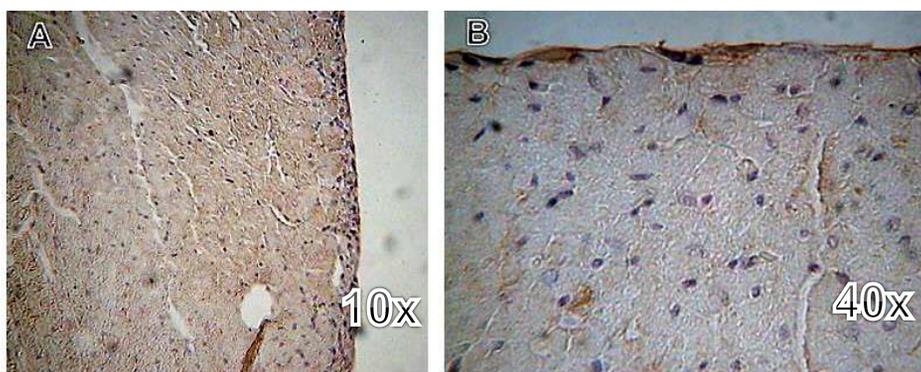


Fig.21.- Imágenes microscópicas de corazones de ratas del grupo Sham (C) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34, Los corazones de las ratas de este grupo no presentan área infartada y la tinción es por tanto negativa. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

En el caso de los grupos Control IAM, IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG (B,D,E,F) se pudo apreciar el marcaje positivo de las células CD34+. Por lo que se procedió al conteo de las mismas en 10 campos a 40x en cada una de las laminillas, para posteriormente realizar el análisis estadístico (**Tabla 8, 9 y Grafica 2**)

Cabe mencionar que las fotografías microscópicas mostradas son las más representativas y de mejor calidad de cada grupo de estudio sin ser necesariamente de las 6 muestras que conforman cada uno.

Control IAM (Grupo B)

Se aprecian (**Fig.22**) cambios histológicos derivados del infarto como son: el infiltrado leucocitario, perdida de la estructura histológica normal, friabilidad del tejido y células con marcaje CD34+ escasas (8.667 ± 0.494)

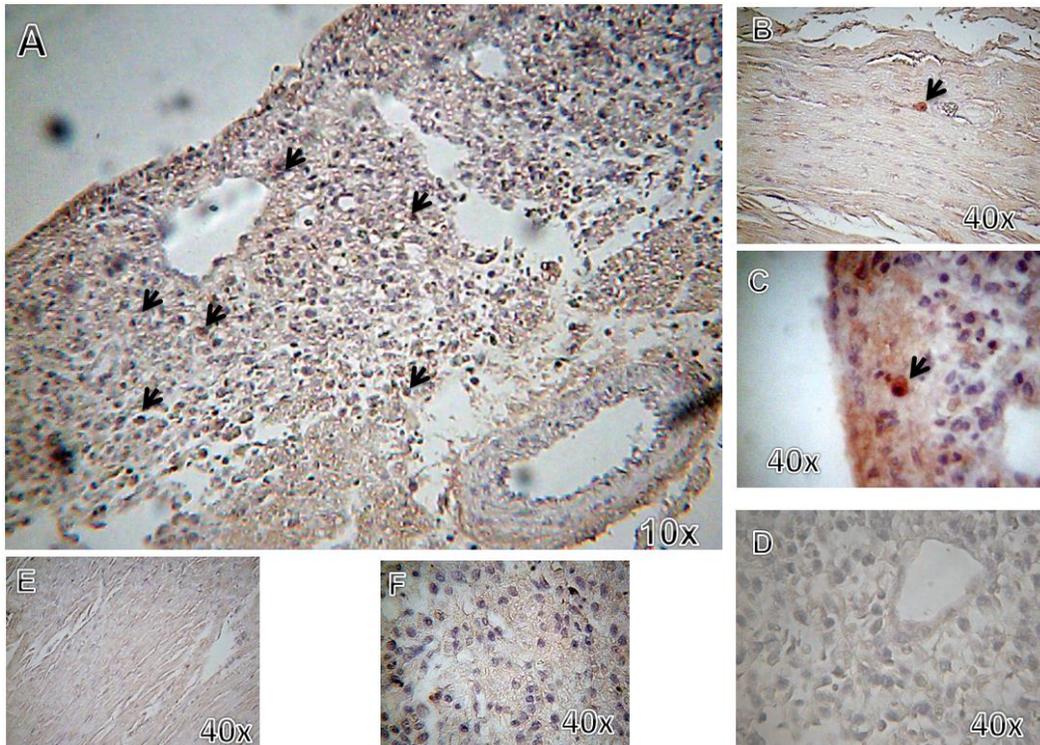


Fig.22.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo Control IAM (B) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34, las flechas negras indican las células con marcaje positivo. Imágenes A-F: Fotografías tomadas del área infartada. Imagen E: Área no infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

Grupo IAM+HBO (D)

También podemos observar (**Fig.23**) cambios histológicos derivados de la hipoxia tisular, sin embargo, el infiltrado leucocitario y la pérdida de la arquitectura normal del tejido son menores y el número de células CD34+ es mayor en comparación al grupo Control IAM con una diferencia de medias de 9.0

Grupo IAM+NTG (E)

La imagen microscópica (**Fig.24**) muestra una mayor cantidad de células CD34+ (36.833 ± 3.016) en comparación a los grupos mostrados anteriormente, la estructura histológica está más conservada que en el grupo Control IAM y además muestra una apariencia reticulada generada probablemente por los capilares en neoformación. El infiltrado leucocitario es mayor que en el grupo IAM+HBO.

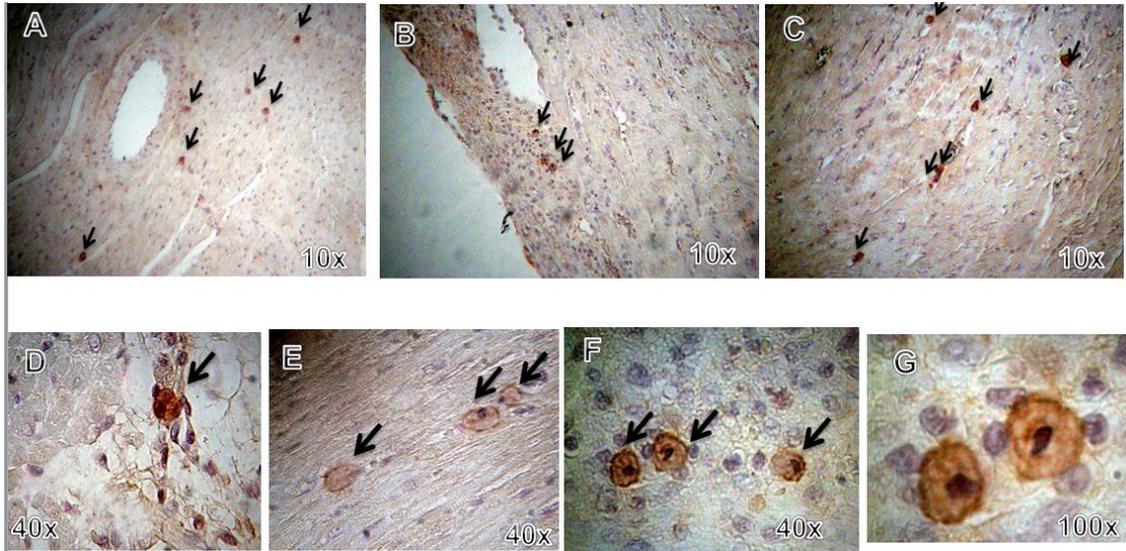


Fig.23.- Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+HBO (D) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34, las flechas negras indican las células con marcaje positivo. Imágenes A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

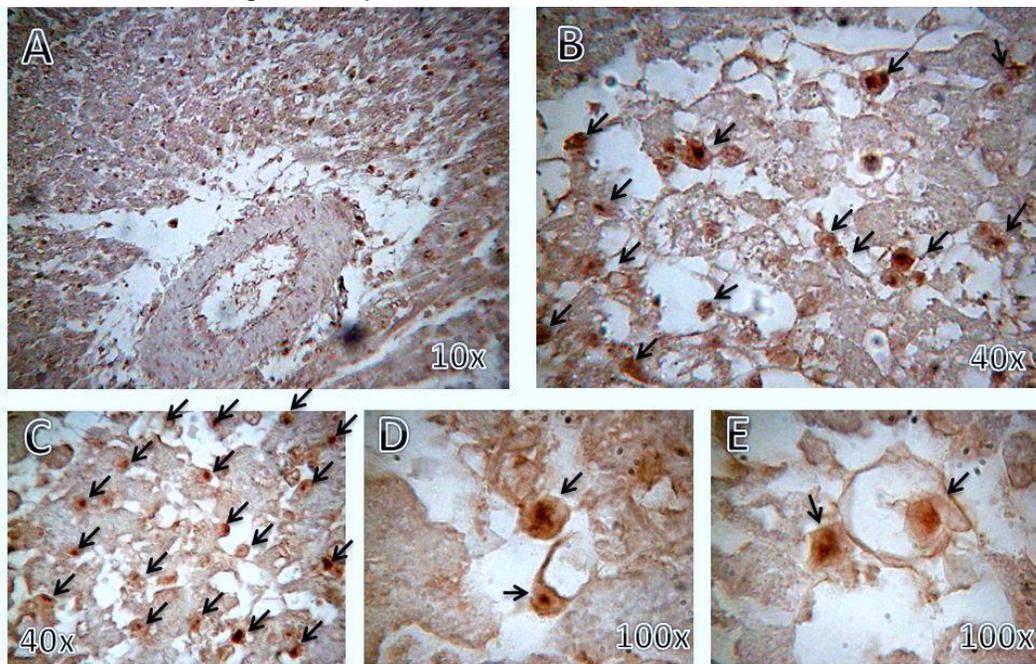


Fig.24.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+NTG (E) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34, las flechas negras indican las células con marcaje positivo. Imágenes A-E: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor vista de la foto.

Grupo IAM+HBO+NTG (F)

Es el grupo con mayor cantidad de células CD34+ (**Fig.25**) con una media de 41.667 ± 2.552 en 10 campos, la arquitectura del tejido se muestra nuevamente más conservada que en el Control IAM, y mantiene la característica reticular del grupo tratado con NTG.

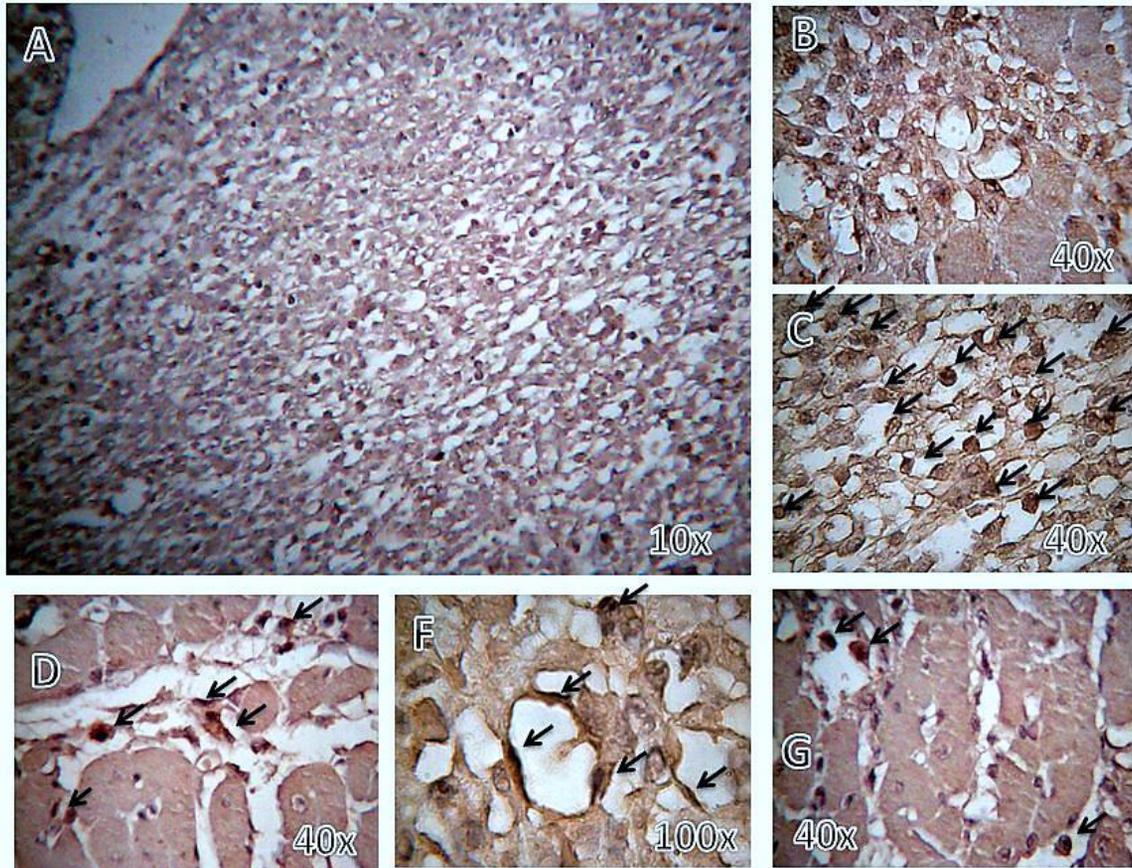
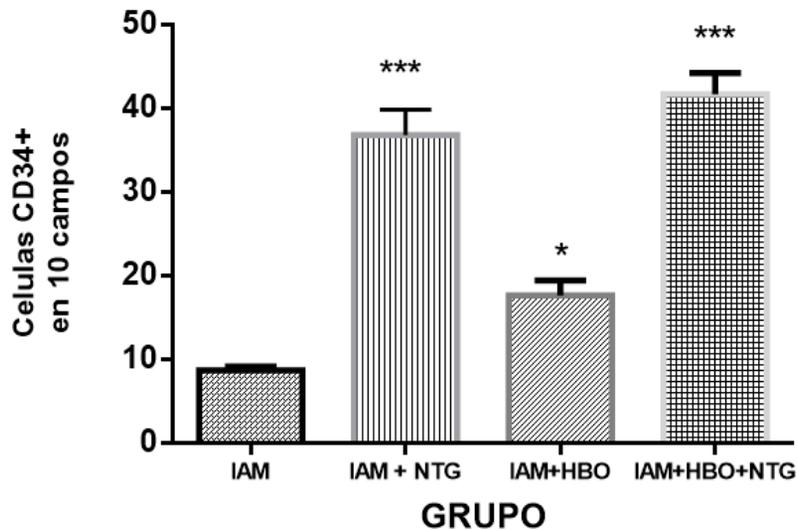


Fig.25.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+HBO+NTG (F) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de CD34, las flechas negras indican las células con marcaje positivo. Imágenes A-D: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor vista de la foto.

Tabla 8: Analisis estadístico del conteo de células CD34+ presentes en los corazones de las ratas de los grupos B, E, D y F.

GRUPO	n	Media ± SEM
Control IAM (B)	6	8.667 ± 0.494
IAM+NTG (E)	6	36.833 ± 3.016
IAM+HBO (D)	6	17.667 ± 1.764
IAM+HBO+NTG (F)	6	41.667 ± 2.552



Gráfica 2: Comparación del conteo de células CD34+ entre el grupo control IAM vs IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG (B vs D, E y F). Los datos están expresados como medias ± SEM para n=6. Los valores de p fueron determinados usando ANOVA con una prueba post-hoc tipo Tukey. ***p<0.0001, *p<0.01.

Al realizar el análisis de varianza se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo control IAM vs los grupos IAM+HBO, IAM+NTG, IAM+HBO+NTG (B vs D,E,F) ($p=0.0001$), por lo que se procedió a realizar el análisis Post-Hoc de tipo Tukey (**Tabla 9**) el cual nos muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa ($p<0.001$) entre la mayoría de los grupos, excepto en la comparación IAM+NTG vs IAM+HBO+NTG con una $p=4.8333$.

Tabla 9: Análisis post-hoc (Tukey)

FACTORES DE COMPARACIÓN:			
COMPARACIÓN	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	P<0.050
IAM CONTROL vs. IAM +HBO+NTG	33.000	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. IAM+NTG	28.167	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. IAM+HBO	9.000	<0.001	SI
IAM+HBO vs. IAM+HBO+NTG	24.000	<0.001	SI
IAM+HBO vs. IAM+NTG	19.167	<0.001	SI
IAM+NTG vs. IAM+ HBO+NTG	4.833	0.417	No

9.2.1 VEGFR-2 (Botones Vasculares)

Mediante el estudio inmunohistoquímico, se cuantifico el número de botones vasculares VEGFR-2+ por campo óptico a una resolución de 40 aumentos (40x).

En el caso del grupo SHAM (**Fig.26**), este no presento marcaje positivo ni cambios histopatológicos tras el análisis de los cortes.

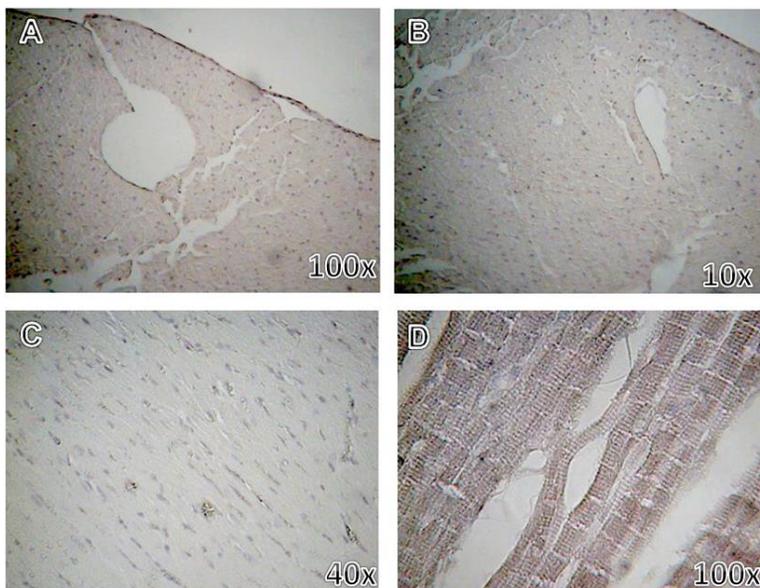


Fig.26.-Imágenes microscópicas de corazones de ratas del grupo Sham (C) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de botones vasculares marcados con VEGF-R2, Los corazones de las ratas de este grupo no presentan área infartada y la tinción es por tanto negativa. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

En el caso de los grupos Control IAM, IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG, se observó que presentaban la misma arquitectura histopatológica mencionada en las laminillas anteriores, además de la presencia de botones vasculares VEGFR-2+, Por lo que se procedió al conteo de las mismos en 10 campos a 40x en cada una de las laminillas, para posteriormente realizar el análisis estadístico (**Tablas 10,11 y Grafica 3**)

Control IAM (B)

Inmunohistoquímicamente, presentan marcaje positivo, lo cual representa la existencia de botones vasculares VEGFR-2+, con una media de 5.33 ± 0.615 , siendo

el grupo con menor conteo (**Fig. 27**).

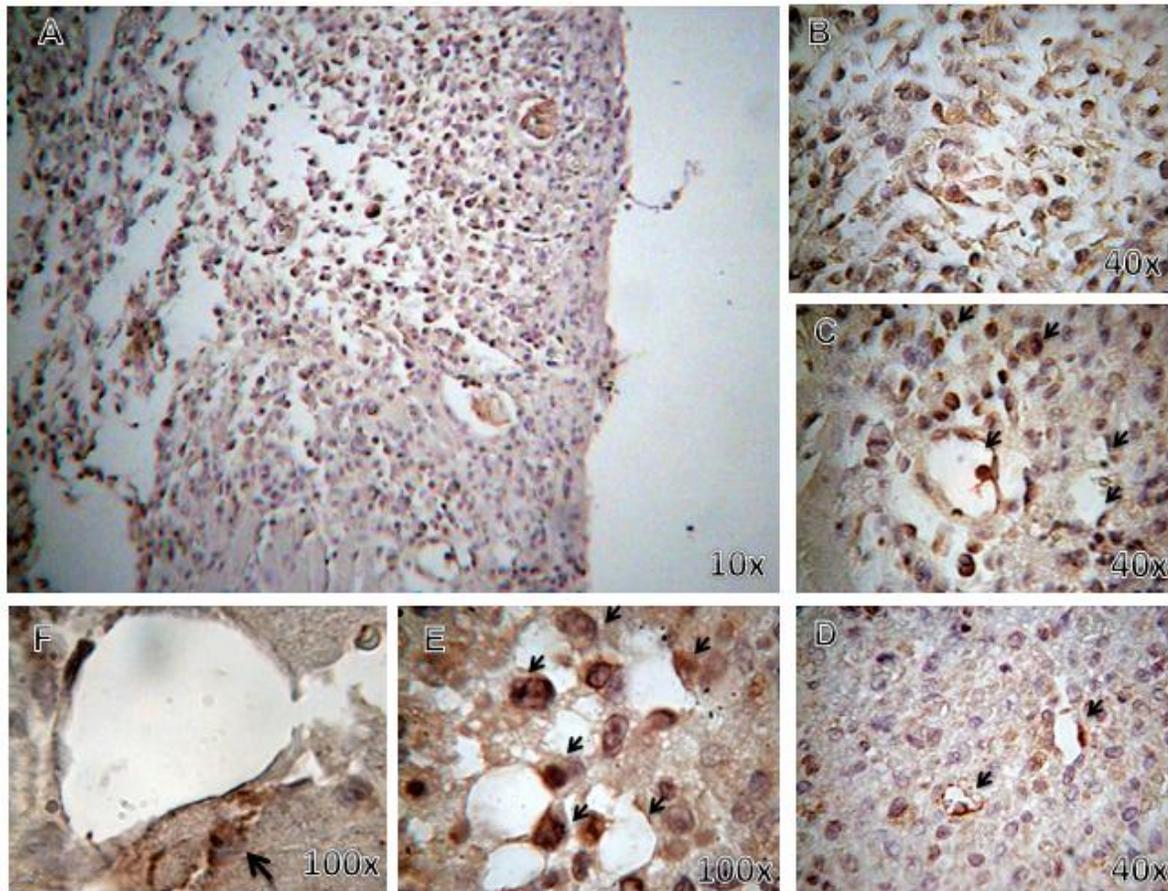


Fig.27.- Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo Control IAM (B) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de VEGFR-2, las flechas negras muestran los botones vasculares. A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

GRUPO IAM + HBO (D)

Las muestras de tejido cardíaco de ratas tratadas con HBO (media 16.167 ± 1.621) presentan aproximadamente 2 veces más botones vasculares VEGFR-2+ que el grupo Control IAM (**Fig.28**)

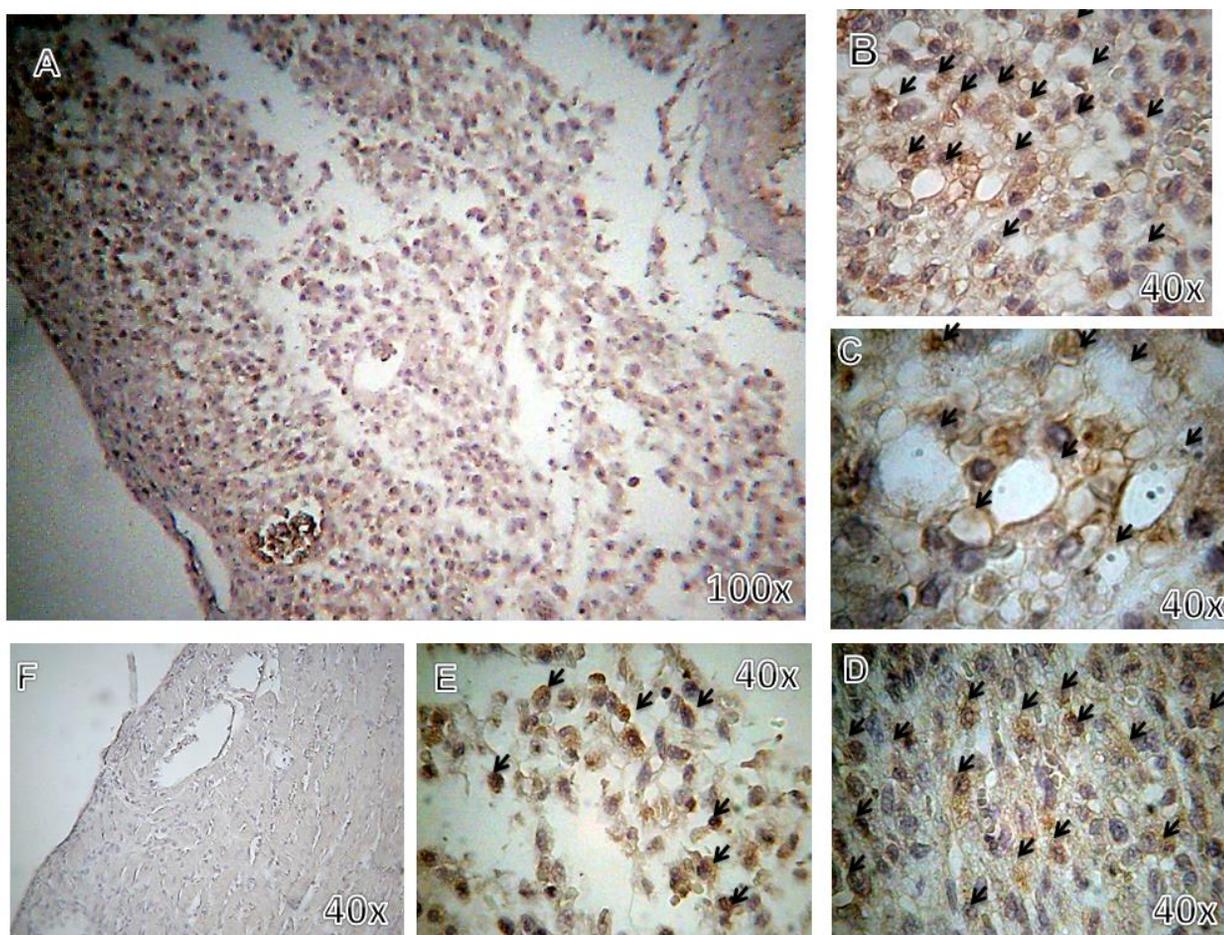


Fig.28.- Cortes microscópicas de corazones de ratas del grupo IAM+HBO (D) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de botones vasculares VEGFR-2+, las flechas negras indican los botones. A-E: Fotografías tomadas del área infartada. F: Fotografía tomada de un área no infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

GRUPO IAM+NTG (E)

Los corazones de las ratas tratadas con parche de liberación prolongada de nitroglicerina presentaron un marcaje muy intenso, principalmente en la zona con aspecto reticular previamente mencionada (**Fig.29**), la media del conteo de botones vasculares en 10 campos es de 24.667 ± 1.333 , superando al grupo tratado con HBO.

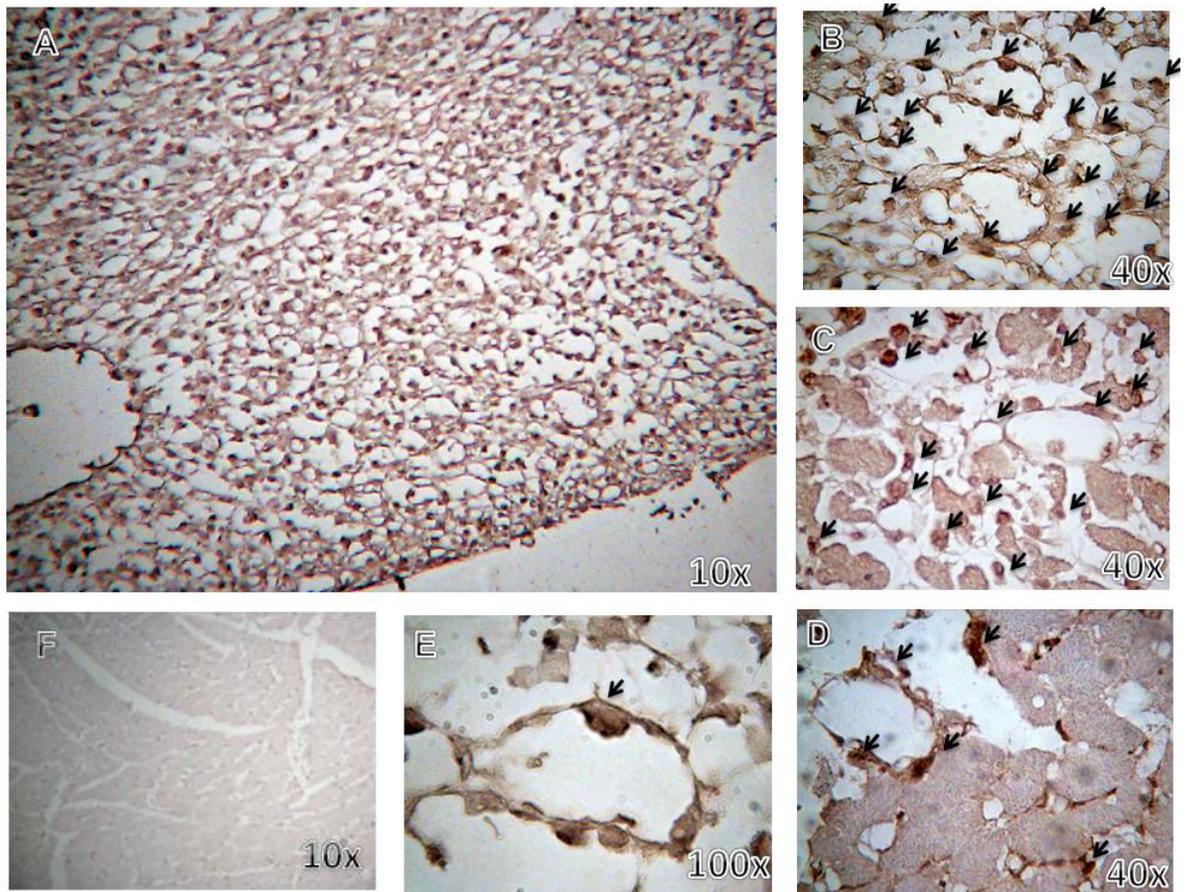


Fig.29.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+NTG (E) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de botones vasculares VEGFR-2+, las flechas negras muestran los botones vasculares. Imágenes A-E: Fotografías tomadas del área infartada, es importante notar la apariencia reticulada del tejido, a causa de la acelerada formación vascular. Imagen F: Fotografía tomada de un área no infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor

GRUPO IAM+HBO+NTG (F)

Histológica e inmunohistoquímicamente presenta características muy parecidas a las del grupo anterior, con marcaje positivo en la misma zona (**Fig.30**). Este grupo tiene el mayor conteo de botones vasculares (media de 31.500 ± 0.764).

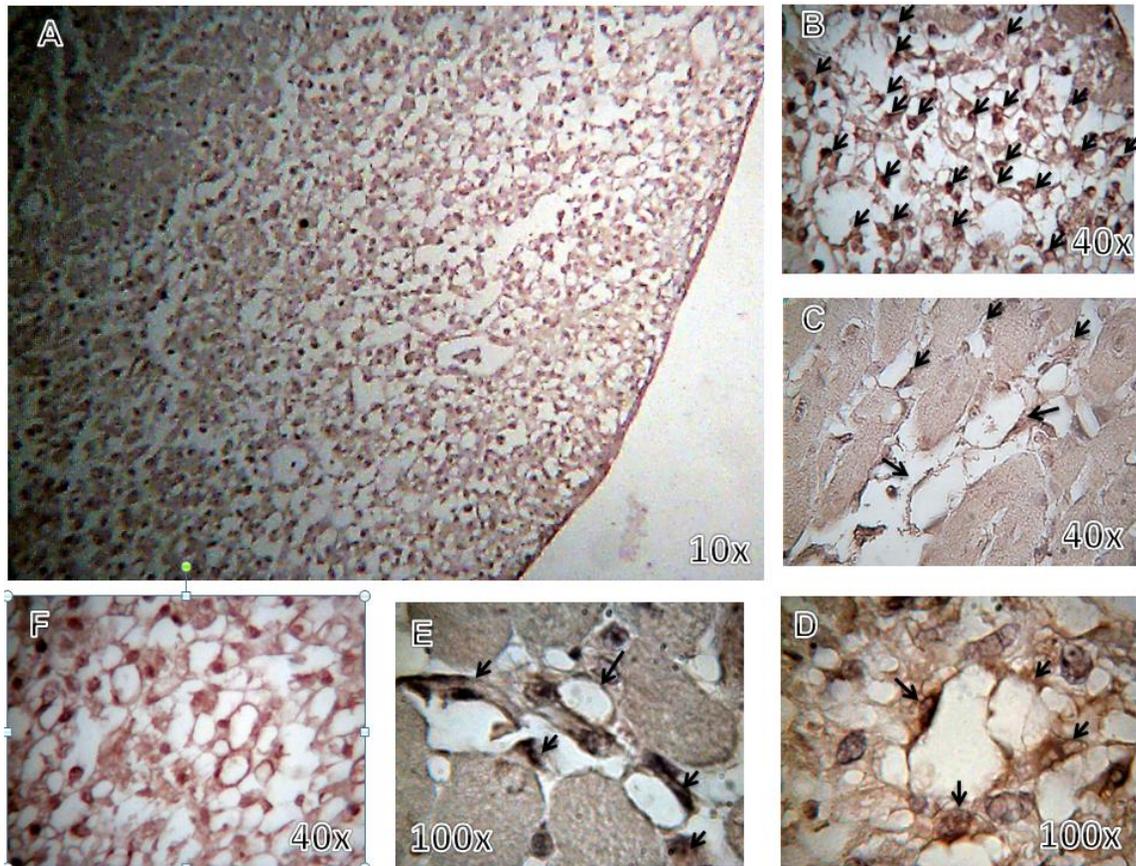
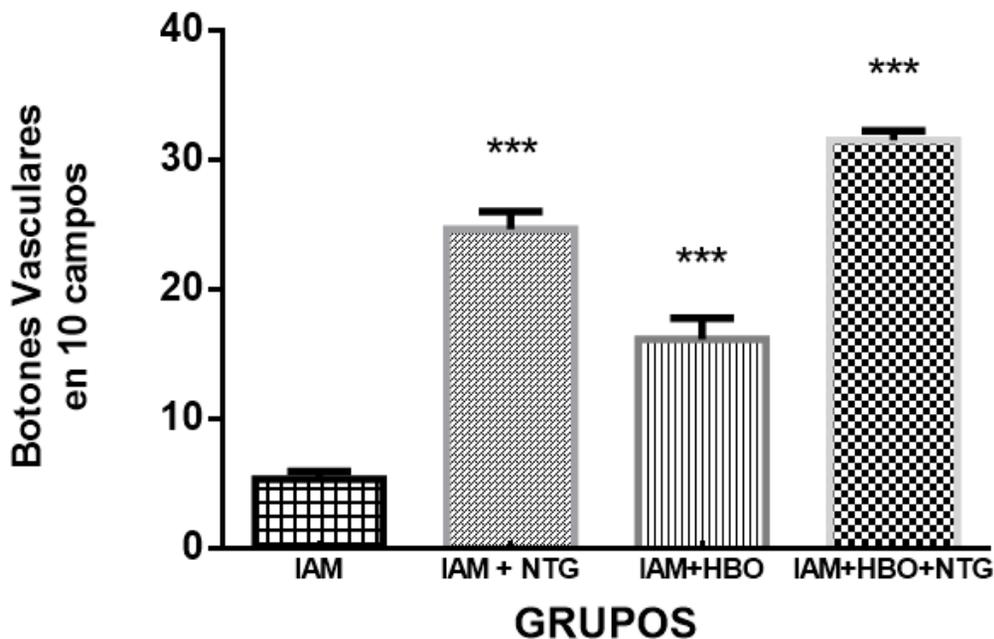


Fig.30.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+HBO+NTG (F) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de botones vasculares VEGFR-2+, las flechas negras muestran los botones. A-F: Fotografías tomadas del área infartada, de igual manera que en el grupo IAM+NTG (E), en estas fotografías se aprecia un aspecto reticulado del tejido a causa de la formación de neovasos. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor vista de la foto.

Tabla 10: Análisis estadístico del conteo de botones vasculares VEGFR-2+ presentes en los corazones de las ratas de los grupos B, E, D y F.

GRUPO	n	Media ± SEM
Control IAM (B)	6	5.333 ± 0.615
IAM+NTG (E)	6	24.667 ± 1.333
IAM+HBO (D)	6	16.167 ± 1.621
IAM+HBO+NTG (F)	6	31.500 ± 0.764



Gráfica 3: Comparación del conteo de botones vasculares VEGFR-2+, entre el grupo control IAM vs IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG (B vs D, E y F). Los datos están expresados como medias ± SEM para n=6. Los valores de p fueron determinados usando ANOVA con una prueba post-hoc tipo Tukey. ***p<0.001.

Al realizar el análisis de varianza se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo control IAM vs los grupos IAM+HBO, IAM+NTG, IAM+HBO+NTG (B vs D,E,F) ($p=0.0001$), por lo que se procedió a realizar el análisis Post-Hoc de tipo Tukey (**Tabla 11**) el cual nos muestra que existe una diferencia estadísticamente significativa entre todos los grupos.

La terapia dual (HBO+NTG) presentó la mayor cantidad de botones vasculares (31.500±/0.615).

TABLA 11: Análisis Post-Hoc (Tukey)**FACTORES DE COMPARACIÓN:**

COMPARACIÓN	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	P<0.050
IAM CONTROL vs. IAM +HBO+NTG	26.167	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. IAM+NTG	19.333	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. IAM+HBO	10.833	<0.001	SI
IAM+HBO vs. IAM+HBO+NTG	13.238	<0.001	SI
IAM+HBO vs. IAM+NTG	8.500	<0.001	SI
IAM+NTG vs. IAM+ HBO+NTG	6.833	0.003	SI

9.2.3 ERK1/2 (Marcador de proliferación celular)

Se cuantifico el número de células ERK1/2+ por campo óptico a una resolución de 40 aumentos (40x).

En el caso del grupo SHAM (**Fig.31**), este no presenta marcaje positivo ni cambios histopatológicos tras el análisis de los cortes.

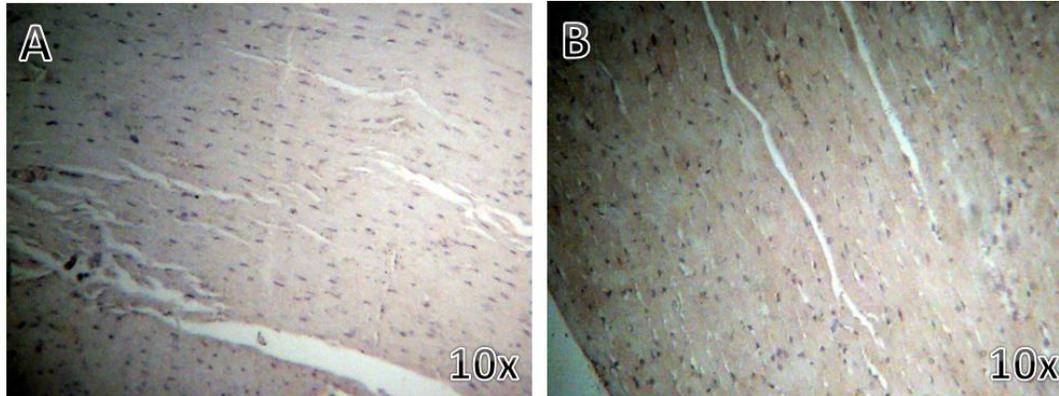


Fig.31.-Imágenes microscópicas de corazones de ratas del grupo Sham (C) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de células ERK1/2+, Los corazones de las ratas de este grupo no presentan área infartada y la tinción es por tanto negativa. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

Los grupos Control IAM, IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG, se observó que presentaban la misma arquitectura histopatológica mencionada en las laminillas anteriores, además de la presencia de células ERK1/2+ por lo que se procedió al conteo de las mismas en 10 campos a 40x en cada una de las laminillas, para posteriormente realizar el análisis estadístico (**Tabla 12, 13 y Grafica 4**).

Grupo Control IAM (B)

Presento un marcaje positivo intenso, sin embargo, menor al de los otros grupos, con un conteo de células ERK 1/2+ en 10 campos de 19.833 ± 1.078 . Este grupo presentó la menor expresión de este marcador.

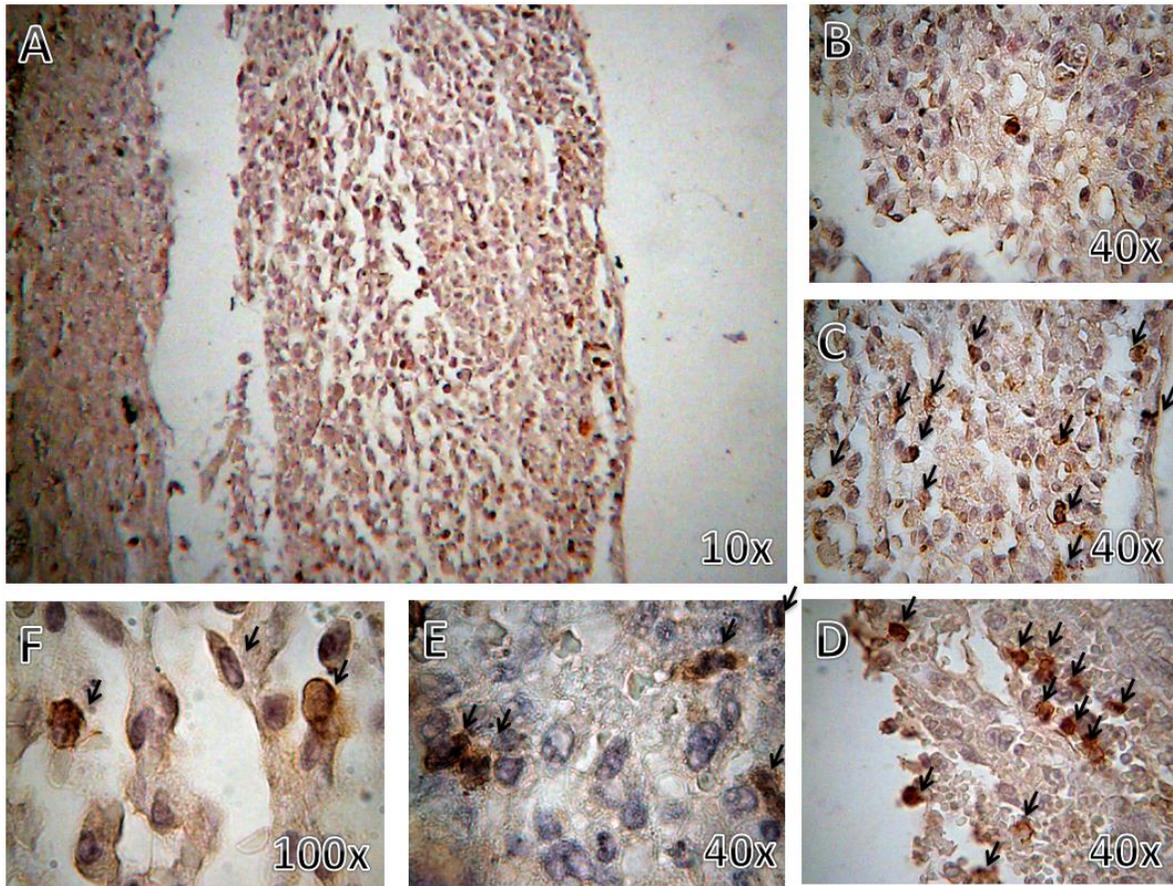


Fig.32.- Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo Control IAM (B) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detectar la expresión de ERK1/2, las flechas negras muestran las células positivas. A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

Grupo IAM + HBO (D)

Las muestras de tejido cardiaco de este grupo sometidas a inmunohistoquímica contra ERK1/2 (**Fig. 33**), también presentaron un marcaje intenso, con una diferencia de medias de 8.0 con respecto al grupo anterior (Control IAM), pero no existió diferencia estadísticamente significativa ($p=0.231$).

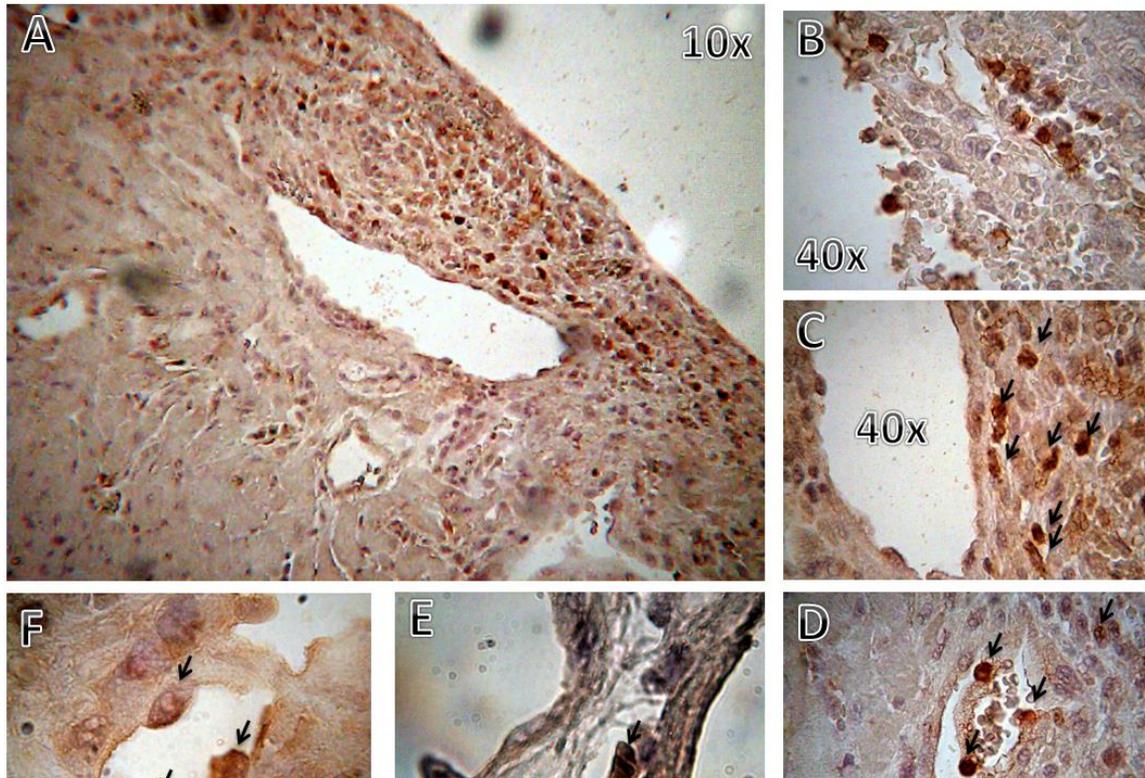


Fig.33.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+HBO (D) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de ERK1/2+, las flechas negras indican las células con marcaje positivo. A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado.

Grupo IAM+NTG (E)

En este grupo también se observaron células positivas para ERK1/2 (**Fig.34**), con una media de 32.5 ± 1.232 en 10 campos. El tejido de apariencia histológica reticular fue el que presentó la mayor concentración de estas. No existió diferencia estadísticamente significativa con el grupo IAM+HBO ($p=0.663$), pero si con el grupo Control IAM ($p=0.025$).

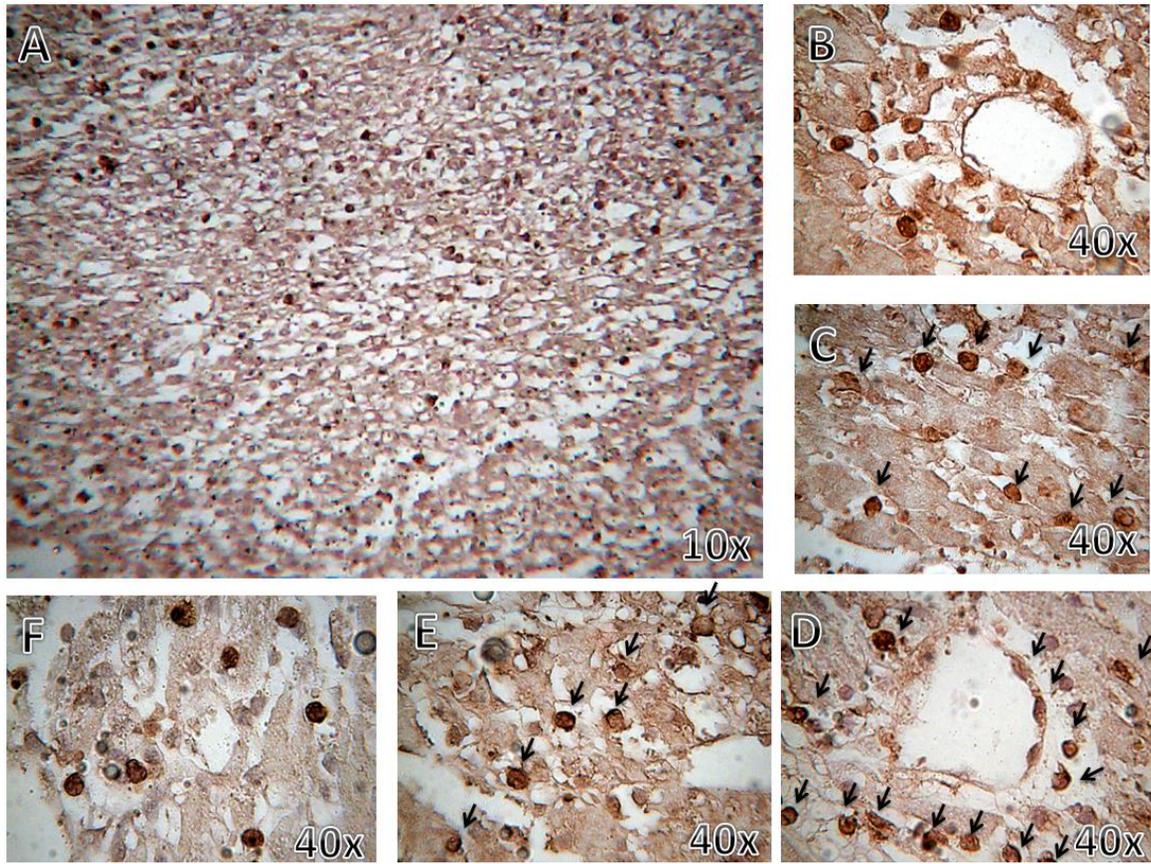


Fig.34 Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+NTG (E) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de células ERK1/2+, las flechas negras muestran las células positivas A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor vista de la foto.

Grupo IAM+HBO+NTG (F)

Nuevamente es el grupo que presenta la mayor expresión de los marcadores analizados, en este caso ERK 1/2, en la **Figura 35** se puede apreciar la gran concentración células positivas con un conteo en 10 campos de 49.833 ± 3.962 , y una diferencia de medias con respecto al grupo Control IAM de 30.0.

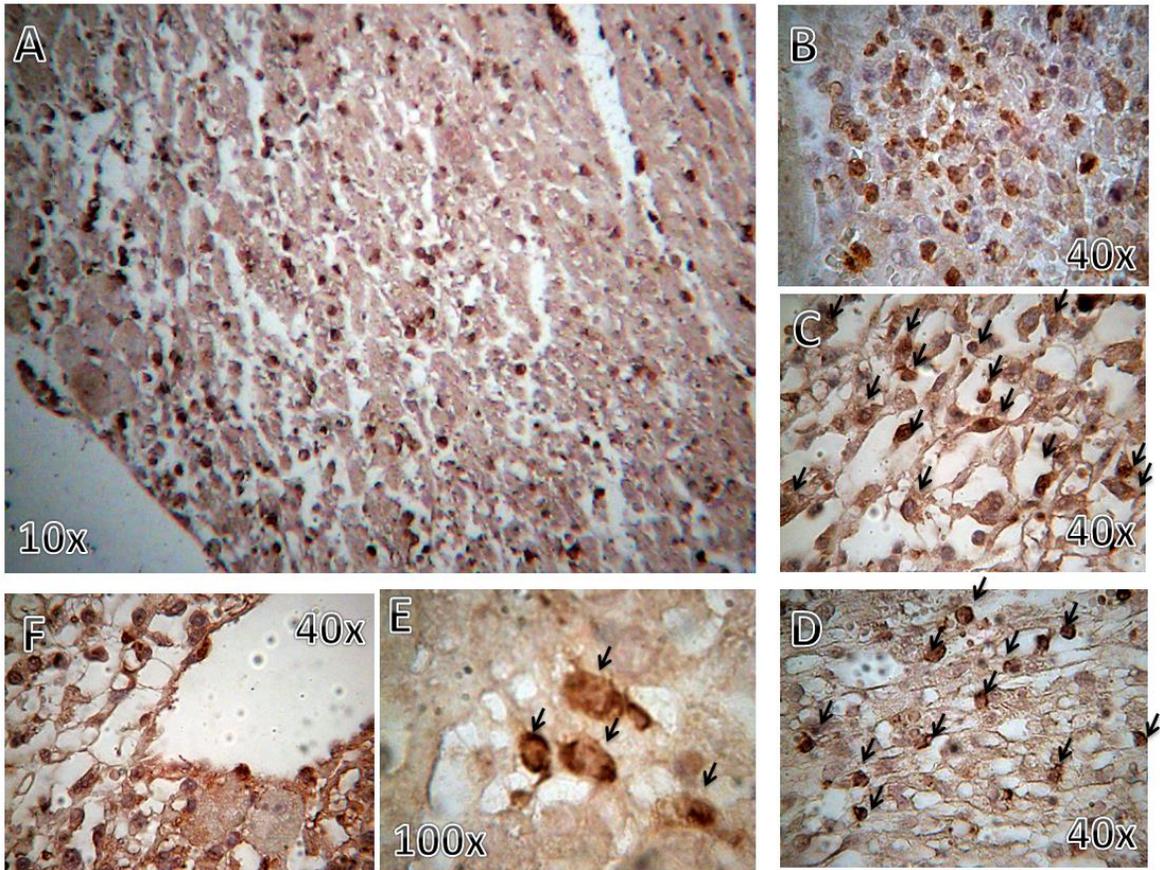
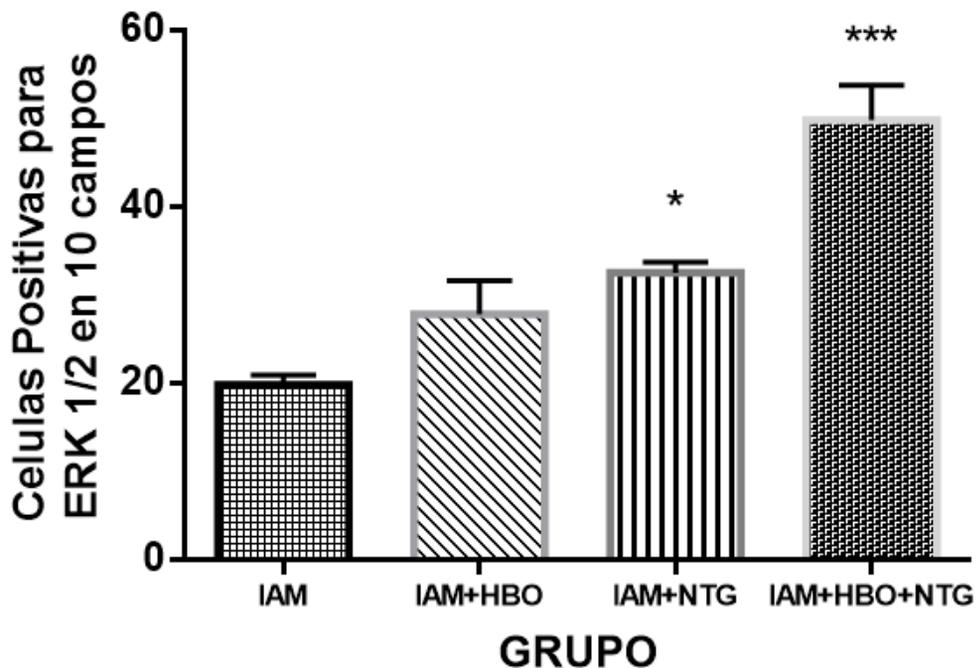


Fig.35.-Cortes microscópicos de corazones de ratas del grupo IAM+HBO+NTG (F) sometidos a tinción inmunohistoquímica para detección de células ERK1/2+, las flechas negras muestran las células positivas. Imágenes A-F: Fotografías tomadas del área infartada. En cada imagen se aprecia el aumento utilizado. Algunas imágenes no presentan las flechas con el objetivo de permitir al lector una mejor vista de la foto.

Tabla 12: Analisis estadístico del conteo de células ERK 1/2 + presentes en los corazones de las ratas de los grupos B, E, D y F.

GRUPO	n	Media ± SEM
Control IAM (B)	6	19.833 ± 1.078
IAM+HBO (D)	6	27.833 ± 3.807
IAM+NTG (E)	6	32.500 ± 1.232
IAM+HBO+NTG (F)	6	49.833 ± 3.962



Gráfica 4: Comparación del conteo de células ERK+/-, entre el grupo control IAM vs IAM+HBO, IAM+NTG y IAM+HBO+NTG (B vs D, E y F). Los datos están expresados como medias ± SEM para n=6. Los valores de p fueron determinados usando ANOVA con una prueba post-hoc tipo Tukey. ***p<0.0001, *p<0.01

Al realizar el análisis de varianza se encontró una diferencia estadísticamente significativa al comparar el grupo control IAM vs los grupos IAM+HBO, IAM+NTG, IAM+HBO+NTG (B vs D,E,F) (p= 0.01), por lo que se procedió a realizar el análisis Post-Hoc de tipo Tukey (**Tabla 13**). Es importante mencionar que no se encontró diferencia estadísticamente significativa cuando se compararon los grupos Control IAM vs IAM+HBO (p=0.231), al igual que los grupos IAM+HBO vs IAM+NTG

(p=0.663). El grupo IAM+NTG+HBO fue el de mayor expresión de ERK1/2+, presentando, además, diferencia estadísticamente significativa al compararlo con todos los demás grupos.

Tabla 13: Análisis Post-Hoc (Tukey)

FACTORES DE COMPARACIÓN:			
COMPARACIÓN	DIFERENCIA DE MEDIAS	P	P<0.050
IAM CONTROL vs. IAM +HBO+NTG	30.000	<0.001	SI
IAM CONTROL vs. IAM+NTG	12.667	0.025	SI
IAM CONTROL vs. IAM+HBO	8.000	0.231	NO
IAM+HBO vs. IAM+HBO+NTG	22.000	<0.001	SI
IAM+HBO vs. IAM+NTG	4.667	0.663	NO
IAM+NTG vs. IAM+ HBO+NTG	17.333	0.002	SI

10.DISCUSIONES.

Uno de los aspectos más relevantes de esta investigación es la medición del área miocárdica infartada (AMI) a través de la tinción con cloruro de trifeniltetrazolium (TTC), debido a que el AMI es un determinante de remodelación y disfunción miocárdica (Santos et al., 2008). Tomando en cuenta que en este modelo de IAM experimental, el porcentaje del infarto en el ápice es mayor que en la base del ventrículo izquierdo, el método más recomendado para la determinación del tamaño del infarto es el que utiliza múltiples cortes transversales, el promedio de todos los cortes determina el tamaño del infarto. (Oh et al., 1993). Apoyándonos con la información anteriormente descrita se demostró una reducción estadísticamente significativa del AMI en los grupos que recibieron las terapias propuestas, respecto al grupo Control IAM ($p < 0.05$) (**Grafica 1**).

El porcentaje de infarto miocárdico en el grupo control IAM, fue de 23.43 ± 1.398 , afectando ápex, pared anterior y lateral del ventrículo izquierdo y septum. En el caso de los grupos IAM que recibieron tratamiento, el septum cardiaco no se vio afectado, y la extensión del infarto en el ápex y las paredes laterales era menor, por lo que los porcentajes de infarto disminuyeron aproximadamente a la mitad en todos los casos (IAM+HBO: 12.20 ± 1.269 , IAM+NTG: 11.83 ± 0.2296 , IAM+HBO+NTG: 10.98 ± 0.9886) con respecto al grupo control IAM. Si bien, no se redujo al 100% la lesión miocárdica derivada de la isquemia, el hecho de reducir en aproximadamente 50% el AMI con cualquiera de las terapias propuestas genera expectativas positivas.

En un estudio donde se evaluó el efecto de la NTG en perros a los cuales se les

indujo un IAM, se encontró que está reduciendo el AMI en aproximadamente 50% (12.1% vs 6.4% $p < 0.05$; reducción similar a la obtenida en nuestra investigación), ellos sugieren que la protección miocárdica depende del incremento en la circulación colateral resultante del efecto vasodilatador y no a la disminución de las demandas de oxígeno miocárdicas (Jugdutt et al., 1981), sin embargo, no se miden otras variables que pudieran estar influyendo. Como contraparte, estudios más recientes mencionan que la NTG disminuye los síntomas y signos propios de la isquemia miocárdica sin atenuar la lesión miocárdica asociada a la oclusión de las arterias coronarias a menos que el vasoespasmo juegue un rol importante en la fisiopatología (O’Gara et al., 2013), lo cual difiere con nuestros hallazgos y los mencionados anteriormente (Jugdutt et al., 1981), ya que demostramos la disminución de al menos 50% de la lesión miocárdica, siendo esto de gran importancia debido a que mientras menor sea el tamaño del infarto, el índice pico de bombeo, la capacidad de generar presión y las constantes hemodinámicas que se deben mantener a nivel cardíaco sufren menor alteración y por lo tanto, la aparición de comorbilidades disminuye. Se ha reportado que en porcentajes de infarto ventricular izquierdo a partir de 31% se reducen los índices de presión y flujos pico cardíacos y en porcentajes de infarto mayores al 46% aparece falla cardíaca congestiva (MA, 1977).

La terapia con HBO también se ha estudiado como tratamiento del IAM, pero en modelos de isquemia-reperfusión, mostrando resultados muy positivos, como es la reducción del 62% del área infartada y una recuperación del $45 \pm 8\%$ de la presión generada en el ventrículo izquierdo, en comparación con aquellos corazones infartados solamente reperfundidos (Cabigas et al., 2006). Sin embargo, los

modelos de isquemia-reperfusión sirven para representar aquellos pacientes que son sometidos a terapias de reperfusión (Fibrinólisis y Angioplastia Coronaria Percutánea), valga la redundancia, por lo que no representa aquellos pacientes que no tuvieron acceso a estas terapias, y que son el objetivo de nuestro estudio. En nuestra investigación obtuvimos una reducción estadísticamente significativa del 48% del AMI en las ratas tratadas con HBO en comparación con el grupo Control IAM (12.20% vs 23.43% respectivamente, $p < 0.05$).

Es de gran importancia remarcar que la terapia dual (HBO+NTG) no logro disminuir el porcentaje de infarto de forma estadísticamente significativa en comparación con las terapias simples (HBO vs HBO+NTG: $p = 0.85$, NTG vs HBO+NTG: $p = 0.94$), este resultado nos permitiría determinar si existe interacción, tanto farmacodinámica como farmacocinética entre ambas terapias pudiendo generar sinergia aditiva, un efecto neutro, ó incluso antagonismo (Laurence Brunton, Bruce Chabner, 2012) . En este caso la interacción genero un efecto neutro, por lo que posiblemente ambos tratamientos compartan el mismo mecanismo de acción compitiendo por activar las mismas moléculas efectoras benéficas, recordemos que la nitroglicerina es un fármaco donador de ON (Katzung et al., 2012), por otro lado la terapia HBO al activar la eNOS de forma indirecta, incrementaría la cantidad de óxido nítrico endógeno (Yogarathnam et al., 2006), por lo que la fuente exógena (NTG) y la endógena (Activada por HBO) competirían para activar la misma molécula, la Guanil Ciclasa Soluble (sGC), incrementando las concentraciones intracelulares de GMPc y así activando su principal efector, la Proteína Cinasa G (PKG), con múltiples funciones intracelulares, por un lado, activaría la fosfatasa de cadenas ligeras de miosina (MLCP) (Yang, Clark, Bryan, Robertson, & Claudia, 2005) con el

consecuente efecto vasodilatador en las ramas vasculares colaterales, mejorando así el flujo sanguíneo en el área isquémica, lo que favorece la recuperación del miocardio hibernante (estado de actividad y metabolismo limitados que puede revertirse de forma parcial o total tras el restablecimiento de la circulación) y el aturcido (estado de contractilidad deteriorada que se revierte total e inmediatamente si se reestablece la circulación) mejorando el pronóstico y disminuyendo la disfunción miocárdica (Jugdutt et al., 1981; Mmoreu-Burgos & Macaya-Miguel, 2007). Por el otro lado, el ON, actuaría activando RAS y así la cascada de MAPK (proteína cinasa activada por mitógeno), finalizando en ERK ½ (cinasa regulada por señales extracelulares), cinasa indispensable para la proliferación celular y angiogénesis (Bir et al., 2012), facilitando la circulación sanguínea y la reparación cardíaca en el tejido miocárdico isquémico mientras se logra la maduración de los vasos colaterales (entre 3 semanas y 6 meses)(Mmoreu-Burgos & Macaya-Miguel, 2007).

La mejor comprensión de los mecanismos que favorecen los procesos angiogénicos en tejidos isquémicos ha permitido la aparición de terapias que tienen como fundamento, el incremento de la angiogénesis miocárdica (Renault & Losordo, 2007), y a su vez dio origen al siguiente aspecto relevante de esta investigación, que fue el análisis de los cambios angiogénicos en el tejido miocárdico infartado de los diferentes grupos de estudio, ya que la angiogénesis es vital para el incremento de la circulación colateral y la reparación miocárdica como una respuesta adaptativa a la hipoxia en el IAM (Frangogiannis, 2008; Lorier et al., 2011). Dicho análisis se realizó cuantificando la expresión a través de inmunohistoquímica de tres proteínas (VEGF-R2, CD-34 y ERK1/2) implicadas en

los procesos neoangiogenicos al tercer día de la inducción del IAM, debido a que trascurrido este tiempo, encontramos la fase proliferativa, en la que se encuentra la mayor cantidad de vasos neoformados (Frangogiannis, 2008).

Para cuantificar los niveles de factores angiogénicos, es necesario identificar las células progenitoras endoteliales (CPE) y su diferenciación fenotípica en el tejido isquémico, por tal motivo, se realizó la tinción inmunohistoquímica de dos marcadores, CD34 y VEGFR-2. CD34 es un antígeno de superficie presente en células madre hematopoyéticas tardías (precursoras de CPE), CPE, y en raras ocasiones en células endoteliales maduras por lo que representa la angiogénesis en sus fases iniciales, por otro lado el marcador VEGFR-2 es utilizado para identificar células endoteliales que han madurado y se encuentran formando brotes (botones) vasculares ya que se localiza en altas concentraciones en los filopodios (DiFabio et al., 2006; Mtsac et al., 2007; Ribatti & Crivellato, 2012).

Al contabilizar las células CD34+ como marcador de angiogénesis temprana en el tejido miocárdico infartado, pudimos evidenciar que las ratas a las que se les indujo el IAM y recibieron tratamiento, presentan un numero incrementado de células CD34 + al comparalas con el grupo control IAM ($p < 0.01$), el cual no recibió ningún tipo de tratamiento, lo cual nos permite confirmar nuestra hipótesis respecto a que la terapia con NTG y/o HBO promueven un efecto angiogénico. Es importante destacar que el grupo que fue sometido a la terapia combinada de NTG y HBO reportó el mayor número de células CD34+ (41.666 ± 2.552), sin embargo, no presento diferencia significativa con respecto al grupo IAM+NTG ($p = 0.417$), por lo tanto, esto no nos permite concluir que las dos terapias tengan un efecto sinergico entre sí. Si bien el grupo IAM+HBO presenta poco más del doble de células CD34+

en comparación con el grupo control IAM (17.667 ± 1.764 vs 8.667 ± 0.494), no induce los mecanismos angiogénicos como la NTG (17.667 ± 1.764 vs 36.833 ± 3.016).

Al cuantificar VEGFR-2 en los cuatro diferentes grupos de estudio se encontró que las ratas que recibieron tratamiento, presentaron una cantidad estadísticamente significativa mayor ($p < 0.0001$) de brotes vasculares en comparación con el grupo control IAM (5.333 ± 0.615), confirmando que tanto la nitroglicerina como la terapia con HBO favorecen los mecanismos involucrados en la maduración celular endotelial y por tanto en la angiogénesis en el tejido miocárdico infartado. A pesar de que la terapia dual (HBO+NTG) no mostro una disminución significativa del AMI en comparación con las terapias simples, en el caso de la cuantificación de brotes vasculares VEGFR-2+ si se presentó mayor expresión (HBO+NTG vs HBO: $p < 0.001$, HBO+NTG vs NTG: $p < 0.003$), advirtiendo así, un posible efecto sinérgico. Cabe mencionar que la terapia con HBO fue la que presento una cantidad menor de botones vasculares VEGFR-2+ (16.167 ± 1.621), aun así, su media es tres veces mayor que la del grupo control IAM, corroborando nuevamente sus propiedades angiogénicas en tejidos isquémicos (Sunkari et al., 2015; Yogaratnam et al., 2006). La angiogénesis involucra un estado de proliferación y diferenciación celular activa, por esta razón, se decidió cuantificar la expresión de ERK $\frac{1}{2}$, molécula indispensable en la proliferación celular y por lo tanto de la angiogénesis. (Bir et al., 2012). El análisis de ERK $\frac{1}{2}$ nos permitió obtener una visión general de la tasa de proliferación que existe en el tejido miocárdico infartado. El grupo IAM+HBO+NTG presentó la mayor expresión de ERK $\frac{1}{2}$ con una media de 49.833 ± 3.962 células positivas en 10 campos, siendo el único con diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.0001$) al ser comparado con los demás, por lo que posiblemente

exista un efecto sinérgico de ambos tratamientos. Curiosamente, este es el único marcador que no muestra diferencia entre los grupos IAM+NTG vs IAM+HBO ($p=0.663$). En el caso del grupo IAM+HBO vs el grupo Control IAM no existe diferencia estadísticamente significativa ($p=0.231$), pero debemos recordar que las imágenes histológicas son totalmente distintas entre ambos, por un lado, el grupo IAM+HBO presenta una morfología más conservada y menor cantidad de células infiltrantes, por el otro, el grupo Control IAM además de mostrar una imagen histológica desordenada, también presenta una extensa infiltración celular, por lo que al infiltrar menos células en el grupo IAM+HBO, la proliferación celular no se correlacionaría con el incremento de los mecanismos angiogénicos, lo cual podemos explicar gracias a que la terapia con HBO ha demostrado disminuir las moléculas ICAM-1 y la Selectina P, disminuyendo así la adhesión neutrofílica, y por tanto reduce la lesión e inflamación de paredes microvasculares y la peroxidación lipídica membranal, además de estimular la proliferación endotelial al incrementar la expresión de HIFs, así como incrementar el ON al modular de forma positiva la óxido nítrico sintasa endotelial (Sunkari et al., 2015; Thom, 2011; Yogaratnam et al., 2006).

A manera de resumen, debemos destacar que las terapias con HBO, NTG, y combinada (HBO+NTG), disminuyeron significativamente el área miocárdica infartada e incrementaron la angiogénesis en la zona lesionada de los corazones de rata infartados.

11.CONCLUSIONES

Las tres alternativas terapéuticas propuestas para esta investigación en un modelo de IAM en rata, terapia con oxígeno hiperbárico, terapia con nitroglicerina y terapia combinada de NTG y HBO, demostraron la disminución de aproximadamente el 50% del área miocárdica infartada y promovieron el incremento en los niveles de factores proangiogénicos: CD34 y VEGFR-2 en el tejido isquémico cardíaco, además las ratas infartadas tratadas con nitroglicerina ó terapia combinada (HBO+NTG) presentaron mayor expresión de ERK ½.

Finalmente, nosotros sugerimos el uso de las terapias simples (HBO ó NTG), dado que la terapia combinada (HBO+NTG) no mostro una disminución significativa del porcentaje de infarto con respecto a las terapias dadas de forma individualizada y a que no se han realizado estudios funcionales cardíacos que demuestren mayor beneficio.

12.PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en esta investigación son muy prometedores, ya que se disminuiría la morbimortalidad de los pacientes que sufren un infarto. Sin embargo, es necesario realizar pruebas funcionales cardíacas para complementar este estudio, y así determinar la función cardíaca global residual y establecer un pronóstico más objetivo. De igual forma, los tres demostraron incrementar la angiogénesis, por lo que pueden ser propuestos como nuevas terapias para tratar patologías cardíacas de origen isquémico al cumplir con las características de los métodos inductores angiogénicos disponibles en la actualidad.

Será importante realizar investigaciones para determinar las modificaciones histopatológicas y funcionales en fases más avanzadas (fase madurativa) de la reparación miocárdica, y de esta manera evaluar en un corazón con más días de evolución post-infarto el efecto de las terapias propuestas en estadios avanzados de la remodelación cardíaca. De acuerdo a la literatura, en la fase madurativa una gran cantidad de neovasos sufren apoptosis, por lo que un siguiente estudio nos

permitiría determinar cuál es la cantidad de vasos neoformados persistentes y el AMI final.

Ambas terapias ya son utilizadas de forma segura en humanos para tratar otras patologías, por lo que ya podrían ser utilizadas de forma alternativa en aquellos pacientes que escaparon a la ventana terapéutica de la angioplastia y la trombólisis, ó que no tienen acceso a las mismas.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Allen, B. W., Demchenko, I. T., & Piantadosi, C. a. (2009). Two faces of nitric oxide: implications for cellular mechanisms of oxygen toxicity. *Journal of Applied Physiology*, 106, 662–667. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91109.2008>
- Bir, S. C., Xiong, Y., Kevil, C. G., & Luo, J. (2012). Emerging role of PKA/eNOS pathway in therapeutic angiogenesis for ischaemic tissue diseases. *Cardiovascular Research*, 95(1), 7–18. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvs143>
- Cabigas, B. P., Su, J., Hutchins, W., Shi, Y., Schaefer, R. B., Recinos, R. F., ... Baker, J. E. (2006). Hyperoxic and hyperbaric-induced cardioprotection: Role of nitric oxide synthase 3. *Cardiovascular Research*, 72(1), 143–151. <https://doi.org/10.1016/j.cardiores.2006.06.031>
- Calatayud, S., Sanz, M. J., Canet, a, Bello, R., De Rojas, F. D., & Esplugues, J. V. (1999). Mechanisms of gastroprotection by transdermal nitroglycerin in the rat. *British Journal of Pharmacology*, 127(5), 1111–1118. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0702649>
- Cochain, C., Channon, K. M., & Silvestre, J.-S. (2012). Angiogenesis in the infarcted myocardium. *Antioxidants & Redox Signaling*, 18(9), 1100–1113. <https://doi.org/10.1089/ars.2012.4849>
- Davidson, R. M., Ramo, B. W., Wallace, a G., Whalen, R. E., & Starmer, C. F. (1973). Blood-gas and hemodynamic responses to oxygen in acute myocardial infarction. *Circulation*, 47(4), 704–11. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4696792>
- DiFabio, J. M., Thomas, G. R., Zucco, L., Kuliszewski, M. A., Bennett, B. M., Kutryk, M. J., & Parker, J. D. (2006). Nitroglycerin attenuates human endothelial progenitor cell differentiation, function, and survival. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 318(1), 117–123. <https://doi.org/DOI10.1124/jpet.106.102129>
- Duvall, A. (2017). Tramadol. *Journal of Exotic Pet Medicine*, 26(1), 74–77. <https://doi.org/10.1053/j.jepm.2016.10.005>
- Ensanut. (2012). Ensanut 2012. *Instituto Nacional de Salud Pública*. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Estrada, M., Hernández, S. D., & Alarcón, V. H. (2012). Regeneración Tisular : El Papel De Las Células Madre En Tissue Regeneration : the Role of Stem Cells in Cardiovascular. *Mensaje Bioquímico*, XXXVI, 51–64.
- Ferrer-Viant, D., Jorge-Fonseca, C., García-Rodríguez, R., Martínez-Anglada, P. F. (1998). Óxido nítrico. Importancia Biológica y participacion en algunas funciones cardiovasculares y heatológicas. *Medisan*, 2(1), 45–53.
- Frangogiannis, N. G. (2008). The immune system and cardiac repair. *Pharmacological Research*, 58(2), 88–111. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2008.06.007>
- Han, C., Lin, L., Zhang, W., Zhang, L., Lv, S., Sun, Q., ... Sun, X. (2008). Hyperbaric oxygen preconditioning alleviates myocardial ischemic injury in rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 233(11), 1448–1453. [https://doi.org/0801-RM-8 \[pii\]r10.3181/0801-RM-8](https://doi.org/0801-RM-8 [pii]r10.3181/0801-RM-8)
- Hernández, A., Cerrada, I., Díez, J. L., Ferrando, M., & Sepúlveda, P. (2016). Estudio comparativo de los cambios funcionales y estructurales producidos en un modelo porcino de infarto de miocardio agudo y crónico. *Archivos de Cardiología de Mexico*, 86(1), 64–74. <https://doi.org/10.1016/j.acmx.2015.09.009>
- Hill, S., Alpert, S., Green, H., Kwon, H. -R, Green, P., Curry, S. H., ... E. F. McNIFF *, A. YACOBI *, F.M. YOUNG-CHANG §, L. H. GOLDEN §, A. GOLDFARB §, and H.-L. F. ex. (2017). Pharmacokinetics of

- nitroglycerin and its metabolites after administration of sustained-release tablets. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 43(2), 141–152. <https://doi.org/10.1002/bdd.2510130208>
- INEGI. (2018). *COMUNICADO DE PRENSA NÚM. 525 / 18 31 DE OCTUBRE DE 2018 CARACTERÍSTICAS DE LAS DEFUNCIONES REGISTRADAS COMUNICACIÓN SOCIAL*. Retrieved from <http://www.beta.inegi.org.mx/contenidos/saladeprensa/boletines/2018/EstSociodemo/DEFUNCIONES2017.pdf>
- Jain, K. K. (2017). *Textbook of Hyperbaric Medicine*. American College of Hyperbaric. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-47140-2>
- Jugdutt, B. I., Becker, L. C., Hutchins, G. M., Bulkley, B. H., Reid, P. R., & Kallman, C. H. (1981). Effect of intravenous nitroglycerin on collateral blood flow and infarct size in the conscious dog. *Circulation*, 63(1), 17–28. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.63.1.17>
- Katzung, B. G., Masters, S. B., & Trevor, A. J. (2012). *Basic & clinical pharmacology. A Lange medical book*.
- Kenmure, A. C. F., Beatson, J. M., Cameron, A. J. V., & Horton, P. W. (1971). Effects of oxygen on myocardial blood flow and metabolism. *Cardiovascular Research*, 5(4), 483–489. <https://doi.org/10.1093/cvr/5.4.483>
- Kim, C. H., Choi, H., Chun, Y. S., Kim, G. T., Park, J. W., & Kim, M. S. (2001). Hyperbaric oxygenation pretreatment induces catalase and reduces infarct size in ischemic rat myocardium. *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 442(4), 519–525. <https://doi.org/10.1007/s004240100571>
- Laurence Brunton, Bruce Chabner, B. K. (2012). *Goodman & Gilman, Las bases farmacológicas de la terapéutica*. (12th ed.).
- Libby, P., & Theroux, P. (2005). Pathophysiology of coronary artery disease. *Circulation*, 111(25), 3481–3488. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.105.537878>
- Lorier, G., Touriño, C., & Kalil, R. A. K. (2011). Angiogénesis Coronaria como Respuesta Endógena de la Isquemia Miocárdica en el Adulto. *Arq Bras Cardiol.*, 97(6), 140–148.
- MA, P. (1977). Myocardial Infarct Size and Ventricular Function in Rats. *Circ Res.* 1979 Apr;44(4):503-12., 631–638. <https://doi.org/10.1161/01.RES.44.4.503>
- McNulty, P. H. (2004). Effects of supplemental oxygen administration on coronary blood flow in patients undergoing cardiac catheterization. *AJP: Heart and Circulatory Physiology*, 288(3), H1057–H1062. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00625.2004>
- Ministerio De Salud, Santiago, M. (2010). *Guía clínica infarto agudo del miocardio con supradesnivel del segmento ST*. Retrieved from <http://diprece.minsal.cl/le-informamos/auge/guias-clinicas-por-regimen/guias-clinicas-auge/>
- Mmoreu-Burgos, J., & Macaya-Miguel, C. (2007). Fisiopatología del miocardio isquémico, importancia de la frecuencia cardiaca. *Revista Española de Cardiología Suplementos*, 7(4), 19D–25D. [https://doi.org/10.1016/S1131-3587\(07\)75772-2](https://doi.org/10.1016/S1131-3587(07)75772-2)
- Montes De Oca, O. (2014). Shock cardiogénico en el infarto agudo de miocardio. *Revista Uruguaya de Cardiología*, 29(1), 145–152. Retrieved from http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?pid=S1688-04202014000100018&script=sci_arttext&tlng=pt
- Mtsac, J. G., Bermejo, E., Galán, V., Marino, J., Lazzari, M., & Bertolasi, C. (2007). Evaluación de los niveles plasmáticos de células progenitoras en pacientes con enfermedad coronaria crónica. *Circulation*, 429–435.
- Nabel, E. G., & Braunwald, E. (2012). A Tale of Coronary Artery Disease and Myocardial Infarction. *New England Journal of Medicine*, 366(10), 970–970. <https://doi.org/10.1056/NEJMx120007>

- O'Gara, P. T., Kushner, F. G., Ascheim, D. D., Casey, D. E., Chung, M. K., De Lemos, J. A., ... Zhao, D. X. (2013). 2013 ACCF/AHA guideline for the management of st-elevation myocardial infarction: A report of the American college of cardiology foundation/american heart association task force on practice guidelines. *Journal of the American College of Cardiology*, 61(4), 78–140. <https://doi.org/10.1016/j.jacc.2012.11.019>
- Oh, B. H., Ono, S., Rockman, H. a, & Ross, J. (1993). Myocardial hypertrophy in the ischemic zone induced by exercise in rats after coronary reperfusion. *Circulation*, 87(2), 598–607. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.87.2.598>
- Olivares R, G., Morán V, S., Palacios M, C., Apablaza E, F., Godoy J, I., Zalaquett S, R., & Ocaranza J, M. P. (2012). Ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda en ratas: Técnica quirúrgica. *Revista Chilena de Cirugía*, 64(1), 15–18. <https://doi.org/10.4067/S0718-40262012000100003>
- OMS. (2014). Centro de prensa Enfermedades cardiovasculares, 1–6. Retrieved from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs317/es/>
- Rawles, J. M., & Kenmure, A. C. (1976). Controlled trial of oxygen in uncomplicated myocardial infarction. *British Medical Journal*, 1(6018), 1121–3. <https://doi.org/10.1136/bmj.1.6018.1121>
- Renault, M.-A., & Losordo, D. W. (2007). Therapeutic myocardial angiogenesis. *Microvascular Research*, 74(2–3), 159–171. <https://doi.org/10.1016/j.mvr.2007.08.005>
- Ribatti, D., & Crivellato, E. (2012). “Sprouting angiogenesis”, a reappraisal. *Developmental Biology*, 372(2), 157–165. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.09.018>
- Roffi, M., Patrono, C., Collet, J.-P., Mueller, C., Valgimigli, M., Andreotti, F., ... Windecker, S. (2016). 2015 ESC Guidelines for the management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation. *European Heart Journal*, 37(3), 267–315. <https://doi.org/10.1093/eurheartj/ehv320>
- Romero-Fernandez, W., Batista-Castro, Z., De Lucca, M., Ruano, A., Garc??a-Barcel??, M., Rivera-Cervantes, M., ... S??nchez-Mateos, S. (2016). El 1, 2, 3 de la experimentaci??n con animales de laboratorio. *Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Publica*, 33(2), 288–299. <https://doi.org/10.17843/rpmpesp.2016.332.2169>
- Rothfuss, A., & Speit, G. (2002). Investigations on the mechanism of hyperbaric oxygen (HBO)-induced adaptive protection against oxidative stress. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 508(1–2), 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0027-5107\(02\)00213-0](https://doi.org/10.1016/S0027-5107(02)00213-0)
- Santos, L., Mello, A. F. S., Antonio, E. L., Tucci, P. J. F., Paulo, S., Tucci, C. P. J. F., ... Paulo, S. (2008). Determination of myocardial infarction size in rats by echocardiography and tetrazolium staining: correlation, agreements, and simplifications, 41(85), 3–5.
- Scherrer-Crosbie, M., Ullrich, R., Bloch, K. D., Nakajima, H., Nasser, B., Aretz, H. T., ... Picard, M. H. (2001). Endothelial nitric oxide synthase limits left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *Circulation*, 104(11), 1286–1291. <https://doi.org/10.1161/hc3601.094298>
- Singh, S., & Gambert, S. R. (2014). Hyperbaric Oxygen Therapy: A Brief History and Review of its Benefits and Indications for the Older Adult Patient. *Annals of Long-Term Care: Clinical Care and Aging*, 22(7/8), 37–42. Retrieved from <http://www.managedhealthcareconnect.com/article/hyperbaric-oxygen-therapy-brief-history-and-review-its-benefits-and-indications-older-adult>
- Sobrevia, L., Ooi, L., Ryan, S., & Steinert, J. R. (2016). Nitric Oxide: A Regulator of Cellular Function in Health and Disease. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 2–4. <https://doi.org/10.1155/2016/9782346>

- Sociedad, D., Cardiología, E. De, Miembros, A., Ph, D. T., Steg, G., Francia, M., ... Verheugt, F. (2012). IAMST (ESC) Guía de práctica clínica de la ESC para el manejo del infarto agudo de miocardio en pacientes con elevación del segmento ST Grupo de Trabajo para el manejo del infarto agudo de miocardio con elevación del segmento ST, 66(1).
- Sunkari, V. G., Lind, F., Botusan, I. R., Kashif, A., Liu, Z. J., Ylä-Herttuala, S., ... Catrina, S. B. (2015). Hyperbaric oxygen therapy activates hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1), which contributes to improved wound healing in diabetic mice. *Wound Repair and Regeneration*, 23(1), 98–103. <https://doi.org/10.1111/wrr.12253>
- Tfelt-Hansen, P. C., & Tfelt-Hansen, J. (2009). Nitroglycerin headache and nitroglycerin-induced primary headaches from 1846 and onwards: A historical overview and an update. *Headache*. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4610.2009.01342.x>
- Thom, S. R. (2009). Oxidative stress is fundamental to hyperbaric oxygen therapy. *Journal of Applied Physiology (Bethesda, Md. : 1985)*, 106(3), 988–95. <https://doi.org/10.1152/jappphysiol.91004.2008>
- Thom, S. R. (2011). Hyperbaric oxygen: its mechanisms and efficacy. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 127 Suppl, 131S–141S. <https://doi.org/10.1097/PRS.0b013e3181f8e2bf>
- Vlahović, A., Nešković, A. N., Dekleva, M., Putniković, B., Popović, Z. B., Otašević, P., & Ostojić, M. (2004). Hyperbaric oxygen treatment does not affect left ventricular chamber stiffness after myocardial infarction treated with thrombolysis. *American Heart Journal*, 148(1), 85. <https://doi.org/10.1016/j.ahj.2004.02.009>
- Wijesinghe, M., Perrin, K., Ranchord, A., Simmonds, M., Weatherall, M., & Beasley, R. (2008). Routine use of oxygen in the treatment of myocardial infarction: systematic review. *Heart*, 95(3), 198–202. <https://doi.org/10.1136/hrt.2008.148742>
- Yang, J., Clark, J. W., Bryan, R. M., Robertson, C. S., & Claudia, S. (2005). Mathematical modeling of the nitric oxide / cGMP pathway in the vascular smooth muscle cell. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 289(2), 886–897. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.00216.2004>.
- Yogarathnam, J. Z., Laden, G., Madden, L. A., Seymour, A. M., Guvendik, L., Cowen, M., ... Griffin, S. (2006). Hyperbaric oxygen: a new drug in myocardial revascularization and protection? *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 7(3), 146–154. <https://doi.org/10.1016/j.carrev.2006.04.006>
- Zhang, M., & Shah, A. M. (2014). ROS signalling between endothelial cells and cardiac cells. *Cardiovascular Research*, 102(2), 249–257. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvu050>
- Zornoff, L. A. M., Paiva, S. A. R., Minicucci, M. F., & Spadaro, J. (2008). Artículo de Revisión Infarto de Miocardio Experimental en Ratones : Análisis del Modelo Artículo de Revisión. *Sociedad Brasileira de Cardiologia*, 426–432.

14. ANEXOS

ANEXO 1 – ACEPTACIÓN DEL PROTOCOLO POR PARTE DEL COMITÉ DE INVESTIGACIÓN EN EL CUIDADO Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO (CICUAL)



Instituto Politécnico Nacional
Escuela Superior de Medicina



SEPI

"Año del Centenario de la Promulgación de la Constitución Política de los Estados Unidos Mexicanos"
"60 Aniversario del CECYT 14 Luis Enrique Erro"
"50 Aniversario del Patronato de Obras e Instalaciones"
"50 Aniversario de COFAA-IPN"
"30 Aniversario de la Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología"

Ciudad de México., a 23 de Junio de 2017.

Dictamen: CICUAL-01/23-06-2017

El Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) de la Escuela Superior de Medicina del Instituto Politécnico Nacional constituido por: Dr. Gustavo Guevara Balcázar, Dra. Icela Palma Lara, Dr. Ángel Iván Orlando Rubio Gayosso, Dra. María Eugenia Aguilar Nájera y Dr. Raúl Rojas Hernández en su sesión celebrada el día 23 de Junio del presente año, declara haber evaluado el protocolo No. ESM.CICUAL-01/23-06-2017 del proyecto: **Efecto de la terapia de oxigenación hiperbárica y nitroglicerina sobre la expresión de factores proangiogénicos en un modelo experimental de infarto al miocardio en rata.** Presentado por el Investigador. Dr. Enrique Fernando Castillo Henkel

Para su evaluación la comisión del CICUAL revisó los siguientes antecedentes: lógica con el uso de sustancias, inoculaciones, alojamiento y cuidado, número de animales, especie, cepa y procedencia y punto final humanitario. Después de dicho análisis se emitió el siguiente dictamen:

ACEPTADO

- 1.- Protocolo No. ESM-CICUAL-01/23-06-2017. Versión 1.0, con fecha de junio del 2017.
- 2.- Ajusto observaciones menores.

La aprobación de este protocolo tendrá vigencia de 3 años a partir de la emisión de la carta de aceptación.

Atentamente

Dr. Gustavo Guevara Balcázar
Presidente del Comité



ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA
COMITÉ INTERNO PARA EL CUIDADO
Y USO DE ANIMALES DE LABORATORIO

GGB/jod.

ANEXO 2 - PROTOCOLO PARA LA REALIZACIÓN DE INMUNOHISTOQUÍMICA EN PARAFINA.

A) Marcar las laminillas con lápiz punta diamante

I. Desparafinación

1.- Incubar las laminillas de 57 a 60° en la estufa durante 1 hora.

2.- Sumergir las laminillas en xilol durante 10 minutos.

II. Hidratación: Sumergir las laminillas en alcohol a diferentes concentraciones (100%, 95%, 90%, 80%, 70%) por 10 minutos cada una, y finalmente en Agua destilada durante 10 minutos.

Nota: No dejar secar las laminillas debido a que los tejidos se pueden dañar.

III. Recuperación Antigénica

Reactivo: Antigen Retrieval Citra Plus 10X (500ml) cat. HK080-9K Biogenex.

Preparación Buffer de citratos 1X para recuperación: 10 ml en 100 ml de agua destilada (Se puede reusar 3 o 4 veces)

1.- En un coplin con Buffer de recuperación se colocan laminillas (La solución debe cubrir las laminillas) y se introducen en solución baño maría a presión.

2.- Se espera a que se inicie la recuperación de vapor, se coloca el tapón y una vez alcanzada la presión se deja durante 5 minutos y se apaga, se espera a que se elimine la presión, se deja enfriar durante 20 minutos, se recupera el Buffer de Citratos.

3.- Se colocan las laminillas en agua destilada 3 minutos.

4.- Se delimita la zona del tejido con lápiz marcador (Dako Cytomaton Pen) previo secado de la zona con una gasa.

IV. Bloqueo con peróxido: En caso de tratarse de inmunohistoquímica con peroxidasa se agrega Peróxido al 1% de 10 minutos y posteriormente se lava con solución PBS-T.

V. Bloqueo de proteínas

Reactivo: Universal Blocking Reagent 10X. Biogenex cat HK0855K. Se prepara una mezcla al 1X= 10 ml del reactivo en 100 ml de PBS+Tween-20 (Puede usarse Triton) el Tween-20 es al 0.1 %, tras 10 minutos se deja decantar.

Lavar con PBS Tween-20, 3 veces.

VI. Reacción Antigénica I. Preparación de la dilución del AB. El Ab se diluye en solución diluyente del anticuerpo (DAKO).

1. Una vez que se decante la solución de lavado, agregar PBS-BSA al 1% al control negativo.
2. A las laminillas positivas se les agrega el primer anticuerpo y se deben incubar en cámaras húmedas a temperatura ambiente por 1 hora y/o toda la noche según el experimento.
3. Se realizan 3 lavados con PBS-T
4. Se realizan 3 lavados con TBS-T (50 mM)

VII. Reacción antigénica II

Se utiliza el kit LSAB+System-HRP (Biotinylated Link Universal; Streptavidin+HRP, CAT K0690)

- 1.-Bloqueo con peróxido del kit 10 minutos.
- 2.-Lavar 3 veces con PBS-T
- 3.- Lavar 3 veces con TBS-T
- 4.- Adicionar 1 gota de link (Amarillo) e incubar 30 minutos a temperatura ambiente.
- 5.- Lavar 3 veces con PBS-T
- 6.- Lavar 3 veces con TBS-T
- 7.- Adicionar 1 gota de streptavidina (rosa) e incubar por 10 minutos a temperatura ambiente.
- 8.- Lavar 3 veces con PBS-T
- 9.-Lavar 3 veces con TBS-T
- 10.- Adicionar el cromógeno (Se preparan 10 gotas de diluyente por 1 gota de cromógeno, usar guantes) Se adicionan 100 µl por laminilla y se incuba por 5 minutos.
- 11.- Lavar recolectando los desechos en un frasco de desechos tóxicos.
- 12.- Colocar en agua para proceder a la contratinción.

VIII. Contratinción

- 1.-Se colocan las laminillas en un coplin con hematoxilina, por 20 segundos y lavar con agua.
- 2.- Deshidratar: Pasar las laminillas rápidamente por cada uno de los alcoholes

mencionados en la hidratación, empezando por la concentración de alcohol más baja hasta llegar al Xilol.

3.- Agregar medio de montaje Merck (Entellan), colocar el cubreobjetos y esperar 24 horas antes de ver al microscopio.

