UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE CIENCIAS

ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL PODER ANGIOGÉNICO DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE MÉDULA ÓSEA AUTÓLOGA EN UN MODELO OVINO DE INFARTO DE MIOCARDIO

por

Br. Ruben Neves

MONTEVIDEO
URUGUAY
2014

PÁGINA DE APROBACIÓN

Tesis de grado aprobada por:

Presidente de mesa: _____
Nombre completo y firma

Segundo miembro (Tutor): _Dr. Alejandro Benech_____
Nombre completo y firma

Tercer miembro: _____
Nombre completo y firma

Fecha: _____

Autores: __Br. Ruben Neves Souza_____
Nombre completo y firma

TABLA DE CONTENIDO

PÁGINA DE APROBACIÓN 1
LISTA DE TABLAS, CUADROS Y FIGURAS 4
1. RESUMEN..... 5
2. SUMMARY 6
3. INTRODUCCIÓN..... 7
3.1 RELEVANCIA DEL TEMA A NIVEL MUNDIAL Y EN URUGUAY 7
3.2 FISIOLOGIA CARDIACA 8
3.2.1 IMPULSO ELECTRICO CARDIACO..... 8
3.2.2 VASCULATURA CARDIACA..... 9
3.2.3 INFARTO DE MIOCARDIO 9
3.2.3 ANGIOGENESIS..... 10
3.2.4 CELULAS MADRES 11
3.2.5 LECTINHISTOQUIMICA PARA CELULAS ENDOTELIALES..... 12
4. HIPOTESIS ..... **¡Error! Marcador no definido.**
5. OBJETIVOS..... **¡Error! Marcador no definido.**
5.1 OBJETIVO GENERAL ..... **¡Error! Marcador no definido.**
5.2 OBJETIVO ESPECIFICO..... **¡Error! Marcador no definido.**
6. MATERIALES Y MÉTODOS ..... **¡Error! Marcador no definido.**
6.1 ANIMALES Y MANEJO ..... **¡Error! Marcador no definido.**
6.2 OBSERVACIÓN MACROSCOPICA DEL AREA INFARTADA **¡Error! Marcador no definido.**
6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ANALISIS HISTOLOGICO .. **¡Error! Marcador no definido.**
6.4 ANALISIS HISTOLOGICO 21
6.5 ANÁLISIS ESTADISTICO 21
7. RESULTADOS ..... **¡Error! Marcador no definido.**
7.1 RESULTADOS MACROSCOPICOS ..... **¡Error! Marcador no definido.**
7.2 CONTEO DE CAPILARES..... **¡Error! Marcador no definido.**
8. DISCUSIÓN..... 24
8.1 ANIMALES Y TECNICAS PARA INDUCIR ISQUEMIA 24
8.2 CELULAS MADRE UTILIZADAS EN LA TERAPIA CELULAR Y FORMA DE ADMINISTRACION..... 24
8.3 PODER ANGIOGENICO DE LA TERAPIA CELULAR EN EL INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO 25
9. CONCLUSIONES..... 27
10. REFERENCIAS BIBLIOGÁFICAS..... 28

LISTA DE TABLAS, FIGURAS Y GRÁFICOS

Tabla 1: Revascularizaciones miocardicas quirurgicas realizadas en uruguay durante el período 2003-2013 ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 1: Capas histologicas de los vasos sanguineos ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Figura 2: Corazón de ovino obtenido en la necropsia 16

Figura 3: Corazón de ovino corte transversal 17

Figura 4: Muestras de corazón tratadas con azul de tetrazolio .. **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 2: Peso animal y peso corazón registrados durante las necropsias..... **¡Error! Marcador no definido.**

Tabla 3: Conteo de capilares ..... **¡Error! Marcador no definido.**

Gráfico 1: Promedio total de capilares según zonas de infarto .. **¡Error! Marcador no definido.**

1. RESUMEN

El trasplante de células mononucleares de medula ósea autóloga (CMMO) ha demostrado que potencia la angiogenesis en modelos animales de infarto agudo de miocardio, como la rata y el cerdo. En el presente trabajo evaluamos el poder angiogénico de CMMO en un modelo ovino.

Se indujo el infarto ligando la segunda rama diagonal de la arteria descendente anterior durante 90 minutos en 12 animales, los cuales se separaron en 2 grupos de trabajo, 6 fueron inyectadas con 1,2ml de una suspensión de CMMO (5×10^6 células totales/ml) en la zona de infarto y 6 fueron tratadas como grupo control administrándoles 1,2ml suero fisiológico en la zona de infarto. Dos meses después de administrado el tratamiento los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras para su análisis histológico. El conteo de capilares de cada una de las muestras mostró resultados significativos ($P<0,05$) cuando se comparo la zona de infarto tratada con CMMO con respecto al grupo control.

El trasplante de CMMO induce la angiogenesis en un modelo ovino de infarto y se presenta como una alternativa, en el campo de la terapia celular, para las intervenciones quirúrgicas de revascularización en medicina humana.

2. SUMMARY

Autologous mononuclear bone marrow cells (BMSC) transplanted into acute myocardial infarction model has shown to enhance angiogenesis, in animals such as rat and pig. In this work we evaluate the angiogenic potential of BMSC in an ovine model.

Myocardial infarctation was made by coronary artery ligation for 90 minutes in 12 animals. The animals was separated into two working groups, 6 were injected with 1.2 ml of a suspension of BMSC (5×10^6 total cells / ml) in the infarct zone, and 6 were injected with 1,2ml of saline solution in the infarct zone (control). Two months after the treatment the animals were sacrificed and samples for histological analysis were taken. Capillaries counting showed significant results ($P < 0.05$) when treated infarct area BMSC was compared to the control group.

BMSC transplantation induces angiogenesis in an ovine model of infarction and is presented as an alternative in the field of cell therapy for surgical revascularization procedures in human medicine.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 RELEVANCIA DEL TEMA A NIVEL MUNDIAL Y EN URUGUAY

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en el mundo, se calcula que en 2008 murieron por esta causa 17,3 millones de personas en el mundo lo cual representa el 30% de las muertes registradas a nivel mundial (1); de esas defunciones aproximadamente 7,3 millones se debieron a cardiopatías coronarias (infarto de miocardio) y 6,2 millones a accidentes cerebrovasculares (ACV) (2). Las ECV afectan en la misma medida tanto a hombres como a mujeres, y más del 80% de los decesos por ECV se dan en países de ingresos medios y bajos, como es el caso de Uruguay. Las ECV son un conjunto de trastornos del corazón y de los vasos sanguíneos, que se clasifican en:

- Cardiopatía coronaria, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el miocardio
- Enfermedades cerebrovasculares, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan el cerebro
- Arteriopatías periféricas, enfermedad de los vasos sanguíneos que irrigan los miembros superiores e inferiores
- Cardiopatía reumática, lesiones del miocardio y de las válvulas cardiacas debido a la fiebre reumática, que es causada por bacterias del tipo estreptococos
- Cardiopatías congénitas, malformaciones del corazón presentes desde el nacimiento
- Trombosis venosas profundas y embolias pulmonares, coágulos de sangre (trombos) en las venas de las piernas, que pueden desprenderse (émbolos) y alojarse en los vasos del corazón y los pulmones.

En países emergentes en vías de desarrollo como Uruguay, la Organización Mundial de la Salud estima que a nivel macroeconómico las ECV suponen una pesada carga para las economías ya que contribuyen al fallecimiento de personas que se encuentran aún en edades productivas. En nuestro país las campañas de prevención y detección temprana de estas enfermedades son la principal forma de combatirlas, alguna de las estrategias utilizadas como la prohibición de fumar en espacios públicos cerrados, el aumento de impuestos a los cigarrillos, la promoción de hábitos saludables como el ejercicio físico y una dieta saludable en la que se incluyan frutas y verduras, así como un menor consumo de sal de mesa, campañas de control de la presión arterial; todas estas medidas sobrellevan un costo económico en la sociedad.
En el Uruguay las ECV representan la principal causa de defunciones, con aproximadamente un 30% de las defunciones (3) (4), además de presentar una morbilidad significativa. Cabe destacar que en la última década las ECV han presentado una tendencia a la baja, que es aún leve (5). En nuestro país las enfermedades cerebrovasculares ocupan el primer lugar en cuanto a las causas de defunciones atribuidas a las ECV, seguido por las enfermedades isquémicas del corazón, las demás ECV presentan una baja tasa de mortalidad. Un análisis de

muertes por ECV según el sexo muestra una mayor incidencia de las enfermedades cerebrovasculares en las mujeres y en el sexo masculino el primer lugar en cuanto a causa de muerte lo ocupan las enfermedades isquémicas del corazón (5).

3.2 FISIOLOGÍA CARDIACA

3.2.1 IMPULSO ELECTRICO CARDIACO

El corazón está compuesto por tres tipos de músculo cardiaco o miocardio, músculo auricular, músculo ventricular y fibras musculares excitadoras y conductoras especializadas. Los tipos auricular y ventricular se contraen de manera semejante a como lo hace el músculo esquelético con la particularidad que la duración de la contracción es mucho más prolongada, en cuanto a las fibras excitadoras de conducción estas se contraen levemente (6). Las fibras del músculo cardiaco están formadas por muchas células musculares conectadas en serie a través de uniones comunicantes donde las membranas celulares se funden entre sí, permitiendo la difusión casi completamente libre de iones, de manera que cuando una célula es excitada mediante un potencial de acción esté difunde sin mayor oposición de célula a célula. El periodo que va desde el inicio de un latido hasta el comienzo de otro se denomina ciclo cardiaco, la generación espontánea de un potencial de acción en el nódulo sino auricular (nódulo S-A) da inicio al ciclo, el potencial de acción viaja rápidamente por las aurículas, propiciando la contracción de estas. El nódulo se encuentra ubicado en la pared posterior de la aurícula derecha cerca de la desembocadura de la vena cava superior (6). Desde el nódulo S-A el impulso es conducido a través de las vías internodales hacia el nódulo auriculoventricular (nódulo A-V), el nódulo A-V se localiza en la pared septal de la aurícula derecha, inmediatamente por detrás de la válvula tricúspide, su principal función es retrasar la conducción del impulso. El impulso sale del nódulo A-V a través del haz auriculoventricular que se compone de pequeños fascículos que atraviesan el tejido fibroso que separa las aurículas de los ventrículos, así la conducción del impulso se retrasa aproximadamente 0,13 segundos desde su generación en el nódulo S-A, lo cual permite que las aurículas actúen como bombas cebadoras de los ventrículos.
Las fibras de Purkinje salen del nódulo A-V siguiendo el haz A-V y penetran en los ventrículos. Las características especiales de estas fibras, como el elevado número de uniones comunicantes entre células de las fibras y el bajo número de miofibrillas, lo que significa que apenas se contraen durante la transmisión del impulso, permite a las fibras de Purkinje transmitir potenciales de acción con una velocidad 6 veces mayor a la del músculo cardíaco (6). Una vez que el impulso ha alcanzado los extremos de las fibras de Purkinje, es transmitido a través de la masa muscular del ventrículo por las propias fibras musculares ventriculares, a una velocidad que es la sexta parte de la velocidad de las fibras de Purkinje (6).

3.2.2 VASCULATURA CARDIACA

Las principales arterias coronarias que irrigan el corazón se hallan en la superficie del mismo a partir de la subdivisión de dichas arterias penetran en el músculo cardíaco arterias de menor calibre que continúan subdividiéndose hasta transformarse en capilares, para nutrirlo, solamente la porción más interna de la superficie del endocardio puede nutrirse directamente de la sangre que circula por las cavidades cardíacas.
La arteria coronaria izquierda riega fundamentalmente las porciones anterior y lateral del ventrículo izquierdo, mientras que la arteria coronaria derecha suministra sangre a la mayor parte del ventrículo derecho y a la parte posterior del ventrículo izquierdo (6). La contracción del músculo cardíaco se conoce como sístole, mientras que el período de relajación del músculo cardíaco es conocido como diástole. Durante la sístole la fuerza de contracción del músculo ventricular genera una mayor presión en las capas internas del músculo cardíaco que la que se genera en las capas externas, por esta razón los vasos sanguíneos subendocárdicos se encuentran más comprimidos que los vasos de las zonas cardíacas más externas (6).
Las necesidades nutritivas del corazón son altas, incluso en reposo la sangre arterial que atraviesa el corazón cede un 70% de oxigeno (6), por eso la falta parcial de circulación coronaria puede causar graves daños a la musculatura cardíaca. El músculo cardíaco necesita de aproximadamente 1,3 ml de oxigeno cada 100 gr de tejido por minuto, durante el reposo el miocardio recibe casi 8 ml de oxigeno cada 100 gr de tejido por minuto (6), con lo cual con un riego sanguíneo equivalente a un 15-30% del normal el miocardio sobrevive.

3.2.3 INFARTO DE MIOCARDIO

Cuando ocurre una oclusión coronaria aguda, la sangre deja de circular en los vasos coronarios afectados, exceptuando el pequeño flujo que puede obtenerse de los vasos vecinos mediante circulación colateral. La red de pequeños vasos es altamente variable de persona a persona, y se desarrolla a partir del reclutamiento de vasos ya existentes como del desarrollo de nuevos vasos (7). Los factores de mayor estimulación para el crecimiento de vasos colaterales son la duración y severidad de la isquemia, el esfuerzo sufrido por la pared arterial y la inflamación (8). Cuando ocurre un infarto agudo de miocardio la presencia y desarrollo de circulación colateral disminuye el área de infarto, permite que la función ventricular se mantenga, disminuye la posibilidad de formación de un aneurisma y mejora la sobrevivencia (9).
En la mayoría de los casos la circulación colateral por sí misma no es capaz de amortiguar efectivamente los daños ocasionados por un infarto de miocardio, es por eso que se han desarrollado técnicas quirúrgicas como la revascularización miocárdica quirúrgica (RVMQ) o by-pass. Según el Fondo Nacional de Recursos (FNR) entre el 2003 y 2013 se realizaron 16089 RVMQ (10).

La siguiente tabla muestra como año a año se incrementaron el número de RVMQ

AÑO	RVMQ
2003	1345
2004	1314
2005	1430
2006	1328
2007	1470
2008	1470
2009	1489
2010	1511
2011	1527
2012	1571
2013	1634

Tabla 1. RVMQ realizadas en Uruguay. Fuente FNR 2014

La sobrevida y reaparición de angina a los 15 años, luego de la RVMQ es de 60% y 63% respectivamente (11). La imposibilidad de realizar una RVMQ completa definida como la imposibilidad de ejecución de puentes coronarios debido a oclusión sin recanalización de una de las coronarias, es un factor determinante en la reaparición precoz de angina (12) y es un problema quirúrgico aún no resuelto.
Debido a los costos de las intervenciones quirúrgicas, el riesgo que dichas intervenciones conllevan y la imposibilidad en ciertos casos de realizar una RVMQ completa, han determinado que se investiguen terapias alternativas como lo es la terapia angiogénica celular. La estrella dentro de la terapia angiogénica celular son las células madres provenientes de la médula ósea (CMO).

3.3 ANGIOGENESIS

Angiogenesis es el término utilizado para definir el crecimiento vascular y hace referencia a la formación de nuevos vasos. En este proceso participan células vasculares y no vasculares, así como enzimas proteolíticas en la disolución de la membrana basal y la matriz extracelular, así como la diferenciación, migración, adhesión y proliferación de células endoteliales (38). Subsecuentemente en la sección media del vaso en formación, las células endoteliales proliferan y se ensamblan para formar el nuevo vaso sanguíneo. El nuevo vaso sanguíneo sufre anastomosis con los vasos adyacentes, en este punto el vaso todavía es frágil y puede ser remodelado, y es perfundido por la circulación sanguínea (39). La acumulación de una lámina basal, el recubrimiento por pericitos y células del músculo liso terminan de fortalecer el nuevo vaso (40).
El proceso de angiogenesis se da tanto en situaciones deseables de remodelamiento vascular propias del organismo en casos de isquemia o daño tisular, como en situaciones patológicas como lo son tumores, retinopatía diabética o artritis reumatoide.

3.4 CELULAS MADRES

Las células madre (CM) son definidas como células con capacidad de autorenovación (capaces de dividirse indefinidamente) y con capacidad de diferenciación (capaces de originar varios tejidos o linajes celulares). Originalmente estas células fueron clasificadas de acuerdo a su potencial de diferenciación: en totipotentes, pluripotentes y multipotentes (13). Son consideradas totipotentes las CM capaces de originar cualquier tipo celular provenientes de las tres capas germinativas (ectodermo, mesodermo, endodermo) siendo capaces de formar un organismo funcional completo, si son colocadas en el contexto adecuado. Las células madres embrionarias, que derivan de la masa interna del blastocito, son consideradas pluripotentes porque son capaces de originar cualquier tipo de tejido, a excepción de la placenta y las membranas ovulares (por lo cual no son capaces de originar un nuevo individuo). Las CM de cada órgano son multipotentes porque aunque presentan cierto grado de plasticidad ya están comprometidas con la diferenciación celular (14).

Otra clasificación altamente utilizada es la de CM embrionarias, obtenidas a partir de la masa celular interna del blastocito en estado pre-implantatorio; y las CM adultas siendo estas el conjunto de las CM de cada órgano.

Las CMO incluyen CM hematopoyéticas y CM mesenquimales. Las primeras dan origen a las células sanguíneas y pueden ser aisladas e identificadas por la presencia de marcadores celulares como CD34 y CD133 (15); las CM mesenquimales son precursoras de tejidos mesenquimales no hematopoyéticos, como condrócitos, miocitos, adipocitos y fibroblastos (16).

La principal ventaja de utilizar CMO autóloga, radica en el reconocimiento que realiza el cuerpo del propio paciente, evitando de esta manera una reacción del sistema inmune.

3.5 LECTINHISTOQUIMICA PARA CÉLULAS ENDOTELIALES

Existen tres tipos de vasos sanguíneos: arterias, venas y capilares, entre estos a su vez podemos observar vasos intermedios denominados arteriolas (entre la arteria y el capilar) y vénulas (entre el capilar y la vena). Las paredes de estos vasos en general están constituidas por tres capas:

1. la túnica íntima, formada por una capa de células endoteliales que se encuentran en contacto con la sangre.
2. la túnica media, limitada a cada uno de sus lados por una capa de tejido elástico y consta también de una capa circular de músculo liso, la cual está rodeada por elastina y colágeno e inervada por fibras nerviosas simpáticas, provee la fuerza mecánica de los vasos sanguíneos, que es nula o inexistente en los vasos sanguíneos venosos y capilares.
3. la túnica adventicia, es una línea de tejido conectivo que sirve para anclar los vasos a los tejidos.

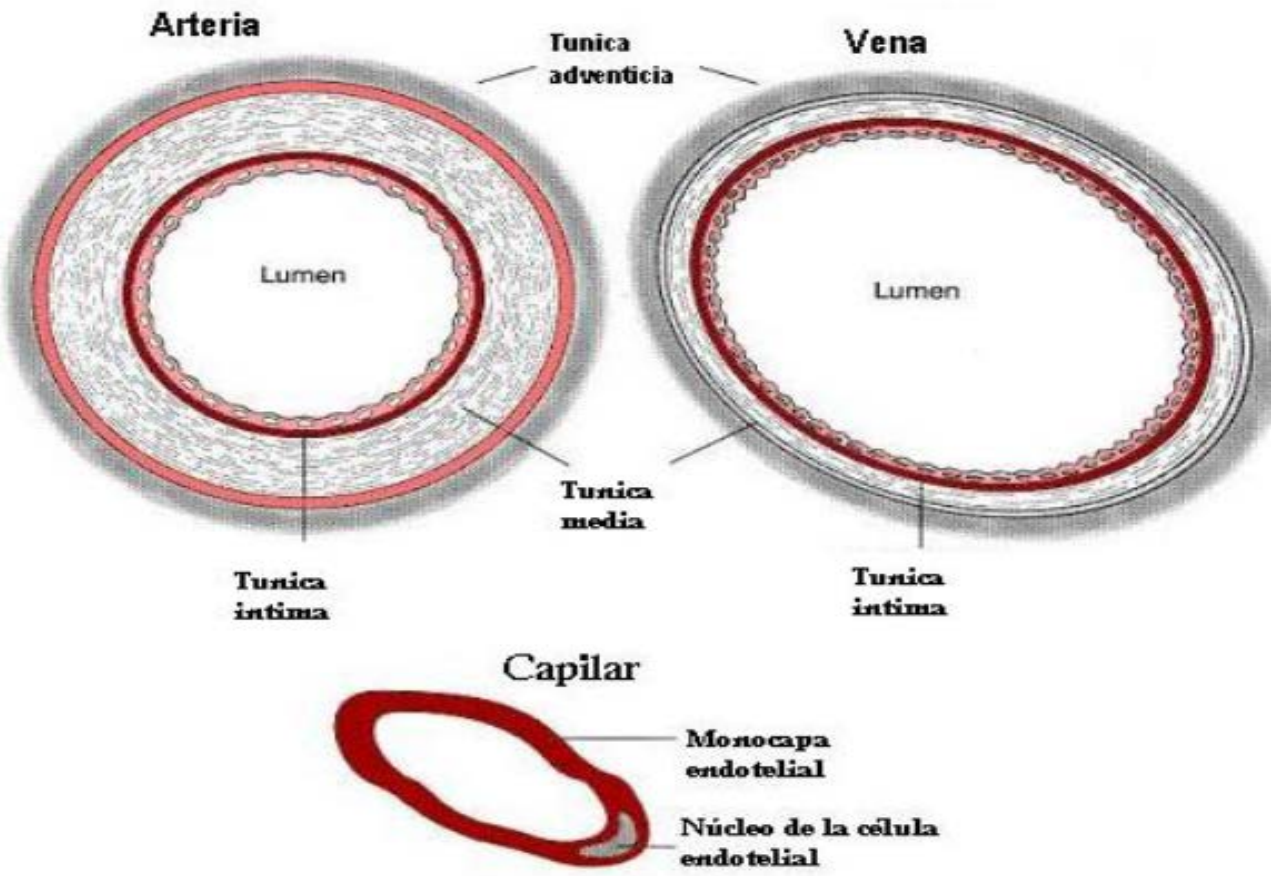

Figura 1. Capas histológicas de los vasos sanguíneos

La capa de células endoteliales que componen la túnica intima se consideraban en un principio como una simple barrera moduladora para la difusión de oxigeno y nutrientes hacia las siguientes capas de los vasos y luego a los tejidos, estudios posteriores demuestran que las células endoteliales presentan diferentes funciones

metabólicas y endocrinas cuando se encuentran con un estimulo fisiopatológico, que juegan un papel muy importante en la producción de agentes antitromboticos y protromboticos, mediadores inflamatorios, agentes fibronoliticos y estimuladores e inhibidores del crecimiento vascular (18).

El glicocalix es un complejo molecular que cubre la superficie luminal del endotelio vascular y se encuentra asociado a proteoglicanos (proteínas unidas a polisacáridos), glicosaminoglicanos (mono, oligo o polisacáridos unidos a proteínas o lípidos), glicoproteínas (carbohidratos unidos a proteínas), glicolipidos (carbohidratos unidos a lípidos) y proteínas plasmáticas (19, 20).

Algunas de las funciones descriptas para el glicocalix se realizan a través de interacciones con componentes glicosidicos y con proteínas unidas a carbohidratos con actividad de lectina (21).

Las lectinas son proteínas de unión a carbohidratos que se unen específicamente a estos sin catalizar o modificar el carbohidrato (24), pudiendo interactuar con glicolipidos, glicoproteínas y proteoglicanos en la superficie de células animales. Se encuentran presentes tanto en el reino animal como el vegetal.

Estas proteínas de unión a carbohidratos desarrollan un papel muy importante en distintos procesos biológicos como lo son la respuesta inmune y la inflamación (25).

En el presente trabajo utilizaremos la lectina BS-1 también llamada GS-1 para teñir los preparados histológicos, que nos permitirá observar el endotelio de los diferentes vasos presentes en nuestras muestras. La BS-1 es una de las dos familias de lectinas, presentes en la leguminosa africana *Bandeireia Simplicifolia o Griffonia Simplicifolia,* que es extraída de las semillas de estas plantas (26).

4. HIPOTESIS

Las células mononucleares extraídas de médula ósea autóloga presentan poder angiogénico cuando son inyectadas directamente en el miocardio isquémico en un modelo ovino de infarto agudo de miocardio.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar histológicamente el poder angiogénico de células mononucleares de médula ósea autóloga en un modelo ovino de infarto de miocardio.

5.2 OBJETIVO ESPECIFICO

Determinar la densidad capilar, mediante cortes histológicos de la zona de infarto obtenida al sacrificar las ovejas luego de dos meses de la inyección directa de células mononucleares autólogas o suero fisiológico en modelo ovino de infarto agudo de miocardio.

6. MATERIALES Y METODOS

La presente tesis de grado se encuentra en el marco de un proyecto multidisciplinario coordinado por la Dra. Cristina Touriño y el Dr. Alejandro Benech, en el que se desarrolla un modelo ovino de infarto agudo de miocardio (IAM) provocando isquemia a través de la ligadura de la 2ª rama diagonal de la arteria descendente anterior, lo cual servirá como modelo de estudio para evaluar las diferentes terapias angiogénicas. Dentro de este proyecto multidisciplinario la tesis de grado se desarrolló a partir del sacrificio y de las necropsias de los animales, luego de 2 meses de realizada la cirugía en la que se provocó el infarto de miocardio, y abarcó la extracción de las muestras para estudio a partir de la zona infartada, su procesamiento y análisis histológico.

El protocolo experimental se realizó en el quirófano de la Unidad de Endoscopía del Hospital de la Facultad de Veterinaria, las intervenciones quirúrgicas fueron realizadas por un equipo integrado por cirujanos veterinarios, coordinados por el Dr. Alejandro Benech.

6.1 ANIMALES Y MANEJO

Se utilizaron 12 ovejas Corriedale adultas y vacías con un peso vivo de 38,5 ± 6,2 Kg, que fueron mantenidas, hasta el momento del comienzo del protocolo, en el Campo Experimental N° 2 de la Facultad de Veterinaria, donde se realizó el manejo sanitario correspondiente (vacunas, desparasitaciones, despezuñado y esquila). La identificación de cada uno de los animales se realizó por caravanas, respetando la numeración que ya traían los animales. Este número se mantuvo durante todo el protocolo experimental a fin de poder seguir una trazabilidad de las muestras finales.
A todas las ovejas se les practicó una cirugía en la que se indujo un infarto agudo y controlado de miocardio de pared anterior de ventrículo izquierdo (VI), mediante ligadura de la 2ª rama diagonal de la arteria descendente anterior, que se liberó luego de transcurridos 90 minutos de isquemia. El infarto (isquemia) se confirmó durante el protocolo quirúrgico por la elevación del segmento S-T en el registro electrocardiográfico.

Luego de liberar la ligadura cada oveja recibió uno de los siguientes tratamientos, conformándose dos grupos de 6 animales cada uno:

Grupo I: Luego de que se realizó el IAM, se inyecto en la zona infartada 1,2 ml de una suspensión de células mono nucleares autólogas (5 x 10^6 células totales/ml), en 6 puntos de inyección (0,2 ml de la suspensión en cada punto), cuatro de ellos en la periferia de la lesión y 2 en el centro de la misma.

Grupo II: En estos animales luego de realizado el IAM se administró 1,2 ml de suero fisiológico en 6 puntos de inyección de 0,2 ml en los lugares descriptos para el grupo anterior.

A todas las ovejas del grupo I se les realizó, previo a la cirugía, la extracción de 20 ml de médula ósea (MO) por punción con trócar (AVA*max*® 11G, de 10mm) de la cresta ilíaca (17), a partir de la cual se realizó la purificación y suspensión de células mononucleares para la inyección intramiocárdica en el grupo I. La cosecha de médula ósea fue realizada una vez que las ovejas se encontraban anestesiadas, previó a la cirugía de IAM, por los cirujanos veterinarios y procesada por técnicos idóneos integrantes del Departamento de Medicina Básica perteneciente al Hospital de Clínicas. La médula ósea de las ovejas del grupo II no fue colectada.
A los dos meses de realizada la cirugía de IAM, los animales fueron pesados y sacrificados en la sala de necropsia de la Facultad de Veterinaria. Primero se realizó la insensibilización con un bolo de 1g de tiopental IV y luego la exanguinación mediante sección de los grandes vasos del cuello. Una vez constatada la muerte se procedió a realizar la necropsia en la cual se extrajo el corazón. Del mismo se retiró el pericardio junto con el tejido adiposo asociado y se registró el peso.

Macroscópicamente se identificó la zona infartada (figura 2) y se procedió a realizar una incisión transversal en el centro de la misma, de manera que se divide el corazón en dos partes (figura 3). Posteriormente 4 incisiones transversales en forma de “rodajas” de 3 mm de espesor, sucesivas hacia cada lado de ambas partes. La muestra correspondiente a la incisión más proximal a la zona infartada se denomina zona 1 (Z1), la siguiente muestra zona 2 (Z2), luego zona 3 (Z3), y la muestra más distante a la zona infartada se denomina zona normal (N). De esta manera se obtuvo dos juegos de muestras.
Las muestras obtenidas de las zonas Z1, Z2, Z3 y N se acondicionaron en paraformaldehído (PFA) al 4 % para su procesamiento histológico y conteo de densidad capilar en el Departamento de Histología y embriología de la Facultad de Medicina, bajo la supervisión del Dr. Gabriel Anesetti.

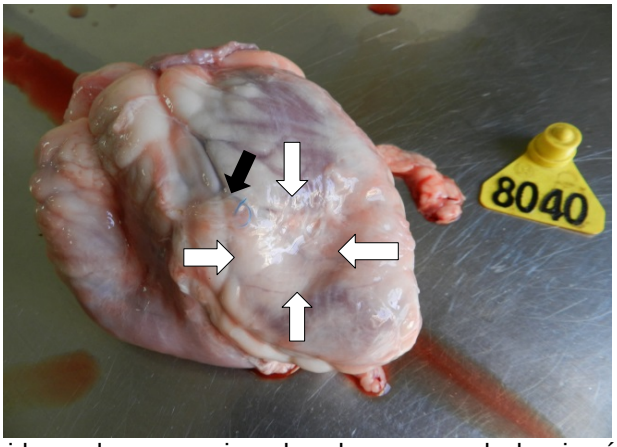

Fig. 2. Corazón de ovino obtenido en la necropsia a los dos meses de la cirugía de isquemia de micardio donde se observa el hilo de sutura (nylon monofilamento nº 4-0, flecha negra) que se usó para ocluir la 2ª arteria diagonal de la descendente anterior y el área de infarto en pared libre del VI (flechas blancas).

Fig. 3. Corazón del mismo animal que la figura 2, luego que se realizó un corte transversal en el centro de la zona infartada, identificada anteriormente.

6.2 OBSERVACIÓN MACROSCÓPICA DEL ÁREA INFARTADA

Con el segundo juego de muestras se realizó la observación del área infartada utilizando el test de tetrazolio que permite determinar la viabilidad celular en los tejidos, de esta forma se logró determinar si las muestras tomadas presentaban zonas necróticas que pudieran estar asociadas al infarto provocado. El cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio es un indicador redox que permite diferenciar tejidos metabólicamente activos de aquellos que no lo están, se utiliza principalmente para determinar la viabilidad de semillas, aunque también tiene su aplicación en tejidos animales, en la medición de áreas de infarto (22). Está prueba se basa en la reacción bioquímica de ciertas enzimas de las células vivas con la sal de tetrazolio, la cual consiste en la reducción del tetrazolio, formándose un compuesto rojo llamado formazan (23). En tejidos necróticos el tetrazolio conserva su color blanco debido a que las enzimas que lo reducen se han degradado.
En la cátedra de fisiología de Facultad de Veterinaria se realizó el test de la siguiente manera:

- se pesó 1g de cloruro de tetrazolio que es diluido en 100ml de buffer fosfato 0,1M pH 7,4
- las muestras son colocadas en placas de petri de manera que puedan ser identificadas N, Z1, Z2, Z3; a cada placa de petri se colocan aproximadamente 25ml de la solución de cloruro de tetrazolio
- se lleva las placas a baño maría a 37ºC durante 20 minutos
- se retiran las muestras y se observan las diferencias de coloración

6.3 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS PARA ANÁLISIS HISTOLOGICOS

Con las muestras de infarto obtenidas en la necropsia y fijadas en PFA al 4%, trabajamos para la obtención de los preparados histológicos. Luego de transcurridas 48hs de la necropsia se colocaron las muestras en PBS durante 3hs. Una vez transcurrido este lapso de tiempo las muestras se colocaron en alcohol 70% para conservarlas hasta su procesamiento.
Las actividades desarrolladas en Facultad de Medicina se pueden dividir en dos etapas, una primera etapa que es la inclusión de las muestras en bloques de parafina y una segunda etapa en la que el resultado final es la obtención de los preparados a utilizar en el microscopio.
El primer paso realizado fue la inclusión en bloques de parafina de cada una de las muestras (N, Z1, Z2 y Z3) de las necropsias, para su corte posterior con micrótomo por un técnico especializado. Las láminas obtenidas de cada una de las muestras se ajustaron a 5 µm de espesor.

Las actividades desarrolladas fueron las siguientes:

- Día 1: las muestras que se encontraban acondicionadas en alcohol 70% se colocan durante 3hs en alcohol 95% , luego se pasan las muestras a un recipiente conteniendo alcohol 100%, alcohol absoluto, durante 1h 30min. Este proceso de deshidratación elimina el agua de los tejidos. Por último se dejan las muestras en cloroformo hasta el día siguiente.

- Día 2: inclusión de las muestras en parafina, que va a penetrar en los vasos, en los espacios intercelulares y también en el interior de las células, embebiendo el tejido y haciendo más fácil la obtención de cortes en el micrótomo. La parafina está formada por una mezcla de hidrocarburos saturados, que a temperatura ambiente presenta un punto de fusión de entre 40 y 70ºC, dependiendo de la mezcla de hidrocarburos que componga dicha parafina. En nuestro caso se trabajó con un punto de fusión de la parafina a 60ºC. Como la parafina no es miscible en agua, los tejidos deben deshidratarse (día 1) antes de que la parafina pueda impregnarlos, para esto se utiliza el alcohol. Posteriormente se transfiere el tejido a un líquido que sea miscible tanto con el alcohol 100% como con la parafina, en nuestro trabajo se utilizó el cloroformo. Fue así que el primer paso que se realizó el día 2 consistió, una vez que se calentó la parafina a 60ºC en estufa, en llevar las muestras de manera ordenada, rotuladas y por separado, a la estufa en un baño de parafina durante 1h 30min tiempo en el cual la parafina va a ocupar el lugar del cloroformo en los tejidos. Posteriormente se realiza un segundo baño de las muestras en una nueva parafina durante 1h, de esta manera se favorece una buena impregnación de la parafina en las muestras. Por último se coloca cada una de las muestras en una nueva parafina en un molde de forma rectangular y se dejan solidificar a temperatura ambiente, se rotulan cada uno de los bloques obtenidos.

Una vez que obtuvimos los bloques de parafina, estos fueron procesados por los técnicos de la cátedra, de esta manera obtuvimos los cortes de cada una de las muestras ya colocados en portaobjetos y listos para pasar a la etapa siguiente, donde se aplicó la técnica de lectinhistoquímica que nos permitió distinguir el endotelio de los distintos vasos que se encontraban en las muestras.

Los cortes de las muestras, montados en portaobjetos, fueron llevados a estufa previamente calentada a 56ºC durante 20 minutos.
Una vez que se observó que la parafina adherida a los cortes se derretía y escurría se retiraron los portaobjetos, para pasar a la siguiente etapa, la desparafinación de las muestras. Para dicho proceso se utilizó el solvente orgánico Xilol el cual se manipulo en campana de flujo de aire debido a su volatilidad y toxicidad, las muestras fueron procesadas en dos etapas con dicho solvente: una primera etapa de 15 minutos y una segunda etapa de 10 minutos.
Posteriormente se procedió a hidratar las muestras, para ello se colocan los portaobjetos con las muestras en recipientes con soluciones de alcohol decreciente, alcohol 100 durante 3 minutos, alcohol 95 durante 2 minutos y alcohol 70 durante 2 minutos, por último se colocan en agua destilada (H_2Od) por 2 minutos.
Las muestras rehidratadas se procesaron durante 5 minutos a temperatura ambiente en solución de buffer fosfato (PBS) de pH 7,4. Y luego durante 20 minutos en PBS con el agregado de peróxido de hidrogeno (H_2O_2) al 11%, de esta manera se buscó inactivar la peroxidasa endógena presente en los tejidos.
Se realizaron tres lavados más de las muestras de duración 5 minutos cada uno, con PBS (pH 7,4).
El siguiente paso que se dio consistió en la incubación de las muestras con lectina unida a una proteína intermediaria, biotina, BS-1biotinilada. La biotina es reconocida por la avidina del complejo ABC (avidin-biotin-complex), ya que el complejo ABC contiene una peroxidasa será esta enzima la que catalice la reacción, una vez que se agregue el sustrato apropiado, diaminobencidina (DAB) más H_2O_2, lo cual nos permite observar al microscopio óptico los sitios de unión de la lectina.
En primer lugar se acondicionó un recipiente con tapa para realizar la incubación el cual se denominó cámara húmeda, en su base consta de un papel húmedo o un pequeño volumen de agua, debido a que su finalidad es evitar la evaporación de la solución con la cual se está realizando la incubación. Los preparados se secaron y colocaron de forma horizontal en la cámara.
Una vez que los preparados se colocaron en la cámara, se humedecieron con PBS utilizando un gotero, quitando el exceso de líquido. Antes de la incubación, cada preparado se cubrió con 60-100 μl de una solución de BS-1biotinilada en PBS al 1:150. El tiempo de incubación fue de 1 hora a temperatura ambiente y con la cámara tapada.
El complejo ABC se preparó en una dilución 1:200 en PBS, teniendo en cuenta que cada portaobjeto necesita aproximadamente 100μl. Al finalizar la incubación con BS-1 biotinilada se realizaron 3 lavados con PBS de 5 minutos de duración por cada lavado. Se limpió la cámara húmeda y se volvió a ensamblar para una nueva incubación, esta vez con ABC, durante 1 hora a temperatura ambiente. Transcurrido este lapso de tiempo se procedió a una nueva serie de lavados con PBS de 5 minutos de duración.

El revelado se realizó con la solución de DAB más H_2O_2 durante 5 minutos en cada uno de los portaobjetos. Luego los preparados se colocan en un vaso de vidrio ranurado conteniendo agua corriente para descartar el excedente de solución reveladora, este paso se repite una segunda vez.
Por último se deshidrataron las muestras a través de una serie de incubaciones en alcohol de 3 minutos cada una, de manera creciente alcohol 70, alcohol 95, alcohol 100. Ahora nuestras muestras ya estaban listas y concluimos el montaje colocando el cubreobjetos con una gota de pegamento DPX.

6.4 ANALISIS HISTOLOGICO

La observación de los preparados se realizó en la cátedra de histología de la Facultad de Medicina, para esto se utilizó el microscopio óptico Nikon DS-Fi1c, y la captura de imágenes se llevó a cabo con el software Nis-Elements 3.0 desarrollado por Nikon.
El conteo de vasos sanguíneos de cada zona se realizó a ciegas, para esto el operador conocía el nº de caravana del animal al cual correspondía la muestra, pero no el tratamiento al cual había sido asignado. De los preparados obtenidos de los animales sacrificados se tomaron 12 fotografías de cada una de las muestras procesadas (N, Z1, Z2 y Z3), 4 de la capa más externa (epicardio), 4 de la capa media (miocardio) y 4 de la capa más interna (endocardio).
Para poder realizar el conteo de los vasos sanguíneos de cada zona (capilares, arteriolas y vénulas), las imágenes fueron procesadas con el software ImageJ para el procesamiento de imágenes digitales de aplicación científica, desarrollado por el National Institutes of Health de los Estados Unidos. En cada fotografía se delimito un área de 150μm x 150μm, con coordenadas en los eje de x=100, y=70. Los datos obtenidos de los conteos se registraron en hojas de cálculo de Microsoft Excel.

6.5 ANALISIS ESTADISTICO

Los datos obtenidos en el conteo de los diferentes tipos de vasos sanguíneos presentes en las muestras fueron ordenados y tabulados en base de datos con el software STATISTICA 5.1 EDITION 98. El efecto del tratamiento realizado en los grupos sobre el conteo de capilares, arteriolas y vénulas se analizó mediante el test de T para grupos independientes, mientras que la diferencia entre las diferentes zonas del mismo grupo se analizó mediante test de T para grupos dependientes. En ambos casos se tomó como significativo un valor de $p < 0,05$.

7. RESULTADOS

7.1 RESULTADOS MACROSCOPICOS

A nivel macroscópico se observó lesiones en las muestras obtenidas a nivel del miocardio para cada una de las ovejas sacrificadas, las lesiones presentaron diferentes tamaños. El tamaño especifico de cada lesión fue corroborado con la prueba del colorante vital, cloruro de tetrazolio.

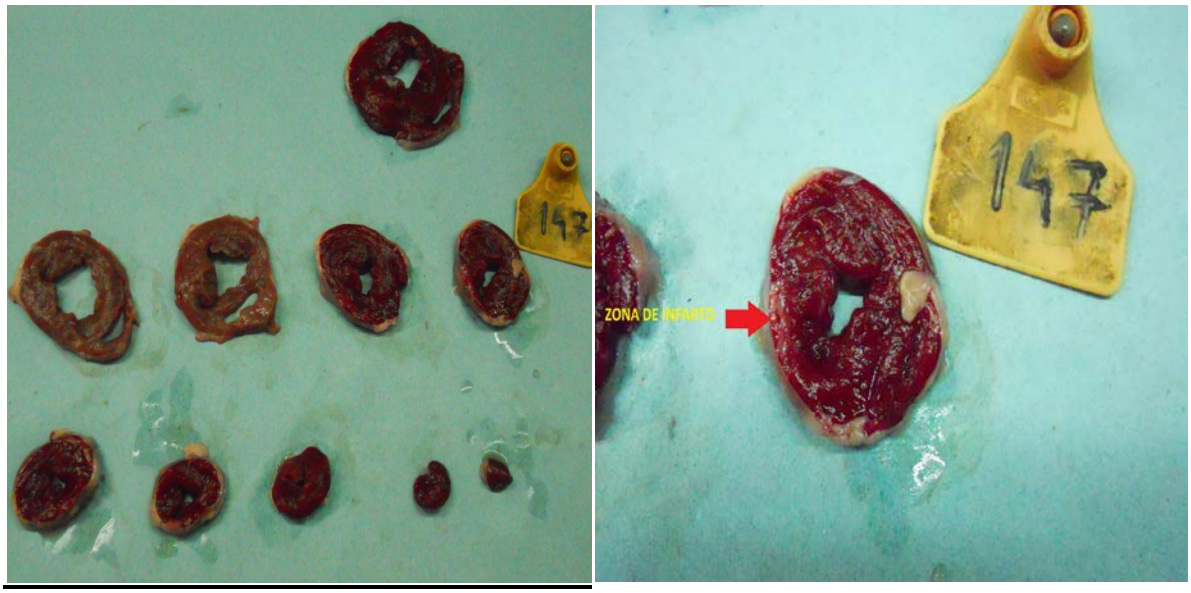

Figura 4. Muestras de corazón a las cuales se les realizo la prueba de azul de tetrazolio, para observar la viabilidad de los tejidos.

Con los pesos registrados de los animales, al momento de la necropsia, y del corazón de cada uno de ellos se confecciono la siguiente tabla:

TRATAMIENTO	OVEJA	PESO ANIMAL Kg	PESO CORAZÓN Kg
SF	1110	46,80	0,22
SF	145	57,60	0,31
SF	147	57,50	0,36
SF	8040	52,00	0,28
SF	815	65,00	0,37
SF	843	45,00	0,34
MO	817	58,80	0,30
MO	8047	41,5	0,24
MO	13	37,2	0,2
MO	1158	44	0,22
MO	1132	36,6	0,28
MO	897	55,8	0,34

Tabla 2. Peso animal (PA), Peso corazón (PC) registrados en las necropsias.

7.2 CONTEO DE CAPILARES

Los resultados obtenidos en el conteo de capilares realizado a nivel microscópico se observan en la tabla 3 y en el gráfico 1.

CAPILARES	MO	SF	*P*
Total N	505 ± 81,6	496,5 ± 123,2	0,9
Total Z I	**225,8 ± 45,9**	**130,8 ± 79,7**	**0,03***
Total Z II	396,3 ± 189,8	210,8 ± 126,8	0,07**
Total Z III	497,5 ± 82,5	401,3 ±127,5	0,2

Tabla 3: Resultado del conteo de capilares en las zonas I, II, III y N de los dos grupos experimentales, * *P*<0,05; ** *p*=0,07

Los resultados muestran una diferencia significativa en la zona 1, *p* = 0,03, entre el grupo de tratamiento con MO 225,8±45,9 con respecto al grupo SF 130,8±79,7; la Z1 es la zona de mayor isquemia. La zona 2 muestra una tendencia *p* = 0,07 del grupo tratamiento de MO 396,3±189,3 con respecto al grupo de tratamiento SF 210,8±126,8. Por último no se observo diferencias entre los grupos de tratamiento para la zona normal (MO 505±81,6; 496±123,2; con *p* = 0,9) y la zona 3 (MO 497,5±82,5; SF 401,3±127,5; con *p* = 0,2).

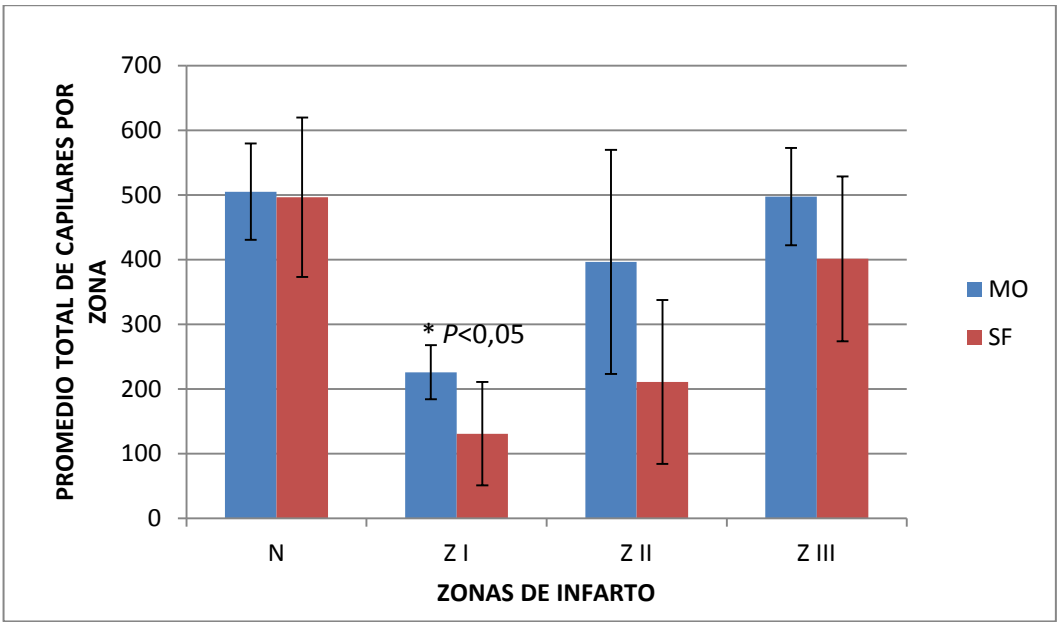

Gráfico 1. Promedio total de capilares según zonas de infarto, para el grupo tratamiento y el grupo control

8. DISCUSIÓN

8.1 ANIMALES Y TECNICA PARA INDUCIR ISQUEMIA

El modelo animal utilizado fue el ovino, los mismos presentan importantes ventajas entre ellas la importancia de poseer una anatomía cardíaca similar a la de los humanos, además de presentar un desarrollo de vasos colaterales menor luego de inducida la oclusión coronaria lo cual permite controlar de mejor forma el modelo de estudio (29). Otras especies utilizadas como modelo de infarto de miocardio son los porcinos (27) y la rata (28). Los porcinos presentan mayor predisposición a sufrir arritmias luego de la inducción de la isquemia, lo cual complica los protocolos experimentales y aumenta la probabilidad de muerte, esto es una importante desventaja con respecto a los ovinos (29), mientras que las ratas son modelos que tienen bajos costos de producción y manutención, y permiten la obtención de una muestra grande en poco tiempo debido a su alta tasa de reproducción. Sin embargo el aspecto negativo de este modelo está dado por la extrapolación al modelo humano ya que las diferencias fisiológicas son amplias: potenciales de acción muy cortos; la bomba Na/Ca^2 tiene un papel poco importante en la salida de calcio del citosol; la frecuencia cardíaca es cinco veces mayor en reposo que la de los humanos (31).

Diferentes técnicas se han utilizado para provocar isquemia o infarto, la utilizada en los animales del presente trabajo fue la oclusión de la segunda rama diagonal de la descendente anterior, al igual que la técnica utilizada por Kamihata *et al* (2001), en porcinos.
A su vez Moainie *et al* (2002) observó que la ligación de la primera o de la segunda rama diagonal de la descendente anterior, en un modelo ovino, induce un 24% de infarto en la masa muscular del ventrículo izquierdo (30).
Otra de las técnicas que se utilizan con mayor frecuencia es la crionecrosis que consiste en la injuria del miocardio provocada por una sonda metálica previamente enfriada en una inmersión de nitrógeno líquido, dicha técnica fue utilizada por Tomita *et al* (1999). Las ventajas de la crionecrosis con respecto a la ligación están dadas por la posibilidad de controlar el tamaño y la zona en la cual se provoca la lesión, en comparación con la ligación en la que el tamaño del infarto y la zona en cual se desarrollara es variable, la principal ventaja de la ligación con respecto a la crionecrosis radica en su relevancia clínica como modelo de infarto (28).

8.2 CÉLULAS MADRES UTILIZADAS EN LA TERAPIA CELULAR Y FORMA DE ADMINISTRACIÓN

Kamihata *et al* (2001) y Tomita *et al* (1999), utilizaron en sus trabajos CMMO, ambos investigadores concluyeron que el trasplante de CMMO autóloga en un modelo de IAM induce la angiogenesis en el cerdo y en la rata, respectivamente, mejorando el flujo en la zona infartada y la funcionalidad cardiaca.
Las CMMO pueden extraerse del propio paciente, CMMO autóloga, ó de un donante, CMMO alogénica. Para Tomita *et al* (1999), debido a las desventajas del

inmunorechazo por parte del huésped, el trasplante de CMMO autóloga es ideal. Sin embargo para Pittenger y Martin (2004), el trasplante autólogo presenta desventajas como la necesidad de practicar una biopsia al paciente en momentos en los que tal vez la producción de células por parte de la médula no sea la suficiente, cultivar las células, y almacenarlas para su administración; para ambos autores el trasplante alogénico ofrece ventajas como la clasificación y estudio de los donantes, y la disponibilidad inmediata de las células alogénicas en caso de ser necesitadas (32).
Las CMMO contienen varios tipos de linajes celulares, como células hematopoyéticas, fibroblastos, osteoblastos, endoteliales (27) y células mesenquimales que son raras y escasas en la médula ósea (32).
La capacidad de las células mesenquimales de diferenciarse en cardiomiocitos (33) y su habilidad de incorporarse en la neovasculatura durante los procesos de angiogenesis (34), son características de gran importancia en la terapia celular.
En el presente trabajo las CMMO utilizadas fueron autólogas, de esta manera se eliminan los problemas relacionados con el sistema inmunológico, además de un ahorro significativo en los tiempos de trabajo en cuanto a lo que cosecha y cultivo se refiere.

La vía de administración utilizada, la inyección intramiocárdica, se muestra como la más eficaz ya que permite la identificación de las zonas de infarto garantizando una aplicación local del tratamiento lo cual representa una gran ventaja frente a vías de administración sistémica, además del control preciso del volumen administrado. La vía sistémica intracoronaria es de fácil administración pero no posibilita la administración prolongada, con riesgos como el desarrollo de placas arterioescleróticas (35, 36, 37).
Otro punto a tener en cuenta es el momento de administración del tratamiento en el caso de Kamihata *et al* (2001) y el presente trabajo, la implantación en la zona de infarto fue realizada inmediatamente después de liberada la ligadura, a diferencia del trabajo realizado por Tomita *et al* (1999) en el cual la implantación se realizo 3 semanas después de provocada la lesión por crionecrosis. Estos tiempos pueden llevar a diferencias a la hora de evaluar resultados, ya que en el caso de Tomita *et al* (1999) un factor importante está dado por el tiempo en el cual los mecanismos de reparación propios del miocardio actuaron solos sin CMMO implantadas en la zona de injuria, a diferencia de los otros trabajos en los cuales inmediatamente después de provocada la injuria se aplicó el tratamiento, y los mecanismos intrínsecos del miocardio más las CMMO aplicadas en el tratamiento se potenciaron en conjunto.

8.3 PODER ANGIOGENICO DE LA TERAPIA CELULAR EN EL IAM

Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron un aumento significativo en el número de capilares en la zona Z1 en los animales tratados con MO en comparación con los animales del grupo control, tratados con SF.
El resultado concuerda con lo comunicado por Kamihata *et al* (2001) en porcinos y por Tomita *et al* (1999) en ratas.
En el caso de Tomita *et al* (1999) evaluaron el poder angiogénico en 4 grupos de ratas adultas, el primer grupo fue tratado con CMMO frescas, el segundo con

CMMO cultivadas durante 7 días, el tercer grupo con CMMO + 5-azacitidina (5aza) que induce la diferenciación de CMMO en células miogénicas, el cuarto grupo tratado como control con medio de cultivo IMDM (Iscove's modified Dulbecco medium). Nuestros resultados son coincidentes en cuanto al tratamiento con el grupo de CMMO frescas. Los resultados obtenidos por Tomita *et al* (1999) son significativos (6296 capilares/0.2mm^2 para CMMO frescas y 2126 capilares/0.2mm^2 para el grupo control) y demuestran el poder angiogénico de las CMMO frescas. Para los grupos de tratamiento con CMMO cultivadas (5936 capilares/0.2mm^2) y CMMO-5aza (5746 capilares/0.2mm^2) también observaron angiogenesis, lo cual demuestra el poder de las CMMO en la terapia celular, a pesar de las distintas formas de procesamiento de las células.

En un modelo de crionecrosis, como el utilizado por Tomita *et al* (1999), la angiogenesis por sí sola no es capaz de lograr una mejoría en cuanto a las funciones contráctiles del miocardio, sin embargo en un modelo de ligación la angiogenesis puede mejorar la funcionalidad cardíaca, llevando sangre a cardiomiocitos que quedaron aislados luego de la isquemia (28).
La evaluación de la contractibilidad cardíaca es un tema a considerar en nuestro trabajo, y podría aportarnos datos que nos permitan evaluar la recuperación contráctil del miocardio.

Kamihata *et al* (2001) demostraron a través de angiografía coronaria que el desarrollo de la circulación colateral, en un modelo porcino de ligación, se vio incrementado luego de ser tratado con CMMO a pesar de que fisiológicamente en los porcinos la circulación colateral es de por sí pobre (27). Como se mencionó previamente el bajo desarrollo de la circulación colateral es una característica que comparten ovinos y porcinos, con los resultados obtenidos en el presente trabajo podemos inferir que el desarrollo de la circulación colateral se vio incrementado teniendo en cuenta la diferencias significativas entre el grupo tratamiento con el grupo control en el conteo de capilares. Sin embargo la imposibilidad de aplicar técnicas como la angiografía coronaria es algo que queda en el debe en el presente trabajo y nos permitiría afirmar con mayor exactitud el desarrollo de la circulación colateral.

.

9. CONCLUSIÓN

Los resultados obtenidos demuestran la factibilidad de la aplicación de la terapia celular con CMMO mesenquimales como alternativa a la RVQM. Debido al desarrollo incipiente del área de la terapia celular aún falta camino por recorrer en el campo de la investigación para lograr determinar el mejor método de extracción y aplicación de las CMMO mesenquimales así como el control en tiempo, forma y espacio del proceso angiogénico, para que sea factible el desarrollo de terapias celulares dentro de la medicina humana.

10. BIBLIOGRAFIA

1- Global status report on noncommunicable disaeses 2010. Geneva, World Health Organization, 2011

2- Global atlas on cardiovascular disease prevention and control. Geneva, World Health Organization, 2011

3- INE y MSP, División Estadística "Principales causas de muerte según el año (Tasa por 100.000 habitantes). Período 1900 - al ultimo dato disponible" [en línea]. Disponible en la web: http://www.ine.gub.uy/socio-demograficos/salud2008.asp

4- INE y MSP, División estadística, "Defunciones anuales ocurridas y registradas y tasa bruta de mortalidad. Período 1900 - al último dato disponible" [en línea]. Disponible en la web: http://www.ine.gub.uy/socio-demograficos/vitales2008.asp

5- Curto Sergio, Prats Omar, Leonardo Martinez. Mortalidad por enfermedades cardiovasculares,Uruguay 2011, Informe Epidemiológico.Revista Uruguaya de Cardiología,2011.

6- Guyton, A. C. (1998). Hall JE Tratado de Fisiología Medica. 8va edicion. 2.

7- Henry, T. D. (1999). Science, medicine, and the future: Therapeutic angiogenesis. BMJ: British Medical Journal, 318(7197), 153

8- Schaper W, Ito WD. Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. Circ Res 1996;79:911-9

9- Charney R, Cohen M. The role of the coronary collateral circulation in limiting myocardial ischemia and infarct size. Am Heart J 1993;126: 937-45.

10- Datos proporcionados a mi mail por el FNR, en una consulta que le realice a traves de la web.Disponibles en caso de ser requeridos en el mail fnr@fnr.gub.uy

11- Coronary Artery Surgery Study (CASS): a randomized trial of coronary artery bypass surgery quality of life in patients randomly assigned to treatment groups. Circulation 1983;68(5): 951-60

12- Scott R, Blackstone EH, McCarthy PM, Lytle BW, Loop FD, White JA, et al. Isolated bypass grafting of the left internal thoracic artery to the left anterior descending coronary artery: late consequences of incomplete revascularization. J Torac Cardiovasc Surg 2000; 120(1): 173-84

13- Ayala Lugo, A. (2007). Medicina regenerativa y enfermedades cardiovasculares: terapia con células madre. Mem. Inst. Investig. Cienc. Salud, 5(2), 38-41.

14- Grenier G, Rudnicki MA. Stem Cells. Springer (NY): Wobus A and Boheler K editors; 2006

15- Balsam LB, Robbins RC. Haematopoietic stem cells and repair of the ischaemic heart. Clin Sci (Lond)2005;109(6):483-92.

16- Wang XJ, Li QP. The roles of mesenchymal stem cells (MSCs) therapy in ischemic heart disease. Biochem Biophys Res Commun. 2007; 359(2):189-93.

17- Lorier, G., Touriño, C., Rodríguez, I., Díaz, L., Lujambio, M., Mato, S. & Roca, R. (2008). Revascularización miocárdica biológica complementaria a la revascularización miocárdica quirúrgica convencional. Comunicación preliminar de estudio prospectivo de casos y controles, randomizado y doble ciego. Revista Médica del Uruguay, 24(4), 246-256.

18- Waller, B. F., Orr, C. M., Slack, J. D., Pinkerton, C. A., Van Tassel, J., & Peters, T. (1992). Anatomy, histology, and pathology of coronary arteries: A review relevant to new interventional and imaging techniques—Part I. Clinical cardiology, 15(6), 451-457.

19- Rubio-Gayosso, I., Barajas-Espinosa, A., Castillo, H., Ramiro-Diaz, J., Ceballos, G., & Rubio, R. (2005). Enzymatic hydrolysis of luminal coronary glycosidic structures uncovers their role in sensing coronary flow. Front Biosci, 10, 1050-1059.

20- Jeansson, M., & Haraldsson, B. (2006). Morphological and functional evidence for an important role of the endothelial cell glycocalyx in the glomerular barrier. American Journal of Physiology-Renal Physiology, 290(1), F111-F116.

21- Hébert, E. (2000). Endogenous lectins as cell surface transducers. Bioscience reports, 20, 213-237.

22- Carrión, C. L., Miksztowicz, V., Erni, L., Buchholz, B., D'ANNUNZIO, V. E. R. Ó. N. I. C. A., Berg, G., ... & Basso, N. (2008). Efecto de la rosuvastatina sobre el infarto experimental en conejos normales e hipercolesterolémicos. Rev Argent Cardiol, 76, 118-123.

23- Moreno, E. (1984). Análisis físico y biológico de semillas agrícolas. UNAM.

24- Varki, A., Cummings, R., Esko, J., Freeze, H., Hart, G., and Marth, J., (eds) (1999) Essentials of Glycobiology Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

25- Crocker, P. R., & Feizi, T. (1996). Carbohydrate recognition systems: functional triads in cell—cell interactions. Current opinion in structural biology, 6(5), 679-691.

26- Mäkelä,O. (1957) Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. Ann. Med.Exp. Biol. Fenn. Suppl., 35, 1–156

27- Kamihata, H., Matsubara, H., Nishiue, T., Fujiyama, S., Tsutsumi, Y., Ozono, R., ... & Iwasaka, T. (2001). Implantation of bone marrow mononuclear cells into ischemic myocardium enhances collateral perfusion and regional function via side supply of angioblasts, angiogenic ligands, and cytokines. circulation, 104(9), 1046-1052.

28- Tomita, S., Li, R. K., Weisel, R. D., Mickle, D. A., Kim, E. J., Sakai, T., & Jia, Z. Q. (1999). Autologous transplantation of bone marrow cells improves damaged heart function. Circulation, 100(suppl 2), II-247.

29- Monnet, E., & Chachques, J. C. (2005). Animal models of heart failure: what is new?. The Annals of thoracic surgery, 79(4), 1445-1453.

30- Moainie, S. L., Gorman III, J. H., Guy, T. S., Bowen III, F. W., Jackson, B. M., Plappert, T., ... & Gorman, R. C. (2002). An ovine model of postinfarction dilated cardiomyopathy. The Annals of thoracic surgery, 74(3), 753-760.

31- Hasenfuss, G. (1998). Animal models of human cardiovascular disease, heart failure and hypertrophy. Cardiovascular research, 39(1), 60-76.

32- Pittenger, M. F., & Martin, B. J. (2004). Mesenchymal stem cells and their potential as cardiac therapeutics. Circulation research, 95(1), 9-20.

33- Makino, S., Fukuda, K., Miyoshi, S., Konishi, F., Kodama, H., Pan, J., ... & Ogawa, S. (1999). Cardiomyocytes can be generated from marrow stromal cells in vitro. The Journal of clinical investigation, 103(5), 697-705.

34- Tomita, S., Mickle, D. A., Weisel, R. D., Jia, Z. Q., Tumiati, L. C., Allidina, Y., ... & Li, R. K. (2002). Improved heart function with myogenesis and angiogenesis after autologous porcine bone marrow stromal cell transplantation. The Journal of thoracic and cardiovascular surgery, 123(6), 1132-1140.

35- Nabel, E. G., Yang, Z. Y., Plautz, G., Forough, R., Zhan, X., Haudenschild, C. C., ... & Nabel, G. J. (1993). Recombinant Fibroblast Growth Factor-i Promotes Intimal Hyperplasia And Angiogenesis In Arteries Invivo.

36- Flugelman, M. Y., Virmani, R., Correa, R., Yu, Z. X., Farb, A., Leon, M. B., ... & Epstein, S. E. (1993). Smooth muscle cell abundance and fibroblast growth factors in coronary lesions of patients with nonfatal unstable angina. A clue to the mechanism of transformation from the stable to the unstable clinical state. Circulation, 88(6), 2493-2500.

37- Inoue, M., Itoh, H., Ueda, M., Naruko, T., Kojima, A., Komatsu, R., ... & Nakao, K. (1998). Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression in Human Coronary Atherosclerotic Lesions Possible Pathophysiological Significance of VEGF in Progression of Atherosclerosis. Circulation, 98(20), 2108-2116.

38- Jussila, L., & Alitalo, K. (2002). Vascular growth factors and lymphangiogenesis. *Physiological Reviews*, *82*(3), 673-700.

39- Rosales Torres, A. M., & Guzmán Sánchez, A. (2012). Importancia del Factor de Crecimiento del Endotelio Vascular (VEGF) y de sus receptores en el ciclo ovárico: Revisión. *Revista mexicana de ciencias pecuarias*, *3*(1), 89-111.

40- Hellström, M., Gerhardt, H., Kalén, M., Li, X., Eriksson, U., Wolburg, H., & Betsholtz, C. (2001). Lack of pericytes leads to endothelial hyperplasia and abnormal vascular morphogenesis. *The Journal of cell biology*, *153*(3), 543-554.