



TRABAJO FIN DE GRADO

ESTUDIO CLÍNICO Y EXPERIMENTAL DE LA HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA POR SOBRECARGA DE PRESIÓN Y DE SU REGRESIÓN

***CLINICAL AND EXPERIMENTAL STUDY ON THE PRESSURE
OVERLOAD LEFT VENTRICULAR HYPERTROPHY AND ITS
REGRESSION***

Xabier Irazusta Olloquiegui

Director: Juan Francisco Nistal Herrera

Co-directora: Maria del Amor Hurlé González

Santander, Junio 2016

ÍNDICE

1.INTRODUCCIÓN.....	7
1.1Estenosis aórtica.....	7
1.1.1Tipos.....	7
1.1.2Fisiopatología.....	8
1.2Hipertrofia del ventrículo izquierdo.....	10
1.2.1 Tipos.....	10
1.2.2 Fisiopatología.....	11
1.2.3 Aspectos moleculares.....	12
1.3 Remodelado inverso.....	16
1.4 Modelos animales para el estudio del remodelado miocárdico secundario a sobrecarga de presión y su regresión.....	17
2. OBJETIVOS.....	21
3. MATERIAL Y METODOS.....	22
3.1 Animales de experimentación.....	22
3.2 Constricción del arco aórtico transverso mediante la técnica de “doble vuelta + clip”	22
3.3 Cirugía de retirada de la constricción aórtica.....	24
3.4 Estudios ecocardiográficos.....	24
3.4.1 Proyección paraesternal del eje largo.....	25
3.4.2 Proyección paraesternal del eje corto.....	26
3.4.3 Proyección cuatro cámaras.....	28
4.RESULTADOS.....	33
4.1 Evolución de las alteraciones ecocardiográficas en los periodos De CAT y de-CAT.....	33
5. DISCUSIÓN.....	40
5.1 Mejoras técnicas introducidas a las técnicas CAT y de-CAT en ratones.....	41

5.2 Modificaciones funcionales secundarias a la sobrecarga de presión mediante CAT y su regresión tras de-CAT.....	43
5.3 Remodelado inverso tras el de-CAT.....	46
6. CONCLUSIONES.....	49
6.1 Desarrollo de innovaciones metodológicas en las técnicas de constricción del arco aórtico y posterior retirada.....	49
6.2 Ventajas de éste modelo quirúrgico respecto a las técnicas convencionales.....	49
6.3 Cambios ecocardiográficos morfo-funcionales en este modelo murino.....	49
7. BIBLIOGRAFIA.....	50
8. AGRADECIMIENTOS.....	55
9. ANEXOS.....	56

RESUMEN

Introducción y objetivos: La estenosis aórtica es la valvopatía más común que requiere cirugía en el mundo occidental. El objetivo del presente trabajo fue el entrenamiento acerca de la valoración de la hipertrofia ventricular izquierda por sobrecarga de presión y de su regresión desde el punto de vista ecocardiográfico.

Material y métodos: Estudio experimental llevado a cabo en ratones de la cepa C57/BL6, comparando diferentes variables ecocardiográficas en situación basal, a las 4 semanas tras la constricción de la aorta transversa y a las 4 semanas tras la deconstricción de la aorta transversa.

Resultados: Tras el CAT, durante las 4 semanas de seguimiento, la MAPSE y la FEVI se deterioraron, mientras que el resto de las variables (el SIV, la PP, el DTS, el DTD, la relación E/é, el gradiente, la masa cardiaca y la masa ajustada al peso) aumentaron progresivamente. Tras el de-CAT, tras otras 4 semanas de seguimiento, los valores que se recuperaron con respecto al CAT fueron la PP, el DTS, la FEVI, la masa cardiaca y el gradiente. Si bien ninguno de estos, ni obviamente el resto, alcanzaron los valores basales.

Conclusiones: Los cambios ecocardiográficos morfo-funcionales en este modelo murino muestran paralelismo con los de los pacientes con estenosis aórtica, observándose hipertrofia ventricular concéntrica, acompañada de deterioro significativo de la función sistólica en los ejes radial y longitudinal y de la función diastólica.

Palabras clave: Estenosis aórtica, hipertrofia del ventrículo izquierdo, constricción del arco aórtico, variables ecocardiográficas, remodelado inverso.

ABSTRACT

Background and aims: Degenerative calcific valvular aortic stenosis is the most common heart valve disease of the adult that requires surgery in the western world. This pathology imposes a restriction to left ventricular ejection that translates into a progressive pressure overload. The aim of this study was the training to evaluate the pressure overload left ventricular hypertrophy and its regression from the echocardiographic point of view in the clinical and experimental scenarios.

Material and methods: Experimental study, carried out in mice (strain C57/BL6), comparing different echocardiographic variables in basal situation, four weeks after surgical transverse arch aortic constriction (TAC) and four weeks after the release of a previous transverse aortic constriction.

Results: During the following 4 weeks after TAC, the MAPSE and the left ventricular ejection fraction (LVEF) deteriorated, whereas the rest of the morphofunctional variables (IVST, PWT, ESD, EDD, E/e', transcoarctational gradient, LVM and LVMI normalized to the animal's weight) increased progressively. Four weeks after the surgical release of the aortic banding (de-TAC), some of these variables (PWT, ESD, LVEF, LVM and transcoarctational gradient) regressed, but none of them recovered baseline values.

Conclusions: The echocardiographic morphofunctional changes in this mice model accurately mirror those of the patients with aortic stenosis and include LV concentric hypertrophy, significant deterioration of the systolic function, in the radial and longitudinal axes, and of the diastolic function.

Keywords: Aortic stenosis, left ventricular hypertrophy, aortic arch constriction, echocardiographic variables, reverse remodelling.

1. INTRODUCCIÓN

1. INTRODUCCIÓN

1.1 ESTENOSIS AÓRTICA

La estenosis aórtica (EA) es una valvulopatía caracterizada por el estrechamiento anormal del orificio de la válvula aórtica, en consecuencia se produce una obstrucción al flujo de salida de la sangre desde el ventrículo izquierdo. En los países occidentales, es la enfermedad valvular que con mayor frecuencia requiere tratamiento quirúrgico¹ y la valvulopatía más frecuente del adulto. Además de la estenosis aórtica a nivel valvular existen otros cuadros, con similares consecuencias fisiopatológicas aunque menos prevalentes, en los que la obstrucción puede situarse por encima (supra- valvular) o por debajo (infra- valvular) del plano valvular.

La EA tiene tres causas principales: congénita, reumática y degenerativa. La EA valvular *sin valvulopatía mitral* acompañante es más frecuente en hombres que en mujeres, raras veces tiene una causa reumática y habitualmente es congénita o degenerativa-

Estenosis aórtica congénita: Las válvulas aórticas congénitamente malformadas pueden ser uni-, bi-, tri- o cuadrícúspides. Las válvulas unicúspides producen obstrucción grave en la lactancia y son las malformaciones valvulares aórticas más frecuentes en niños menores de un año. Las válvulas congénitamente bicúspides presentan fusión de las comisuras en el momento del nacimiento, aunque con frecuencia no producen estenosis grave del orificio aórtico durante la infancia. Con frecuencia tienen agregación familiar, compatible con una herencia autosómica dominante, de modo que está justificado el cribado ecocardiográfico a los familiares de primer grado. Las válvulas tricúspides congénitamente estenóticas cursan con cúspides de tamaño desigual y cierto grado de fusión de las comisuras y, aunque muchas de estas válvulas mantienen la función normal durante toda la vida, se ha propuesto que el flujo turbulento que produce alteración congénita leve de la arquitectura puede producir fibrosis y en última instancia calcificación y estenosis progresiva. Las válvulas aórticas estenóticas en la edad adulta con morfología tricúspide pueden tener un origen congénito, reumático o degenerativo.

Estenosis aórtica adquirida: La **EA reumática** se debe a un proceso inflamatorio valvular de origen autoinmune con desencadenante infeccioso que origina adhesiones y fusiones de las comisuras y neovascularización de los velos, lo que da lugar a engrosamiento, retracción y rigidez de los bordes libres de las cúspides. Aparecen nódulos calcificados en ambas superficies, y el orificio queda reducido a una pequeña abertura redonda o triangular. En consecuencia, la válvula reumática con frecuencia es insuficiente además de estenótica. La EA reumática está disminuyendo en frecuencia en los países desarrollados. A menudo coexiste con afectación de la válvula mitral y suele haber presencia de nódulos de Aschoff en el miocardio en los casos de carditis grave.

La **EA degenerativa calcificada** relacionada con la edad es en la actualidad la causa más frecuente de EA en adultos y es más frecuente en hombres que en mujeres (3-4:1)². En un estudio ecocardiográfico poblacional se observó que el 2% de las personas con 65 o más años tenía EA calcificada franca, mientras que el 29% mostraba esclerosis de la

válvula aórtica, una fase previa de degeneración sin estenosis significativa. Se está imponiendo la teoría de que el proceso degenerativo incluye cambios proliferativos e inflamatorios, con acumulación de lípidos, estimulación de la actividad de la ECA e infiltración por macrófagos y linfocitos T, que en último término dan lugar a la formación de hueso. Los factores de riesgo para la aparición de una EA calcificada son similares a los de la aterosclerosis vascular e incluyen hipertensión arterial sistémica, elevación de la concentración sérica de colesterol LDL y de Lp(a), diabetes, y tabaquismo. La estenosis aórtica degenerativa comparte varios factores de riesgo con la aterosclerosis y las medidas de prevención secundaria con modificación de estos factores pueden retrasar su progresión.

Con la reducción del área valvular aórtica (AVA) se produce una disipación de energía durante el transporte de sangre desde el VI a la aorta. Cuando la restricción del AVA supera el 50% con respecto al normal, se produce un aumento significativo de la presión del VI, pero la presión aórtica se mantiene dentro de la normalidad hasta el desarrollo de disfunción sistólica del ventrículo izquierdo en las últimas fases de la enfermedad. El aumento de la presión intracavitaria del VI, se acompaña de incrementos paralelos de la tensión o estrés sistólicos intraparietales de acuerdo con la ley de Laplace y de un deterioro del gasto cardíaco en línea con el aumento de la postcarga^{10A, 10B}.

El corazón normaliza la tensión sistólica mediante el engrosamiento parietal. La EA se desarrolla, generalmente, con lentitud y por eso la hipertrofia aparece de forma proporcional al aumento de la presión intracavitaria, de modo que la tensión parietal del miocardio se mantenga dentro de la normalidad. Por tanto, el mecanismo más importante por el que el corazón hace frente a la obstrucción del tracto de salida del VI es la hipertrofia ventricular.

Las propiedades diastólicas están alteradas en la EA. Esta anomalía se debe tanto al deterioro de la relajación miocárdica como a la alteración de la distensibilidad del ventrículo izquierdo hipertrófico. Como resultado, aumenta la presión telediastólica del VI, aunque no es patognomónico de este cuadro. Para llenar el VI, la aurícula se ve obligada a contraerse de forma enérgica, en consecuencia, gracias a la sístole auricular se produce el llenado del VI y la longitud de fibra necesarios para conseguir un volumen diastólico final adecuado. Se produce un aumento transitorio de la presión auricular izquierda debido a una onda *a* grande, pero la presión auricular media se mantiene dentro de la normalidad. La sobrecarga crónica de presión a la que se ve sometida la aurícula izquierda provoca la hipertrofia de sus paredes como respuesta adaptativa a un ventrículo relativamente rígido y diástole-dependiente.

En fases avanzadas, el progresivo aumento de la postcarga a la que está sometido el VI condiciona la insuficiencia para bombear todo el volumen de sangre que recibe a través de la válvula mitral. Esto se acompaña de una dilatación ventricular progresiva, aumento de las presiones de llenado ventriculares, deterioro de la fracción de eyección y finalmente insuficiencia cardíaca.

En la evolución natural de los pacientes con EA hay un periodo latente asintomático, durante el cual hay una obstrucción y una sobrecarga de presión crecientes sobre el

miocardio. Las manifestaciones cardinales de la EA son la angina de pecho, síncope y disnea de esfuerzo. Estos síntomas la mayoría de las veces comienzan en la quinta o sexta décadas de la vida en los casos de EA congénita o reumática y en la octava o novena en los que tiene EA degenerativa calcificada. La angina habitualmente es similar a la observada en pacientes que tienen enfermedad arterial coronaria, porque es precipitada por el ejercicio y se alivia con el reposo. El síncope se produce la mayor parte de las veces por la reducción de la perfusión cerebral que ocurre durante el esfuerzo cuando hay disminución de la presión arterial de manera secundaria a vasodilatación sistémica en presencia de gasto cardíaco fijo. Como el gasto cardíaco se mantiene en límites normales durante muchos años en pacientes que tienen EA grave, habitualmente no son importantes síntomas como la fatigabilidad, debilidad, cianosis periférica u otras manifestaciones de bajo gasto cardíaco hasta etapas bastante tardías de la evolución de la enfermedad.

La ecocardiografía es la prueba complementaria más importante para evaluar y seguir a los pacientes que tienen EA y para seleccionar los candidatos a la cirugía. La ecocardiografía transtorácica bidimensional es útil para detectar la calcificación valvular, para perfilar los velos valvulares y a veces para determinar la gravedad de la estenosis mediante la visualización del orificio. El orificio se puede definir con más claridad mediante ecocardiografía transesofágica, que ofrece una proyección de eje corto más precisa de la válvula aórtica. La ecocardiografía Doppler permite calcular el gradiente de presión entre el ventrículo izquierdo y la aorta a partir de la señal de velocidad sistólica a través de la válvula aórtica utilizando la ecuación modificada de Bernoulli. Los gradientes que se determinan de manera no invasiva por este método se correlacionan bien con los registrados mediante cateterismo del corazón izquierdo. El método Doppler puede sobrestimar la gravedad de la EA debido al fenómeno de recuperación de presión distal a una estenosis, que influye menos sobre las mediciones manométricas que se realizan en un cateterismo. Sin embargo, la magnitud de este efecto se puede calcular lo que permite corregir las mediciones para obtener una evaluación exacta de la gravedad de la EA.

1.2 HIPERTROFIA VENTRICULAR IZQUIERDA

El corazón, además de su función primaria como bomba, es un órgano capaz de adaptar su estado trófico a las necesidades de cada individuo. Es importante mencionar que esta característica es bidireccional, de forma que facilita desde la pérdida de masa cardíaca en situaciones de descarga mecánica con soporte circulatorio, ingravidez o reposo prolongado, hasta los incrementos fisiológicos durante el entrenamiento deportivo de alto rendimiento, el embarazo o el crecimiento postnatal³. Además, el corazón puede desarrollar hipertrofia patológica debida a numerosas patologías cardiovasculares⁴ capaces de inducir un remodelado patológico.

El remodelado cardíaco es una respuesta de plasticidad tisular que incluye complejas modificaciones transcripcionales, de señalización, estructurales, electrofisiológicas y funcionales del cardiomiocito. En paralelo participan otras células miocárdicas como los fibroblastos (producen fibrosis), las células endoteliales vasculares (provocan disfunción endotelial), las células musculares lisas de la pared vascular (relacionadas con la rigidez vascular) y los leucocitos (promotores de la inflamación)⁵.

En cuanto al remodelado fisiológico, hay que destacar que en la edad adulta existe una enorme diversidad interindividual en el tamaño del corazón. Dentro de las múltiples disciplinas deportivas, en atletas profesionales se observan incrementos superiores al 50% de la masa cardíaca con respecto a los valores normales. En las modalidades donde predomina el ejercicio isométrico y asocian sobrecarga de presión, como la halterofilia, se produce remodelado concéntrico del VI, mientras que en deportes de resistencia con ejercicio isotónico y alto gasto cardíaco, como la natación, la hipertrofia se produce en forma de remodelado excéntrico⁶.

El remodelado patológico del miocardio incluye un conjunto de eventos moleculares y celulares que se producen tras un insulto al miocardio, que desencadena cambios en la morfología, estructura, dimensiones y función de las cavidades cardíacas⁷.

Desde un punto de vista macroscópico se distinguen tres patrones de crecimiento del ventrículo (Figura: 1). El **remodelado concéntrico** es una modificación geométrica con aumento del grosor relativo de la pared ventricular pero con masa cardíaca normal. La **hipertrofia concéntrica** es un incremento en el grosor relativo de la pared y de la masa cardíaca sin o con mínimo cambio en el volumen intracavitario. La característica estructural de este patrón de crecimiento, que muchas veces se debe a una sobrecarga de presión, por ejemplo la EA, es la adición de sarcómeros en paralelo junto con el crecimiento del diámetro de los cardiomiocitos. La **hipertrofia excéntrica** es un incremento de la masa cardíaca con un incremento del volumen intracavitario. El grosor relativo de la pared puede estar aumentado normal o disminuido⁸. La estimación de la masa ventricular mediante Resonancia Magnética cardíaca es más precisa que mediante la ecocardiografía.

El desarrollo de la hipertrofia concéntrica del VI, en las fases iniciales de la EA, tiene como objetivo compensar el estrés sistólico de la pared, que se produce por el aumento de la presión dentro de la cavidad, y mantener la función sistólica¹⁰.

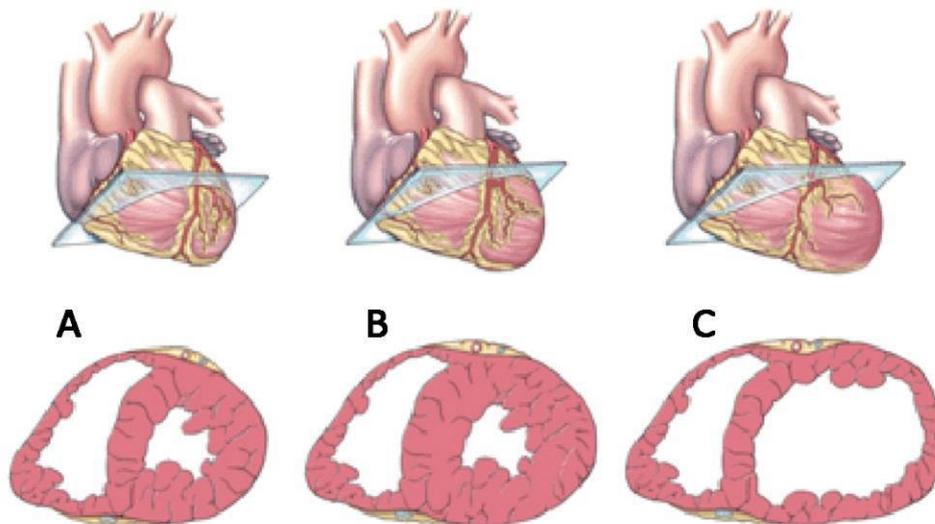


Figura 1: Imagen representativa de la sección transversal de un corazón sano y con hipertrofia concéntrica y excéntrica. **A:** Corazón normal. **B:** Corazón con hipertrofia concéntrica, en el que el tamaño del corazón apenas se modifica pero sí aumenta en espesor de la pared VI. **C:** Corazón con hipertrofia excéntrica, con una dilatación evidente de la cavidad VI. (Imagen modificada de <http://95ofwhatyouteach.blogspot.com>).

La primera manifestación funcional que acontece con el remodelado hipertrófico es la disfunción diastólica, que se refleja en una elevación de la presión de llenado del VI. Se produce un depósito progresivo de colágeno tipo I en la matriz extracelular que produce un aumento de la rigidez de las paredes y a su vez una mala relajación. En el estrato subendocárdico, zona de mayor estrés biomecánico, se localizan las fibras miocárdicas longitudinales y es la zona más vulnerable a la sobrecarga de presión¹¹. En estadios finales, la fibrosis intersticial generalizada y la pérdida de cardiomiocitos, provocan una disfunción sistólica con afectación de la fracción de eyección¹².

El remodelado del miocardio debido a la sobrecarga de presión del VI produce hipertrofia del cardiomiocito, proliferación de los fibroblastos y secreción excesiva de proteínas de la matriz extracelular. La orquestación celular de estos fenómenos exige una comunicación entre cardiomiocitos adyacentes y con otras extirpes celulares que se produce por mecanismos autocrino, paracrino y a través de uniones gap y complejos de adhesión¹³.

A partir del periodo postnatal, los miocitos cardíacos son células terminales con un potencial proliferativo mínimo o nulo por lo que la única forma de adaptación a la sobrecarga hemodinámica que conservan las células cardíacas es mediante la hipertrofia. Así, en condiciones de estrés como la sobrecarga de presión, se ha observado que presentan distintos grados de poliploidía, habiéndose detectado hasta 8 núcleos en una misma célula. Por lo tanto, se considera que la poliploidía es una forma de respuesta frente al estrés biomecánico¹⁴.

1.2.1 ACTIVACIÓN NEUROHUMORAL EN EL REMODELADO CARDIACO

El componente principal de la pared del VI son los cardiomiocitos. Pero estos representan solo el 30% de las células del miocardio, aunque, dado su tamaño, son los principales contribuyentes a la masa cardiaca. El 70% restante está constituido por fibroblastos, células musculares lisas, células endoteliales, etc.

En el remodelado del VI inducido por sobrecarga de presión se produce hipertrofia del cardiomiocito, proliferación de fibroblastos y un depósito excesivo de proteínas estructurales pertenecientes a la MEC. Por lo tanto, la respuesta del corazón frente al estímulo patológico está condicionada, tanto por la coordinación entre las vías de señalización intercelular del cardiomiocito, como por la comunicación con otros cardiomiocitos y con otras estirpes celulares (fibroblastos, células inflamatorias, etc.) tanto dentro del corazón, como a nivel sistémico.

El cardiomiocito se diferencia de forma terminal poco después del nacimiento, siendo virtualmente incapaz de experimentar división celular posteriormente. Así pues, la única forma que tiene de adaptarse a una mayor demanda funcional es la hipertrofia. Los cardiomiocitos son células que presentan distintos grados de poliploidía ya desde el nacimiento del individuo. En condiciones de estrés, como la sobrecarga de presión, el número de núcleos por célula se multiplica, habiéndose observado hasta 8 núcleos en una misma célula. Este fenómeno no es exclusivo de los humanos, habiéndose observado también en diferentes especies de mamíferos. Dada la incapacidad de los cardiomiocitos para proliferar, se considera que la poliploidía es una forma de reaccionar frente al estrés metabólico o biomecánico. En estudios realizados en pacientes con estenosis aórtica sometidos a recambio valvular, el número de núcleos por cardiomiocito se correlaciona directamente con el índice de mortalidad, e inversamente con el remodelado inverso postoperatorio comentado más adelante.

La sarcómera constituye la unidad funcional del aparato contráctil del cardiomiocito, y se compone de diversas proteínas que podemos agrupar en: contráctiles (miosina, actina, tropomiosina, complejo de troponina) y citoesqueléticas (α -actinina, titina, etc.). Las proteínas contráctiles se estructuran formando filamentos gruesos (miosina) y finos (actina, tropomiosina y troponinas).

La miosina se considera el motor molecular de la contracción cardiaca. Está compuesta por seis subunidades variables: cuatro cadenas ligeras MLC (múltiples isoformas) y dos cadenas pesadas MHC; dos isoformas posibles α y β). La conformación espacial de la miosina y su actividad enzimática ATPasa (adenosintrifosfatasa) determinan la formación de puentes cruzados con los filamentos finos de actina y, consecuentemente, el rendimiento contráctil de la sarcómera. Las cadenas ligeras poseen sitios de fosforilación que permiten la regulación de la actividad ATPasa de la miosina pesada, mientras que en las cadenas pesadas existe un dominio con actividad ATPasa que libera la energía necesaria para promover la contracción, comportándose como transductor químico-mecánico. Esta actividad ATPasa es la que determina la principal diferencia de ambas isoformas de MHC, siendo la actividad de MHC α ("miosina rápida") hasta 3 veces mayor que la de MHC β ("miosina lenta"). En el corazón de humanos adultos, al igual que ocurre en otros mamíferos, hay una mayor

proporción de MHC β , mientras que en el caso de los roedores existe un mayor predominio de MHC α . La máxima velocidad de acortamiento del músculo cardiaco se correlaciona con la proporción MHC α /MHC β , aunque se desconoce el mecanismo del efecto beneficioso de la isoforma MHC α .

La sobrecarga de presión del VI, induce el aumento de la síntesis de varias proteínas del cardiomiocito, una de ellas es la MHC β . Al contrario, en la misma situación otras proteínas, como la MHC α se ven reguladas a la baja¹⁵. Este cambio en las proporciones de ambas proteínas se ha relacionado con una dilatación de la cámara del VI y un fallo de la contractilidad. Sin embargo, en la hipertrofia fisiológica inducida por el ejercicio aumenta la expresión de la MHC α , lo que provoca un aumento de la actividad ATPasa y una mejora de la contractilidad¹⁶. Estos datos dieron lugar a la hipótesis de que en el remodelado miocárdico patológico, la sustitución de MHC α por MHC β provocaría un enlentecimiento en la actividad ATPasa de la miosina y, consecuentemente, una tasa reducida de formación de puentes cruzados entre actina y miosina. El resultado final sería un deterioro de la contractilidad y de la capacidad del cardiomiocito para generar fuerza. En humanos con insuficiencia cardiaca la capacidad ATPasa miofibrilar está marcadamente reducida, a pesar de que la magnitud del cambio de isoformas en el miocardio del VI no es tan acusada como la que se ve en el ratón porque, aunque se produce una importante represión de la isoforma MHC α , ésta sólo constituye el 10% de la MHC total

En el deterioro funcional del corazón en la estenosis aórtica hay que destacar la muerte de los cardiomiocitos por la sobrecarga de presión¹⁷. Se ha propuesto, que los cardiomiocitos demasiado hipertrofiados y disfuncionantes podrían sufrir apoptosis. Varias moléculas (IGF-1, citoquinas, neuregulina etc.) estimulan la hipertrofia y, además, inhiben la apoptosis. Cuando éstos fallan, las células cardiacas mueren. Al contrario, TNF- α , la actividad simpática y la angiotensina-II se encuentran implicados en la apoptosis de los cardiomiocitos.

La matriz extracelular constituye la estructura supramolecular tridimensional que sirve como esqueleto para todas las células contenidas en el miocardio. Sin embargo, lejos de actuar como un simple andamio, cumple múltiples funciones que hacen posible un amplio abanico de procesos cardiacos. Al actuar como base de anclaje para los componentes celulares del miocardio y nexo de comunicación entre estos, la matriz extracelular integra en cada excitación el aporte de cada célula individual, permitiendo la contracción coordinada y conjunta del tejido a nivel macroscópico. La organización, composición y densidad de la matriz extracelular son dinámicas, no sólo en condiciones patológicas, sino en condiciones normales. La matriz extracelular contribuye en gran medida a las propiedades biomecánicas del tejido. Aparece físicamente anclada a la membrana basal aunque forma una unidad funcional diferente que, además de dar resistencia mecánica y soporte estructural al miocardio, provee a este del compartimento extracelular a través del cual se distribuyen señales y nutrientes y migran los fibroblastos. En el corazón, sus componentes principales son los colágenos de los tipos I, III, VI y XII, los proteoglicanos y las proteínas matricelulares que aparecen asociadas a los componentes anteriores.

En la estenosis aórtica se produce el depósito exagerado de colágeno de tipo III, inicialmente, y de tipo I a medida que el proceso progresa. Además, la acumulación de

fibras de colágeno tipo I incrementa la rigidez de la pared ventricular, lo que puede comprometer su distensibilidad y facilitar la aparición de disfunción diastólica¹⁸

El remodelado lento y moderado de la matriz extracelular es característico del tejido cardiaco sano, donde la síntesis y la degradación de las proteínas de la matriz extracelular se encuentran en equilibrio dinámico. El mantenimiento adecuado del equilibrio en la matriz extracelular está sujeto a la acción de varios grupos de enzimas proteolíticas que participan en la degradación de los diferentes componentes. Entre estas enzimas se encuentran las ADAM (*A disintegrin and metalloprotease domain-containing protein*), las proteasas séricas (plasmina, elastasa derivada de neutrófilos, catepsina G, etc.), las cisteín-proteasas (catepsinas B, L y S), aspartil-proteasas (catepsina D) y las MMPs (*matrix metalloproteinases*).

Las MMPs resultan especialmente relevantes para el remodelado de la matriz extracelular cardiaca en condiciones normales y patológicas. En conjunto, las MMPs pueden degradar la práctica totalidad de proteínas presentes en la matriz extracelular y la relación de sustratos identificados permanece en constante aumento. Debido a la eficacia de estas enzimas degradando sus sustratos, el establecimiento de un estricto control de su actividad resulta fundamental¹⁹. Las TIMPs (*tissue inhibitors of MMPs*) son proteínas de bajo peso molecular que se unen ávidamente a MMPs inhibiendo su actividad. La alteración del balance entre MMPs y TIMPs podría contribuir a la dilatación del VI, así como a la transición de la disfunción diastólica a disfunción sistólica e insuficiencia cardiaca en las fases avanzadas de la hipertrofia por sobrecarga de presión²⁰.

En el remodelado cardiaco fisiológico, existe un equilibrio dinámico entre la síntesis y la degradación de los componentes de la matriz extracelular que produce el remodelado lento de la misma. Se debe a la acción de varias enzimas proteolíticas como son las ADAM, catepsinas B, L y S y las metaloproteinasas de la matriz (MMPs). Las MMPs son especialmente importantes en cuanto al remodelado de la matriz en condiciones patológicas. Pueden degradar casi la totalidad de las proteínas presentes en la matriz extracelular, por lo tanto, es fundamental un estricto control de su funcionamiento¹⁹. Los inhibidores tisulares de las metaloproteinasas de la matriz (TIMPs) se unen ávidamente a las MMPs inhibiendo su actividad. Si se altera el equilibrio entre las MMPs y los TIMPs el ciclo de recambio de las proteínas de la matriz extracelular se ve afectado y ello puede contribuir a la disfunción diastólica, disfunción sistólica y, en fases avanzadas, insuficiencia cardiaca²⁰.

Los fibroblastos son las células más abundantes del miocardio, responsables de la síntesis y la composición de la MEC. Al contrario que los cardiomiocitos, los fibroblastos tienen capacidad proliferativa y ante situaciones de sobrecarga de presión en el VI se multiplican, aumentando la capacidad de síntesis de MEC. En condiciones patológicas, como la hipertrofia por sobrecarga de presión, también aparece en escena un tipo celular denominado miofibroblasto, caracterizado por la síntesis de matriz extracelular en grandes cantidades, además de contener haces de filamentos de actina semejantes a los de una célula muscular lisa, lo que le proporciona una gran movilidad. Su origen es múltiple: diferenciación de los fibroblastos residentes, bajo el estímulo de factores neurohumorales; diferenciación a partir de células hematopoyéticas

circulantes derivadas de la médula ósea; y por el fenómeno denominado transición epitelio-mesenquimal²¹. En condiciones normales, los miofibroblastos se activan durante los procesos reparativos y desaparecen por apoptosis cuando su función deja de ser necesaria. En condiciones de fibrosis patológica, la persistencia de los miofibroblastos tiene como resultado el remodelado de la MEC. La aparición de miofibroblastos es un fenómeno precoz en la miocardiopatía por sobrecarga de presión y está regulada por múltiples factores como el sistema renina-angiotensina-aldosterona, el TGFβ, la endotelina-1, etc²².

El estrés biomecánico provocado por la sobrecarga de presión promueve el remodelado miocárdico, participando numerosos factores humorales. La liberación de factores humorales como la angiotensina II, la endotelina-1, los factores de crecimiento de tejido conectivo y de fibroblastos y los TGFβs, que actúan sobre los propios cardiomiocitos y fibroblastos, de manera autocrina, o sobre otras células próximas, de manera paracrina. La liberación de estos mediadores, modulada de manera conveniente por diversos factores intracardiacos y extracardiacos, da lugar a cambios en la transcripción de numerosos genes. La respuesta final de las células miocárdicas al estrés biomecánico conduce a la hipertrofia de los cardiomiocitos y al remodelado de la matriz extracelular²³.

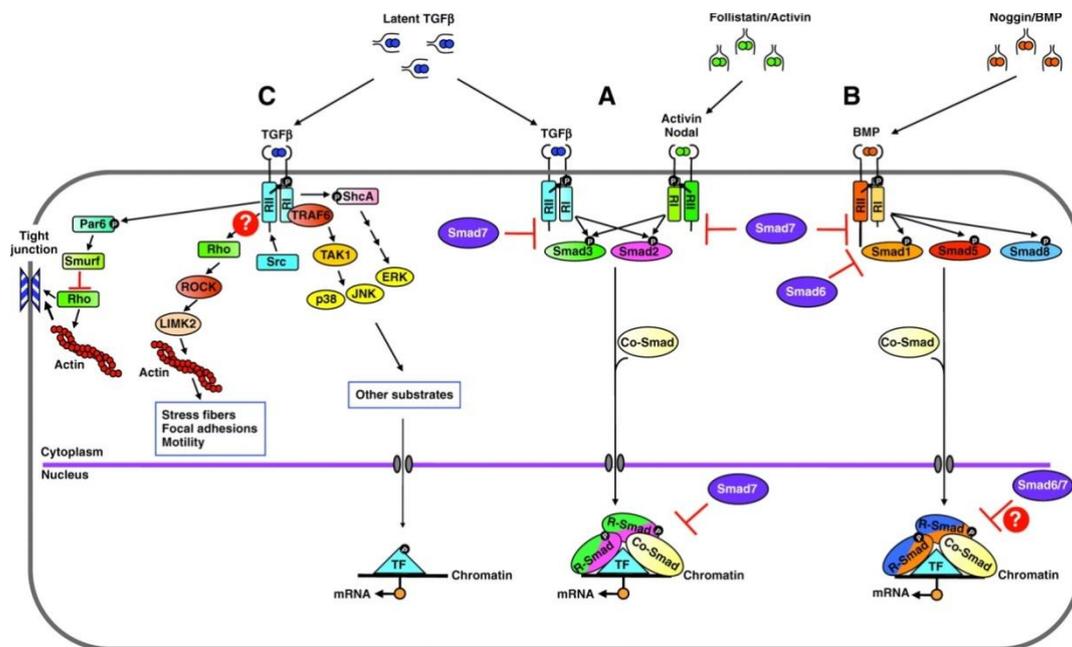


Figura 2: Vías de señalización canónicas y alternativas de las citocinas de la superfamilia de TGFβ.

1.3 EL REMODELADO INVERSO

Aunque no sea objeto de este trabajo, hay que mencionar las características más importantes de los mecanismos involucrados en la reversión de la hipertrofia del VI; es decir en el remodelado inverso del miocardio.

En los pacientes con EA, las alteraciones tanto morfológicas como funcionales y estructurales que ocurren durante la sobrecarga de presión tienden a regresar cuando cede el insulto, generalmente tras la sustitución quirúrgica de la válvula aórtica por vía abierta o a través de catéter²⁴. Después de la cirugía, se pone en marcha un proceso de reordenación del miocardio para adaptarse a la nueva situación, sin sobrecarga de presión. Durante este proceso, se produce la regresión de algunas de las alteraciones patológicas comentadas con anterioridad. El remodelado inverso del miocardio es un proceso complejo y con numerosas cuestiones aún sin resolver. Se trata de cambios estructurales y funcionales que en algunos pacientes no llega a completarse nunca²⁵.

Numerosos estudios afirman que, a pesar de que la regresión de la hipertrofia comienza inmediatamente tras la cirugía de sustitución valvular²⁶, la mayor parte de la reducción tarda alrededor de un año y el proceso continua durante varios años²⁷. El tiempo de evolución de la EA y su severidad se relacionan inversamente con la compleción del remodelado inverso y con la reversibilidad de los daños estructurales del VI. Se ha demostrado que tras la cirugía, la probabilidad de recuperar la normalidad de la masa ventricular es baja si el remodelado preoperatorio era muy exuberante²⁸. Eso no quiere decir que los pacientes con un alto nivel de remodelado pierdan poca masa después de la cirugía, de hecho estos pacientes son los que más masa pierden; si bien las probabilidades de alcanzar la normalización completa de la masa del VI son menores²⁹. La persistencia de la hipertrofia tras la cirugía es un factor pronóstico de la supervivencia, de forma que a menor regresión postoperatoria de la hipertrofia menor es la supervivencia, y viceversa, un alto grado de regresión de la hipertrofia tras la cirugía se relaciona con una supervivencia más larga.

En un estudio con sujetos sanos a los que se les asignó encamamiento durante 12 semanas, se observó que la masa ventricular izquierda disminuía un 15%⁶⁴. En otro estudio, se pudo concluir que los pacientes con daño medular e incapaces de realizar ningún tipo de actividad física, la masa ventricular disminuía en este caso un 25%⁶⁵.

1.4 MODELOS ANIMALES PARA EL ESTUDIO DEL REMODELADO MIOCÁRDICO SECUNDARIO A SOBRECARGA DE PRESIÓN Y SU REGRESIÓN

Los modelos animales son una herramienta indispensable para estudiar la etiopatogenia de las enfermedades y desarrollar estrategias terapéuticas dirigidas. Nos permiten practicar experimentos que por motivos éticos serían impensables en humanos, incluida la manipulación genética, y, además, existe la disponibilidad de un número ilimitado de ellos genéticamente similares.

El modelo experimental más popular para el estudio del remodelado por sobrecarga de presión es la coartación quirúrgica del arco aórtico medio en ratones. Esta operación genera un gradiente de presión transcoartacional que incrementa el esfuerzo realizado por el VI para la eyección de sangre hacia la aorta. En estas condiciones, el VI desarrolla rápidamente una hipertrofia de tipo concéntrica sin dilatación cavitaria y con engrosamiento mural, que se acompaña de disfunción inicialmente diastólica. Si esta situación se mantiene durante un tiempo prolongado, acabará produciéndose insuficiencia cardiaca con deterioro progresivo de la función sistólica y evolución hacia la hipertrofia excéntrica con dilatación de la cámara. En general, a partir de las cuatro semanas de CAT comienza a evidenciarse deterioro de la función sistólica del VI y a observarse mortalidad de los animales, que progresan en las semanas siguientes hasta llegar a la insuficiencia cardiaca congestiva franca en torno a 8-10 semanas tras la constricción. Este modelo es de gran utilidad para estudiar los diferentes fenómenos biológicos que subyacen al remodelado VI y a la transición de la hipertrofia VI a la insuficiencia cardíaca.

Durante mucho tiempo se consideró la hipertrofia miocárdica un fenómeno reactivo a la sobrecarga del VI dirigido teleonómicamente a normalizar el estrés parietal y prevenir el desarrollo del fallo de bomba. Sin embargo, estudios epidemiológicos como el de Framingham demostraron que la hipertrofia miocárdica se asocia con un incremento de la mortalidad de origen cardiaco. Este hallazgo desencadenó la controversia con respecto a la naturaleza adaptativa o maladaptativa de la hipertrofia. Espósito y cols. (2002)³⁰ abordaron esta cuestión estudiando los efectos de la sobrecarga de presión prolongada en dos modelos de ratones modificados genéticamente, cuya respuesta hipertrofiante estaba significativamente atenuada. En los animales silvestres, la hipertrofia normalizaba el estrés parietal tras la CAT, pero ello no evitaba la descompensación cardiaca y los animales desarrollaban un progresivo deterioro funcional y dilatación de la cámara VI. Por el contrario, los ratones modificados genéticamente, que mostraban una hipertrofia VI atenuada, mantenían su función prácticamente inalterada a pesar de que el estrés parietal permanecía elevado. Este estudio puso claramente de manifiesto que la hipertrofia cardiaca, y no el estrés parietal, es maladaptativa y responsable por sí misma de la descompensación cardiaca.

También se han desarrollado modelos que reproducen el proceso de regresión del remodelado tras la liberación del estrés hemodinámico, tal y como sucede en la clínica de la estenosis aórtica tras el recambio valvular aórtico. Estos modelos se basan en la coartación quirúrgica de la aorta durante periodos variables, seguida de la retirada de la ligadura y subsiguiente seguimiento de los animales.

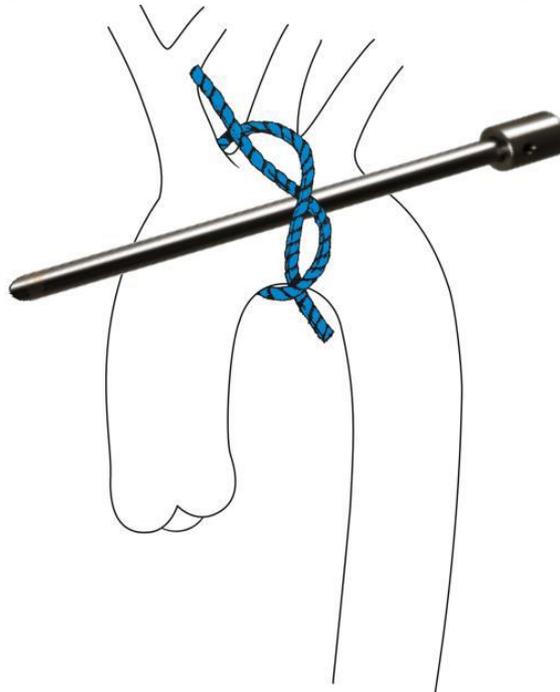
En el 2005 se describió una técnica para liberar la aorta de la constricción (de-CAT)³¹ transcurrido el tiempo de sobrecarga de presión deseado. Los ratones sujetos a estos procedimientos se siguen con ecocardiografía para analizar el curso temporal de la recuperación morfo-funcional y, tras el sacrificio del animal, la reversión de los cambios estructurales y sus mecanismos moleculares. Utilizando este modelo, se evidenció que la duración de la sobrecarga de presión es un factor determinante del grado de regresión del remodelado que se produce tras la eliminación de la sobrecarga. Después de la retirada de la constricción, hay una primera fase en la que se produce una disminución considerable de la masa miocárdica.

La técnica original para la constricción del arco aórtico descrita por Rockman³² consiste en la colocación de un cerclaje con sutura quirúrgica en el segmento medio del arco aórtico transverso (CAT), entre los orígenes del tronco arterial braquiocefálico y la arteria carótida primitiva izquierda. Se han desarrollado variantes alternativas de este modelo en función de la ubicación de la estenosis en sitios diferentes de la aorta, como la aorta ascendente o la aorta abdominal suprarrenal. A pesar de las ventajas aducidas por los defensores de estas variantes, la modalidad de CAT original sigue siendo la preferida por la mayoría de grupos. La pertinencia de este modelo para la reproducción de la hipertrofia por sobrecarga de presión en pacientes con estenosis aórtica ha sido determinada mediante estudios anatomopatológicos y por técnicas de imagen, tanto de ecocardiografía, como de resonancia nuclear magnética.

En la descripción original de Rockman la aproximación a la aorta se realiza a través de una toracotomía anterolateral izquierda lo que exige la intubación del animal y el uso de ventilación mecánica. Estas maniobras implican una curva de aprendizaje y llevan aparejada cierta tasa de morbimortalidad. Además, este modelo tiene dos problemas adicionales derivados ambos de la propia maniobra de colocación del cerclaje en el arco aórtico: una mortalidad quirúrgica adicional elevada y la reproducibilidad del grado de estenosis entre ratones.

Para estandarizar el grado de estenosis, Rockman propuso constreñir la aorta colocando una aguja de calibre 27G (diámetro externo: 0.41 mm) paralelamente al arco aórtico.

Figura 3: Representación esquemática de la técnica de CAT de Rockman. La constricción del arco aórtico se realiza anudando una ligadura que rodea la aorta junto con una cánula de calibre 27G (0,41 mm de diámetro externo) que se retira inmediatamente después de fijar el nudo.



Acto seguido, se procede a rodear a ambos con seda quirúrgica y a anudarla, tras lo cual se retira rápidamente la aguja. De esta forma, la sección luminal residual de la aorta en el punto de la estenosis debería tener un área igual a la sección de la aguja utilizada. La ejecución de la ligadura sobre la cánula conlleva un traumatismo local importante sobre la pared aórtica por un mecanismo triple: tracción y desplazamiento ventral, efecto cizallante sobre la cánula y sobrepresión del cabo aórtico proximal. A pesar de que el flujo de la aorta permanece completamente interrumpido durante un tiempo limitado, la rotura de la arteria por el brusco incremento de la presión es frecuente y ocasiona invariablemente la muerte del animal. Además, al tener que proceder a realizar el anudado con la máxima rapidez, para evitar el problema anterior, la tensión del nudo es poco reproducible, lo que provoca variaciones aleatorias del grado de estenosis. Todas estas limitaciones han supuesto un estímulo para el desarrollo de innovaciones técnicas del método experimental que permitan mejorar la eficiencia del modelo y la reproducibilidad de la estenosis producida.

En ratones a los que se les practica la CAT, la hipertrofia VI normaliza el estrés parietal, pero se produce un deterioro progresivo funcional y descompensación cardíaca con dilatación del VI. Sin embargo, en experimentos paralelos con ratones genéticamente modificados que desarrollan una hipertrofia atenuada, se mantiene la función sistólica VI prácticamente inalterada, a pesar de que el estrés parietal permanece elevado. Estos estudios muestran que en la sobrecarga de presión la hipertrofia del VI, a diferencia del estrés parietal, es maladaptativa y responsable de la descompensación cardíaca.

Para analizar el fenómeno del remodelado inverso, también se han desarrollado modelos que lo reproducen tras la liberación de la constricción aórtica. Se realiza en primer lugar una coartación quirúrgica de la aorta que se mantiene durante periodos variables tras lo cual se retira la ligadura y se sigue a los animales. Los ratones que han sido sometidos a este procedimiento son seguidos mediante ecocardiografía para analizar el curso temporal de la recuperación morfo-funcional y, tras sacrificar al animal se observan los cambios en la regresión a nivel tanto estructural como molecular y celular. Durante el remodelado inverso los cardiomiocitos sufren una importante reducción de diámetro y de volumen, mientras que el tejido fibroso disminuye de forma más lenta, de modo que en la primera fase encontramos un aumento de proporción de tejido fibroso con respecto al muscular³¹.

2. OBJETIVOS

3. MATERIAL Y MÉTODOS

2. OBJETIVOS

El presente trabajo se centra en el entrenamiento acerca de la valoración de la hipertrofia ventricular izquierda por sobrecarga de presión y de su regresión (tanto a nivel clínico como experimental en ratones) desde el punto de vista ecocardiográfico. El estudio se ha realizado en ratones y para llevarlo a cabo se ha realizado una constricción del arco aórtico transverso mediante la técnica de “doble vuelta +clip” desarrollada por el Dr. Nistal (modificada del modelo clásico de Rockman).

Para el aprendizaje de dicha valoración he acudido durante el curso 2015-2016 al laboratorio de ecocardiografía del Servicio de Cardiología del Hospital Universitario Marqués de Valdecilla y al laboratorio de Farmacología de la Universidad de Cantabria para adquirir destreza en la ecocardiografía murina, utilizando un equipo de ultrasonografía de alta resolución VisualSonics Vevo-770.

Para familiarizarme con el protocolo de obtención de muestras de pacientes para su posterior estudio en el laboratorio, he acudido a una cirugía de sustitución valvular de una estenosis aórtica realizada también por el Dr. Nistal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

La cepa de ratones en la que se realizó este estudio es la C57/BL6. Se trata de animales criados en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria. Todas las manipulaciones realizadas en los animales fueron aprobadas por el Comité de Ética para el Cuidado y Uso de Animales de Experimentación de la Universidad de Cantabria y se llevaron a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y las Directivas del Consejo de la Comunidad Europea (86/699/CEE) y del Real Decreto 1201/2005.

Todos los experimentos fueron llevados a cabo en hembras con una edad comprendida entre los 3 y los 5 meses. Los animales fueron mantenidos en el Servicio de Estabulación y Experimentación Animal de la Universidad de Cantabria, en grupos de 4 o 5 animales por jaula en el preoperatorio y estabulación individual tras la cirugía, sometidos a un ciclo de luz/oscuridad de 12 h, temperatura ambiente de 22 ± 1 °C y humedad relativa del 60-70 %.

3.2 CONSTRICCIÓN DEL ARCO AÓRTICO TRANSVERSO MEDIANTE LA TÉCNICA DE “DOBLE VUELTA + CLIP”

Con anterioridad a la intervención quirúrgica se procede a cuantificar el diámetro luminal del arco aórtico transversal en el sitio previsto para la constricción, mediante estudio ecocardiográfico. Se utiliza esta medida, junto con el espesor de la pared aórtica y el espesor de los microclips utilizados para calcular la distancia entre los dos nudos que debemos realizar en la sutura con la que haremos la constricción. La separación entre los nudos se determina mediante un algoritmo que incorpora la información de los parámetros mencionados. La separación entre nudos condiciona el grado de constricción, por lo que debe controlarse de forma muy precisa. Para la realización de la constricción aórtica (CAT) se utiliza una sutura monofilamento de polipropileno 7/0. Antes de la intervención quirúrgica realizamos los nudos en la sutura del CAT bajo estricto control, para lo que empleamos magnificación con estéreo microscopio y una regla especial de alta precisión.

Los animales del estudio se anestesian mediante maniobras no invasivas, empleándose la vía inhalatoria. De esta forma, se evita la ventilación mecánica y las comorbilidades asociadas a la misma. A la hora de la cirugía, se aborda el mediastino superior mediante esternotomía del manubrio, por vía extrapleural y con ventilación espontánea. Se realiza una primera incisión cutánea transversal a nivel del ángulo de Louis, seguida de una esternotomía limitada al manubrio. Con ayuda de dos suturas se procede a separar las dos mitades del manubrio esternal, traccionando en sentido bilateral, ventral y caudal. Tras disecar cuidadosamente la grasa mediastínica y restos tímicos se obtiene una visión adecuada del arco aórtico. La aorta se rodea, entre los orígenes del tronco arterial innominado y la carótida izquierda, con un disector atraumático que permite circundar la arteria y enhebrar la sutura del CAT para pasarla

alrededor de la arteria, maniobra que repetimos dos veces. Posteriormente se tracciona suavemente de ambos extremos de la sutura hasta emparejar los dos nudos, colocando justo por debajo de ellos un microclip vascular. Una vez cerrado el clip que cierra el asa de la constricción se cortan los cabos de la sutura. Para facilitar los estudios ecocardiográficos postoperatorios se procede a rotar la sutura sobre la arteria, hasta dejar el clip dorsal y craneal al arco aórtico. Finalmente se vuelven a suturar los dos fragmentos del manubrio esternal y los bordes cutáneos se enfrentan y se pegan con adhesivo de cianocrilato.

Mediante esta técnica se han introducido varias modificaciones con respecto al modelo de Rockman. En primer lugar, se ha realizado un cambio de paradigma y, en lugar de tratar de conseguir una luz vascular restrictiva del arco aórtico idéntica para todos los animales, se ha propuesto generar una estenosis geoméricamente equivalente en todos ellos, teniendo en cuenta su anatomía vascular individual. Además, al contrario de lo propuesto por Rockman, el control de la constricción se realizó a partir del perímetro asignado a la zona estenosada y no de su diámetro, lo que reduce los errores en el área luminal restrictiva finalmente obtenida.

Por otra parte, la utilización de una doble vuelta en la sutura de la constricción proporciona tres ventajas: 1) contribuye a una reducción adicional de las diferencias entre el área restrictiva planeada y la obtenida; 2) previene el fenómeno de migración intravascular de la sutura, frecuente en el modelo de Rockman y que penaliza los resultados experimentales; y 3) facilita la reoperación para la retirada de la sutura de constricción cuando se quiere estudiar la regresión de la hipertrofia.

La longitud de la sutura para la constricción se preasigna para cada animal en función del grado de estenosis deseado y del diámetro luminal del arco aórtico, calibrado en el ecocardiograma preoperatorio, y se ajusta mediante dos nudos en la sutura que mantienen una distancia calculada con un algoritmo específico que incorpora las variables mencionadas.

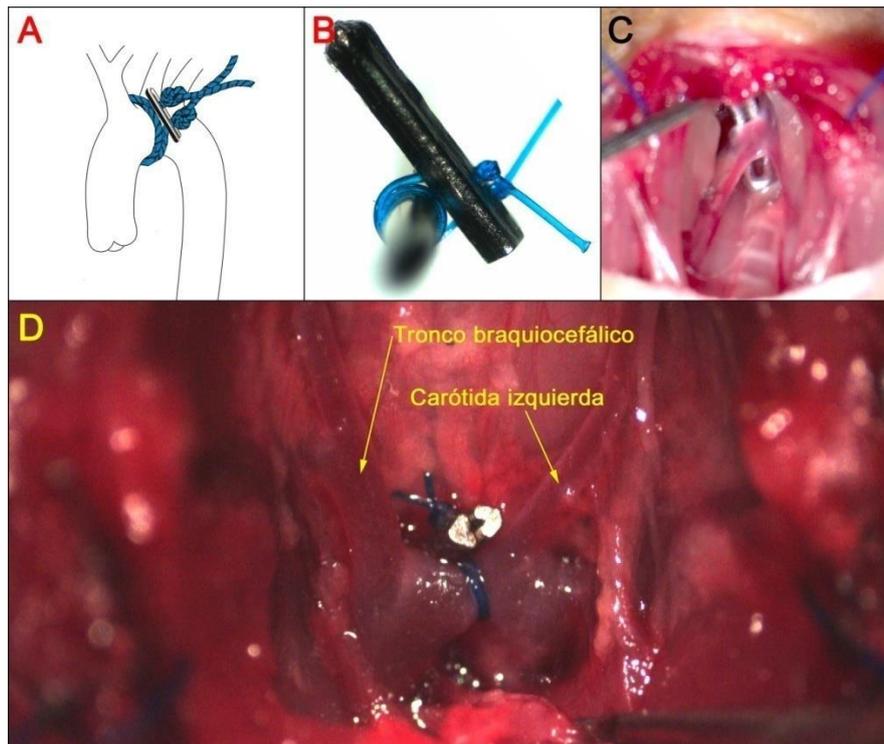


Figura 4. Imágenes de la técnica de constricción con doble vuelta y clip. **A:** Esquema de la constricción con la técnica doble vuelta con clip; **B:** Fotografía de la doble vuelta de sutura y clip montado sobre una aguja; **C:** Foto del disector rodeando el arco aórtico; **D:** Fotografía de la constricción con doble vuelta de sutura con clip in vivo.

3.3 CIRUGÍA DE RETIRADA DE LA CONSTRICCIÓN AÓRTICA

Para la cirugía de de-CAT, se procede a la apertura del mediastino utilizando el mismo abordaje quirúrgico. Una vez expuesto el cerclaje, se secciona la sutura por debajo del clip y se retira la constricción.

3.4 ESTUDIOS ECOCARDIOGRÁFICOS

A todos los ratones incluidos en el presente trabajo, se les realizó un estudio ecocardiográfico basal, que se repitió semanalmente después de la cirugía de CAT hasta completar el seguimiento asignado. Para ello se utilizó un sistema no invasivo de imagen ultrasónica de alta resolución VisualSonics Vevo-770 (FujifilmVisualSonics, Toronto, Ontario, Canadá), equipado con transductores de 30 MHz (rango 15-45 MHz) de alta resolución (30 μ m) y software de análisis específico. Las elevadas resoluciones espacial y temporal de este equipo, imprescindibles para el estudio de animales con corazones de escasos milímetros y frecuencias cardíacas fisiológicas en torno a 600 lat/min, llevan aparejada la necesidad de fijar tanto al animal como el transductor y utilizar sistemas de micromanipulación. Los parámetros registrados con este equipo

sirvieron para monitorizar los cambios evolutivos morfológicos y funcionales del corazón.

Para los estudios ecocardiográficos los animales permanecieron sedados con isofluorano (Forane, Abbot®) inhalado vaporizado al 2,5% en oxígeno. Se coloca al animal en decúbito supino sobre una plataforma equipada con: un sistema calefactor que mantiene la temperatura corporal en un rango de 36-38°C, y un sistema de sensores que permite monitorizar el electrocardiograma y las frecuencias tanto cardíaca como respiratoria. Durante las exploraciones, la vasodilatación producida por la sedación, junto con el uso abundante de gel ultrasónico y la evaporación asociada al mismo, aumentan mucho las pérdidas de calor e inducen con facilidad hipotermia en animales que, por su reducida masa, cuentan con una mínima inercia térmica. La hipotermia se acompaña de alteraciones significativas en la fisiología cardíaca con depresión cronotrópica e inotrópica que invalida los resultados de la exploración. Por este motivo, se controló en tiempo real la temperatura corporal mediante una sonda térmica por vía rectal y se calentó al animal mediante una lámpara de rayos infrarrojos y utilizando gel de ultrasonografía templado con el fin de no contribuir a enfriar al animal. Con estas medidas se consiguió cumplir el requisito de frecuencia cardíaca mínima para los estudios de 400 latidos/min.

En los estudios ecocardiográficos se utilizaron las siguientes proyecciones y se realizaron las siguientes mediciones:

3.4.1 PROYECCIÓN PARAESTERNAL DEL EJE LARGO

En la mayoría de los casos, un eje imaginario alineado de forma paralela al eje largo del ventrículo izquierdo no es exactamente paralelo al tracto de salida del ventrículo izquierdo y a la raíz aórtica. Se necesita una ligera rotación en el sentido de las agujas del reloj, para que el eje largo del ventrículo izquierdo continúe con el de la aorta.

Una ventaja importante de la vista paraesternal del eje largo es que numerosas estructuras de interés se orientan en forma perpendicular al haz ultrasónico, lo que mejora su definición por aumento de la resolución. Al mover el transductor hacia el espacio intercostal inferior, se puede incluir la punta del ventrículo izquierdo en el campo y registrar el plano del eje largo apical.

Figura 5: vista paraesternal del eje largo de una ecocardiografía transesofágica en el que se pueden observar la aurícula izquierda (LA), ventrículo izquierdo (LV), la raíz aórtica (Ao) y el ventrículo derecho (RV).



La ventaja, por lo tanto, de esta vista es la posibilidad de incluir la punta cardiaca.

La mayor desventaja es que las principales estructuras, en particular las paredes del ventrículo izquierdo, ahora quedan paralelas al haz del transductor; por lo tanto, se reduce la definición del endocardio y dificulta el análisis de la motilidad parietal.

Si se inicia el estudio desde la vista del eje largo paraesternal, modificar el ángulo del plano de obtención de imágenes ofrece una oportunidad para examinar la aurícula derecha y el ventrículo derecho. A medida que el plano corre bajo el esternón, se registra el segmento posterior del tabique interventricular, tanto como el músculo papilar posteromedial y aún el tracto de salida del ventrículo derecho. Debido a que este tracto no es paralelo al tracto de entrada del ventrículo izquierdo, por lo general, se requiere una leve rotación del transductor en dirección horaria. Este registro permite visualizar la porción inferior de la aurícula derecha, y en ocasiones, la vena cava inferior. Mediante una rotación mayor del transductor se obtiene un plano que muestra el tracto de salida del ventrículo derecho, la válvula pulmonar y el tronco de la arteria pulmonar.

La evaluación con Doppler de la vista del eje largo paraesternal es útil para registrar el flujo sanguíneo que atraviesa las válvulas mitral y aórtica. Dado que el flujo de la sangre no es paralelo al haz ultrasónico, no suele ser posible cuantificar las velocidades de los flujos. Sin embargo, el estudio Doppler color desde esta vista se utiliza en forma rutinaria para detectar insuficiencia aórtica y mitral.

Para conseguir esta proyección en el ratón hay que colocar la sonda paralela al eje largo cardiaco, teniendo en cuenta que presenta una oblicuidad cráneo-caudal, derecha-izquierda y dorso-ventral. Esta proyección nos sirve para llevar a cabo una valoración morfológica del VI, de la válvula aórtica y de la raíz aórtica, y facilitar la obtención de la proyección del eje corto del corazón, para lo cual es importante que en la imagen veamos el corazón completamente horizontal.

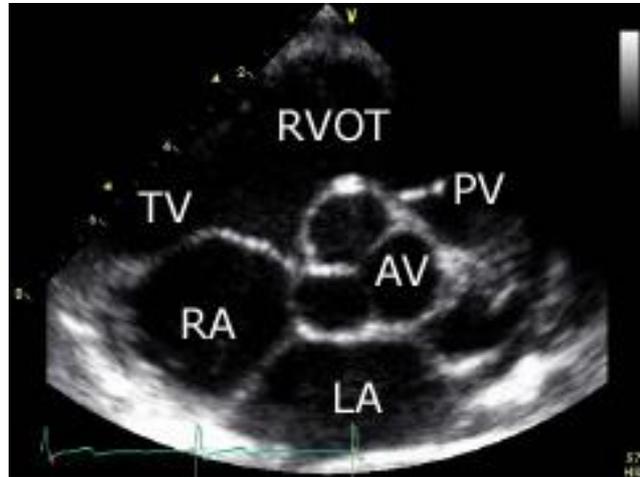
3.4.2 PROYECCIÓN PARAESTERNAL DEL EJE CORTO

Si se coloca al transductor en la posición paraesternal del eje largo y se rota aproximadamente 90 grados en dirección horaria, se mueve el plano de imágenes y se obtiene la vista paraesternal del eje corto. Al rotar el transductor en el sentido de las agujas del reloj, la pared lateral del ventrículo izquierdo se ubica a la derecha del observador y la pared medial a su izquierda. Aunque, en teoría, entre la base y la punta del corazón existe un número infinito de planos en el eje corto, en la práctica se registran tres o cuatro vistas representativas desde esta posición del transductor.

Un punto de referencia útil para comenzar el examen del eje corto es el borde libre de la valva anterior mitral. Mediante una ligera rotación del transductor y el ajuste del ángulo de inclinación, se puede hacer que el ventrículo izquierdo parezca circular y mostrar la máxima excursión en ambas valvas de la válvula mitral. Como en todas las vistas del eje corto, el ventrículo izquierdo se muestra como si se lo viera desde la punta de la cámara. Cuando se registra de manera apropiada, la vista del eje corto en

este plano corresponde en forma aproximada a la porción media del ventrículo izquierdo y permite el registro óptimo de la excursión de la válvula mitral, de la motilidad de la porción medial de la pared del ventrículo izquierdo y la visualización de una parte de la pared del ventrículo derecho.

Figura 6: Vista del eje corto basal. AV, válvula aórtica; PV, válvula pulmonar; LA, aurícula derecha; RA, aurícula izquierda; TV, válvula tricúspide; RVOT, tracto de salida del ventrículo derecho.

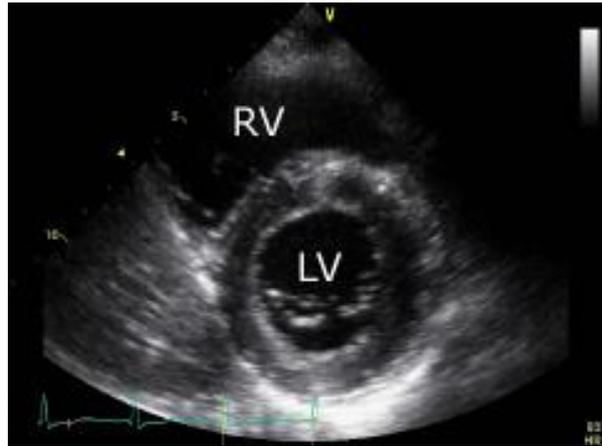


Se puede apreciar la curvatura normal del tabique interventricular y se puede evaluar cualquier alteración de la posición, de la forma o de la motilidad del tabique. El movimiento angular desde la base a la punta es útil para registrar el orificio de la válvula mitral y su inserción en los músculos papilares anterolateral y posteromedial.

Si se mueve hacia un plano más basal, la vista del eje corto se aproxima al nivel del anillo aórtico y permite la visualización simultánea de numerosas estructuras: la válvula aórtica, los ostia coronarios, la aurícula izquierda, el tabique interauricular, la aurícula derecha, la válvula tricúspide, el tracto de salida del ventrículo derecho, la válvula pulmonar y la arteria pulmonar proximal. Con una alineación adecuada, se pueden observar a las tres cúspides de la válvula aórtica abrirse y cerrarse en sístole y diástole. El ostium de la arteria coronaria derecha y de la izquierda se pueden observar en una localización inmediatamente craneal al anillo. Si se observa el anillo como si fuera un reloj, el tronco de la arteria coronaria izquierda se origina aproximadamente en la hora 4 y la coronaria derecha en la hora 11. Con una leve inclinación superior, se puede seguir la arteria pulmonar hasta su bifurcación e identificar sus ramas derecha e izquierda.

Al mover el transductor a un espacio intercostal inferior e inclinar en plano en dirección más apical, la imagen será un barrido que atraviesa en nivel de los músculos papilares y luego la punta del ventrículo izquierdo. Esta serie de vistas es ideal para evaluar el patrón contráctil del ventrículo izquierdo a nivel apical y medioventricular. Cuando se registran estas vistas, se necesitan ajustes para mantener la apariencia casi circular de la cavidad del ventrículo izquierdo a medida que el tamaño de la cavidad ventricular disminuye hacia la punta.

Figura 7: Vista del eje corto a nivel de la válvula mitral. LV, ventrículo izquierdo; RV, ventrículo derecho.



La evaluación Doppler de las diferentes vistas del eje corto paraesternal es útil para diferentes propósitos. En la base del corazón, el plano de las imágenes se puede ajustar de manera tal que el flujo sanguíneo se oriente casi paralelo al haz ultrasónico a través tanto de la válvula tricúspide como de la válvula pulmonar. Desde esta posición se puede registrar tanto el flujo de entrada tricuspídeo como la insuficiencia tricuspídea. En cambio, el flujo aórtico es casi perpendicular al plano de las imágenes; por lo tanto, la evaluación cuantitativa del flujo aórtico con Doppler no es posible. Sin embargo, las imágenes justo por debajo de la válvula aórtica permiten visualizarla regurgitación aórtica que emerge desde el orificio insuficiente y valorar el área de regurgitación. El análisis mediante Doppler color del flujo a través de la válvula mitral, permite evaluar la regurgitación mitral. Esto puede ser de especial interés para localizar el origen de la insuficiencia mitral.

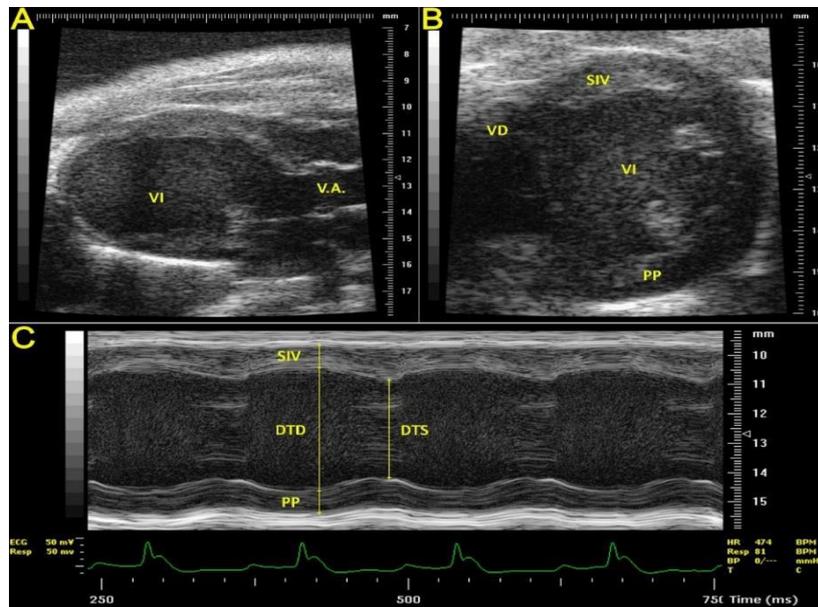


Figura 8: Registros ecocardiográficos en ratón realizados en las proyecciones paraesternales del eje largo y del eje corto cardíacos. **A:** Imagen bidimensional en la proyección paraesternal del eje largo, se observa la cavidad VI, la válvula aórtica (V.A.), los senos de Valsalva, la unión sinotubular y el segmento tubular inicial de la aorta ascendente; **B:** Imagen bidimensional en la proyección paraesternal del eje corto, se observa la cavidad del VI, la pared anterior o septo interventricular (SIV), la pared posterior (PP) y los músculos papilares; **C:** Registro en modo M paraesternal eje corto, guiado por bidimensional, en la línea de diámetro cavitario máximo para la medición de espesores parietales (SIV y PP) y diámetros sistólico (DTS) y diastólico (DTD).

3.4.3 PROYECCIÓN DE CUATRO CÁMARAS

Una vez se localiza la ventana apical, se coloca el transductor en dirección a la escápula derecha y luego se rota hasta que las cuatro cámaras cardíacas se visualicen de forma óptima. Esto sucede cuando se registra la excursión completa tanto de la válvula mitral como de la tricúspide y la “verdadera” punta del ventrículo izquierdo se encuentra en el campo cercano. La punta verdadera normal se puede identificar por sus paredes relativamente delgadas y falta de movilidad. Una posición del transductor incorrecta generará acortamiento del ventrículo izquierdo y no se visualizará la punta verdadera. Cuando se ajusta en forma apropiada, esta imagen incluye las cuatro cámaras cardíacas, ambas válvulas aurículoventriculares y los tabiques interventricular e interauricular. Al examinar la cruz del corazón se debe notar que la inserción de la valva septal de la válvula tricúspide es varios milímetros más apical que la inserción de la valva mitral. En una vista de cuatro cámaras orientada en forma apropiada, la valva mitral anterior se dispone en posición medial y la valva posterior, que es más pequeña se observa como si surgiera del margen lateral del anillo aurículoventricular. En el lado derecho, la valva septal de la válvula tricúspide se inserta en la región medial y la valva anterior, más grande, surge desde la cara lateral. Confirmar esta relación es útil para definir la orientación de la imagen y es fundamental para el diagnóstico de diversas patologías congénitas.



Figura 9: Una vista apical de cuatro cámaras. LA, aurícula izquierda; LV, ventrículo izquierdo; RA, aurícula derecha, RV, ventrículo derecho.

Figura 10: Vista apical de cinco cámaras. LA, aurícula izquierda; LV, ventrículo izquierdo; RA, aurícula derecha, RV, ventrículo derecho; LVOT, tracto e salida del ventrículo izquierdo; Ao, aorta.

Mediante la inclinación del transductor en un ángulo poco marcado con respecto a la pared torácica, lo que da como resultado un plano más anterior, se pueden registrar en el tracto de salida del ventrículo izquierdo, la válvula aórtica y la raíz aórtica. Con frecuencia esta imagen se menciona como “vista de cinco cámaras”. En ella, tanto el flujo de entrada al ventrículo izquierdo como el de salida se ubican en forma casi paralela al haz de ultrasónico, lo que permite la evaluación cuantitativa de ambos

patrones en forma simultánea mediante Doppler. Además, desde esta vista se pueden detectar tanto la insuficiencia mitral como la aórtica y suele ser la mejor perspectiva para distinguir entre estenosis aórtica valvular o subvalvular.

Si se usa la vista apical de cuatro cámaras como referencia, mediante la rotación del transductor alrededor de 60 grados en dirección antihoraria, se registra la vista apical de dos cámaras. Aquí, la intención es excluir por completo el registro de la aurícula y el ventrículo derechos, de manera que se observen solo el ventrículo izquierdo, la aurícula izquierda y la válvula mitral. Ambas vistas suelen utilizarse en combinación para llevar a cabo una evaluación cuantitativa biplano de la función ventricular izquierda.

- **Doppler pulsado** La evaluación con Doppler desde este punto de vista posee numerosas aplicaciones importantes. La orientación del flujo sanguíneo en relación con el plano de las imágenes permite registrar los perfiles de flujo mitral, aórtico y de las venas pulmonares desde la punta. Primero se coloca el área de muestreo en el borde de las valvas mitrales para registrar el flujo de entrada mitral. Luego, se registra en flujo de salida aórtico desde la vista cinco cámaras, con el volumen de muestreo posicionado a nivel del anillo aórtico. La exploración del flujo venoso pulmonar con Doppler pulsado suele obtenerse desde la vista apical de cuatro cámaras, a pesar de que existe una distancia considerable entre el transductor y los flujos que se van a estudiar. Por último, en las vistas apicales, las imágenes con Doppler color deben realizarse en forma rutinaria para descartar insuficiencia de las válvulas mitral, aórtica o tricúspide. Con el Doppler pulsado se mide la onda E que refleja el flujo diastólico precoz a través de la válvula mitral (figura 11B).
- Las imágenes con **Doppler tisular** del anillo mitral se realizan con regularidad como ayuda en la evaluación de la función diastólica y de las presiones de llenado. En la vista de cuatro cámaras, se posiciona el volumen de muestreo sobre el anillo mitral en la porción medial del tabique. Las velocidades del anillo en la pared lateral también deben registrarse. El movimiento del anillo durante el ciclo cardíaco se puede registrar en la mayoría de los pacientes. Con el Doppler tisular se estima la onda e', que refleja la velocidad máxima diastólica precoz en el anillo mitral (figura 11C).
- Por último, el ecocardiograma en **modo-M** color para registrar el flujo mitral y el llenado del ventrículo izquierdo se está utilizando de forma rutinaria para evaluar la función diastólica. Con el modo-M se mide el desplazamiento del anillo mitral en sentido base-apical (MAPSE) (figura 11D).

A partir de los datos obtenidos en estos registros se obtienen los siguientes parámetros:

- **FEVI.** La Fracción de Eyección del Ventrículo Izquierdo es un parámetro adimensional que se calcula mediante la siguiente sencilla fórmula: $[FEVI=(VTDS-VTS)/VTDS]$; se resta el volumen telesistólico al volumen telediastólico y se divide por el volumen telediastólico. Es un parámetro utilizado para evaluar la función VI, determinando el porcentaje de sangre

eyectado por el VI al final de la sístole respecto al volumen máximo albergado por el VI al final de la diástole.

- **Masa VI.** La monitorización de la masa VI en procesos de remodelado miocárdico, es de gran utilidad. Se emplea la variación de una fórmula (Devereux) que, en vez de utilizar el volumen diastólico, utiliza el diámetro diastólico.
- **E/e'.** Es un índice que refleja la presión intracavitaria telediastólica del VI.

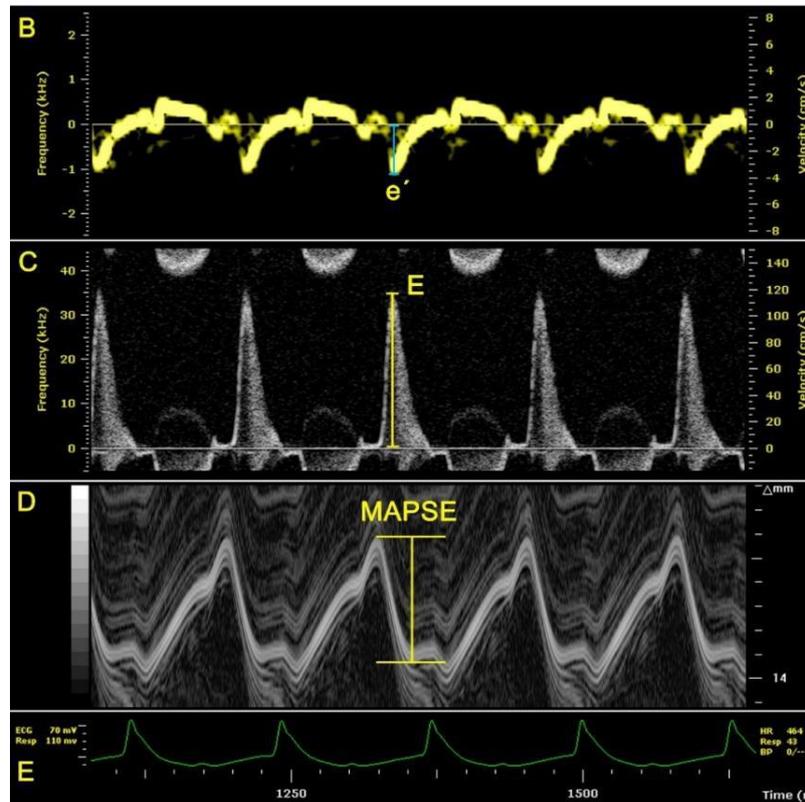


Figura 11. B: Registro con Doppler tisular en el anillo mitral septal, utilizado para medir la onda e'; C: Registro con Doppler pulsado en el área de flujo de la válvula mitral cerca del borde libre de los velos, utilizado para medir la onda E; D: Registro en modo M del anillo mitral septal, utilizado para medir la MAPSE; E: Registro de ECG.

4. RESULTADOS

5. DISCUSIÓN

4. RESULTADOS

4.1 EVOLUCIÓN DE LAS ALTERACIONES ECOCARDIOGRÁFICAS EN LOS PERIODOS DE CAT Y de-CAT.

Los animales fueron sometidos a controles ecocardiográficos de seguimiento en ocho puntos temporales. El primero de ellos fue el estudio basal, que se realizó en la semana anterior a la cirugía de CAT

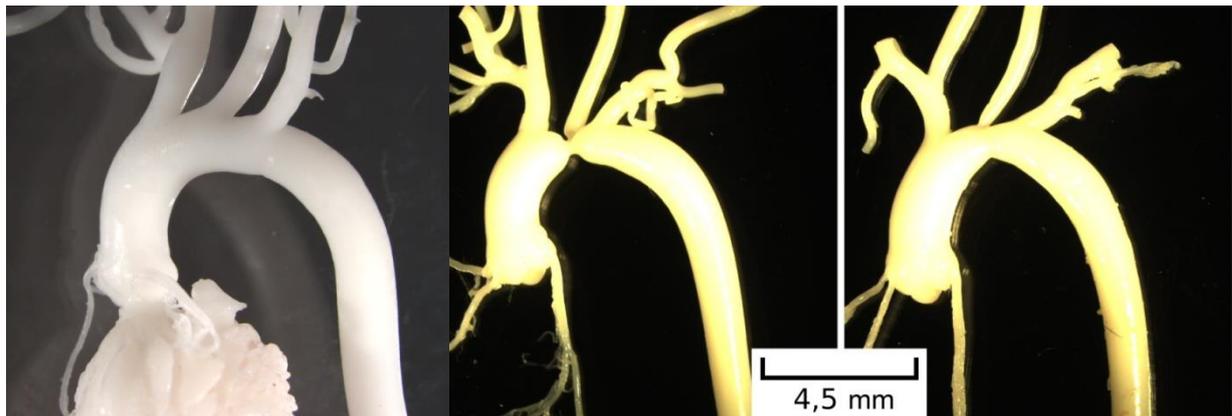


Figura 12: Moldes intravasculares de silicona de la aorta torácica procedentes de ratones sin cirugía (**izquierda**), después de dos semanas de CAT (**centro**) y después del de-CAT (**derecha**). Cortesía de David Merino Fernández.

Con posterioridad a la cirugía, se realizó una ecografía semanal durante las cuatro semanas de seguimiento tras la constricción. Finalmente, se hicieron controles ecocardiográficos 1, 2 y 4 semanas después de la reintervención quirúrgica para liberar la constricción.

A continuación se procede al análisis de las variaciones de los diferentes parámetros ecocardiográficos antes del CAT, a las 4 semanas del CAT y a las 4 semanas del de-CAT.

El septo interventricular (SIV) aumentó significativamente durante la fase de CAT pero no hubo diferencias estadísticamente significativas en la muestra en el de-CAT (SIV: control: $0,90 \pm 0,01$ mm, CAT: $1,10 \pm 0,03$ mm, y de-CAT $1,02 \pm 0,03$ mm).

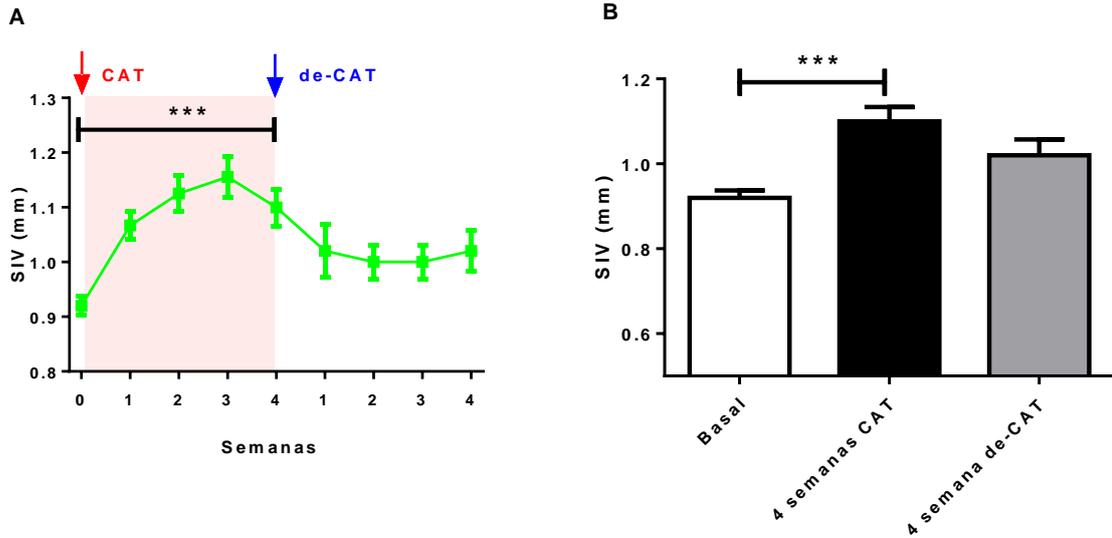


Figura 13:Curso temporal evolutivo del SIV (**A** y **B**). El estudio muestra una diferencia estadísticamente significativa entre el nivel basal y el CAT ($F_{2,28}=14,29$, $p<0,0001$), pero no entre el CAT y el de-CAT (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

El espesor de la pared posterior (PP) aumentó significativamente durante la fase CAT y se redujo tras el de-CAT (PP: control: $0,94\pm 0,02$ mm, CAT: $1,16\pm 0,04$ mm, de-CAT: $1,02\pm 0,037$ mm).

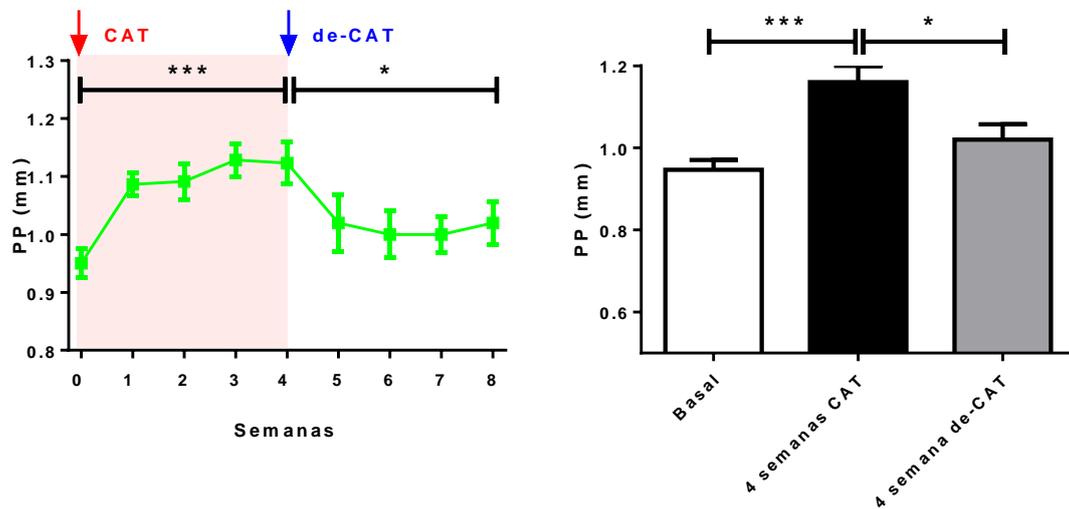


Figura 14: (A y B) Curso temporal evolutivo del espesor de la PP. El estudio muestra diferencias estadísticamente significativas durante la fase CAT ($F_{2,22}= 43,2$, $p<0,0001$) y de-CAT ($F_{2,22}= 7,8$, $p<0,05$) (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

El DTD del VI (figura 15 A y B) se modificó durante el periodo de CAT (control: $4,50\pm 0,04$ mm vs CAT: $4,93\pm 0,07$ mm), pero se mantuvo estable en el periodo de de-CAT ($4,68\pm 0,12$ mm).

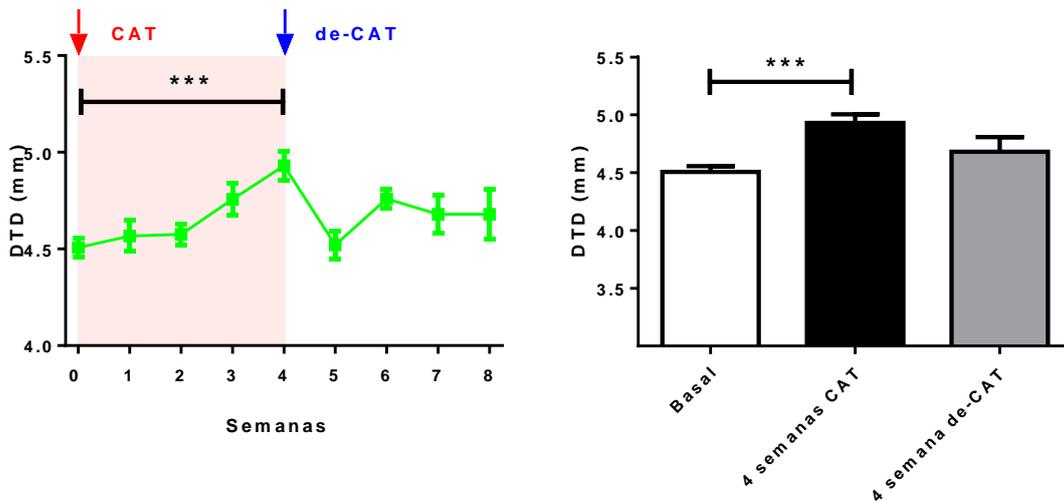


Figura 15: (A y B) Curso temporal evolutivo del diámetro telediastólico (DTD) (CAT: $F_{(2, 30)} = 11,04$, $p < 0,0001$) (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

El diámetro telesistólico (DTS) del VI sufrió un aumento significativo tras el CAT (control: $3,07 \pm 0,056$ mm vs CAT: $3,95 \pm 0,13$ mm) y se redujo significativamente tras el de-CAT ($3,41 \pm 0,22$ mm)

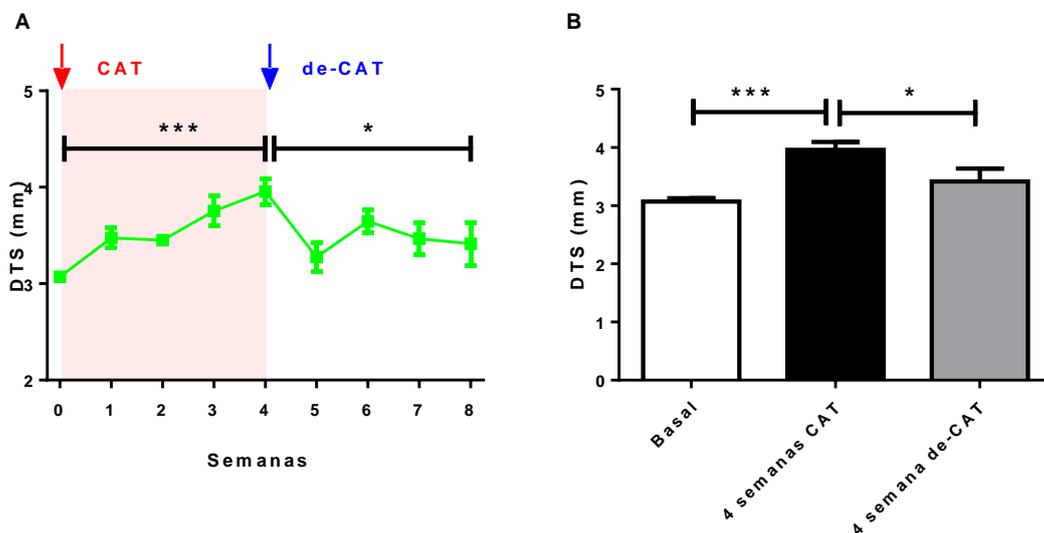


Figura 16: (A y B) Curso temporal evolutivo del diámetro telesistólico (DTS) (CAT: $F_{(2, 30)} = 18,07$, $p < 0,0001$); de-CAT: $F_{(2, 25)} = 7,28$, $p < 0,05$) (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

Se ha determinado la función sistólica a través de la FEVI, parámetro ecocardiográfico que refleja la función sistólica en el eje corto del VI y la MAPSE, parámetro relacionado con la función sistólica del VI en el eje largo.

La FEVI (figura 17 A y B) se redujo significativamente durante la fase de CAT (control: $57,48 \pm 2,24\%$ vs CAT: $40,26 \pm 3,03\%$) y recuperó los valores basales tras el de-CAT ($52,52 \pm 4,40\%$)

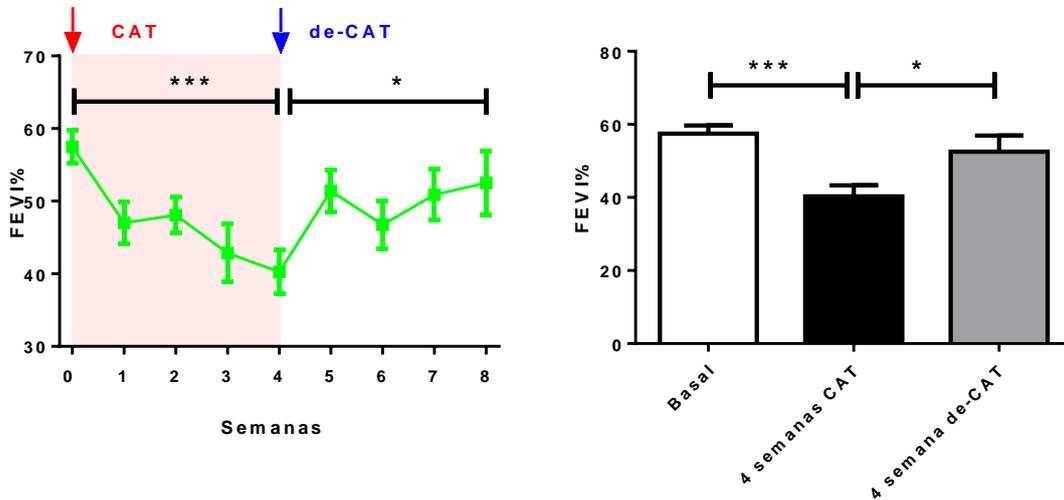


Figura 17: (A y B) Curso temporal evolutivo de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo (FEVI) CAT ($F_{(2, 30)} = 10,93$, $p < 0,0001$) de-CAT ($F_{(2,28)} = 2,34$, $p < 0,05$) (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

La MAPSE (figura 18 A y B) se redujo significativamente durante la primera semana de CAT, manteniéndose estable durante las 3 semanas siguientes (control: $0,70 \pm 0,01\text{mm}$ vs CAT: $0,38 \pm 0,05\text{mm}$). Tras el de-CAT no se produjo una recuperación completa de los valores basales de MAPSE ($0,45 \pm 0,06\text{mm}$)

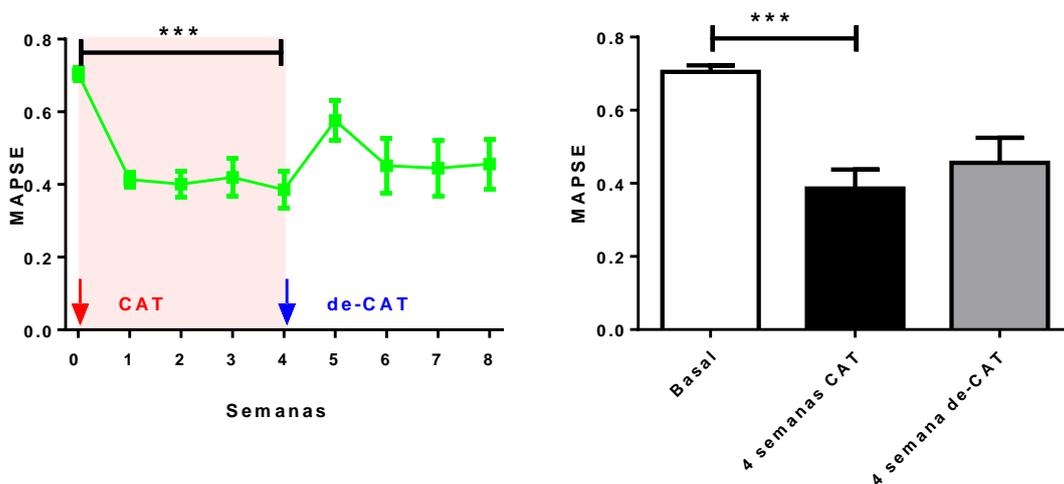


Figura 18: (A y B) Curso temporal evolutivo de la MAPSE, CAT ($F_{(2, 29)} = 20,35$, $p < 0,0001$) (ANOVA de una vía seguido del test de Sidak de comparaciones múltiples).

El parámetro E/e' (figura 19 A y B), reflejo de la presión de llenado VI, aumentó significativamente durante la fase de CAT (control: $26,63 \pm 2,42$ vs CAT $74,49 \pm 9,95$), pero no se redujo significativamente después del de-CAT ($40,53 \pm 10,50$).

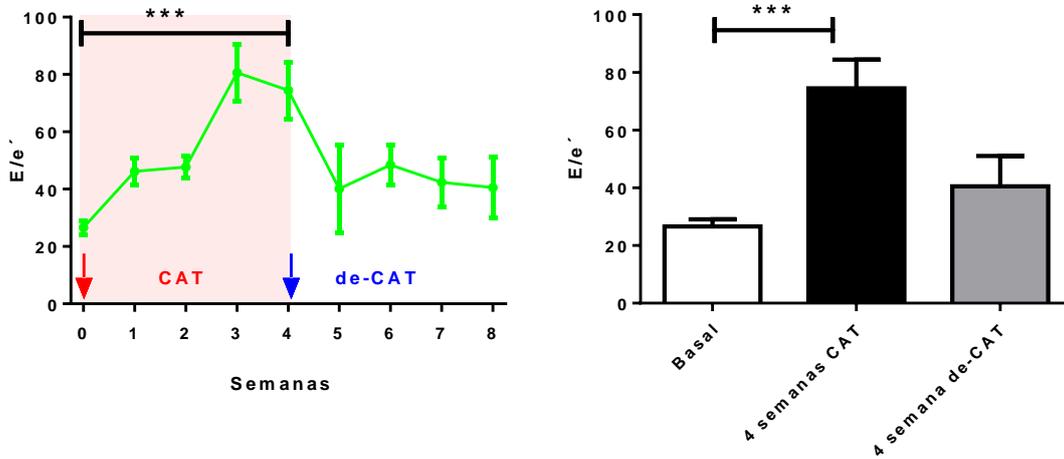


Figura 19: (A y B) Curso temporal evolutivo de E/e' durante las 4 semanas tras el CAT ($F_{(2, 23)} = 12,46$, $p < 0,0001$) y las 4 semanas siguientes al de-CAT (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

La medida de la masa cardiaca es otro valor muy útil y que se puede medir mediante ecocardiografía. Así distinguimos la medida de la masa cardiaca y la relación entre la masa cardiaca partido del IMC del ratón.

La primera medida, masa cardiaca, expresada en mg, aumentó significativamente durante la fase de CAT (control: $139,5 \pm 5,94$ mg vs CAT: $207,7 \pm 12,50$ mg) y se redujo también significativamente después del de-CAT ($160,5 \pm 12,07$ mg).

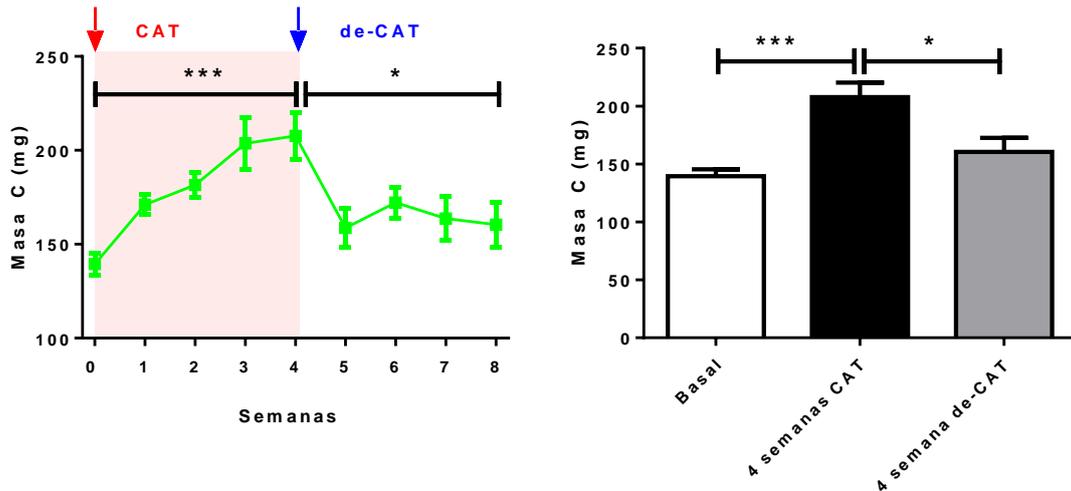


Figura 20: (A y B) Curso temporal evolutivo de la masa cardiaca (mg) durante las 4 semanas tras el CAT ($F_{(2,28)} = 13,24$, $p < 0,0001$) y a las 4 semanas siguientes al de-CAT ($F_{2,28} = 2,45$, $p < 0,05$) (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

La relación entre la masa del ventrículo izquierdo y el peso del ratón (mg/g) aumentó significativamente durante la fase de CAT (control: $3,02 \pm 0,13 \text{mg}10^{-3}/\text{m}^2$ vs CAT: $5,14 \pm 0,40 \text{mg}10^{-3}/\text{m}^2$, pero este este caso no se observaron diferencias significativas después del de-CAT ($4,14 \pm 0,33 \text{mg}10^{-3}/\text{m}^2$).

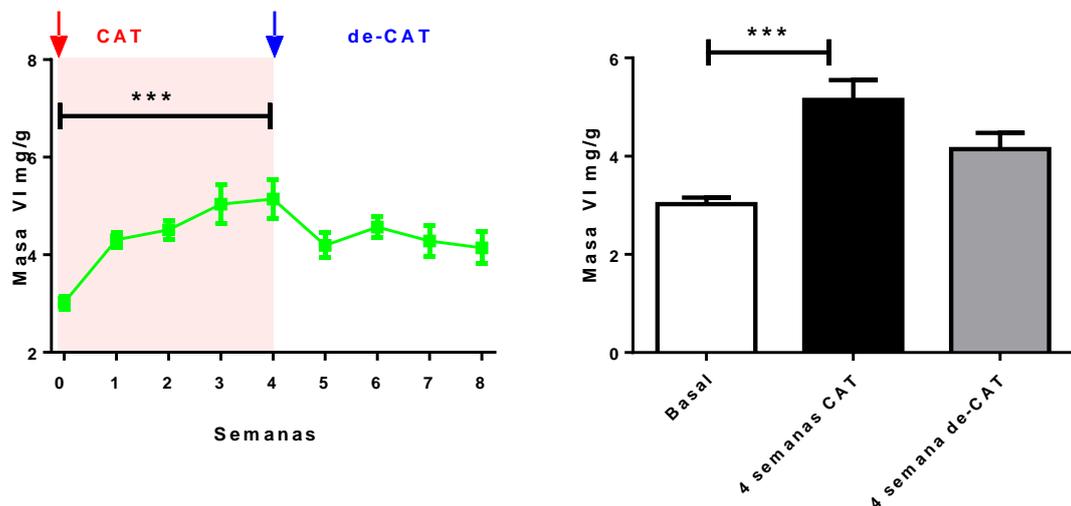


Figura 21: (A y B) Curso temporal evolutivo de la relación entre la masa del ventrículo izquierdo y el peso (mg/g) durante las 4 semanas tras el CAT ($F_{(2,27)} = 14,22$, $p < 0,0001$) y las 4 semanas siguientes al de-CAT (ANOVA de una vía seguido del test de Bonferroni).

Por último, se determinó el gradiente de presión (mmHg) a nivel de la salida de la aorta. Esta variable sufrió cambios significativos tanto durante la fase de CAT (control: $2,06 \pm 0,29$ mmHg vs CAT: $45,58 \pm 7,61$ mmHg) como en la fase de de-CAT ($7,29 \pm 1,61$ mmHg)

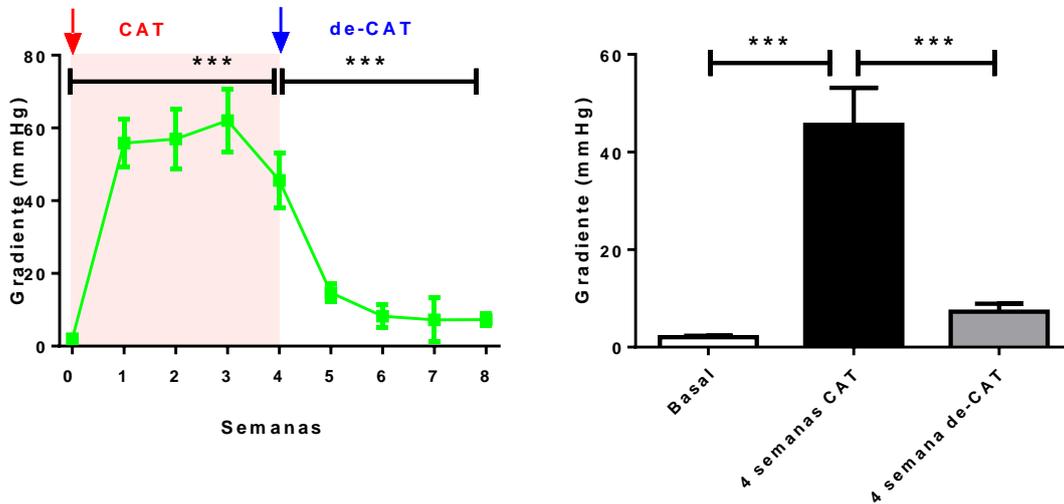


Figura 22 (A y B): Curso temporal evolutivo del gradiente de presión (mmHg) durante las 4 semanas tras el CAT ($F_{(2,22)} = 32,16$, $p < 0,0001$) y a las 4 semanas siguientes al de-CAT ($F_{(2,18)} = 29,87$, $p < 0,0001$) (ANOVA de una vía seguido del test de Sidak de comparaciones múltiples).

5. DISCUSIÓN

En los países desarrollados, la estenosis aórtica es la enfermedad valvular cardiaca que más frecuentemente requiere cirugía en el adulto y su importancia socio-sanitaria va en aumento en nuestra sociedad, en paralelo con la expectativa de vida de la población³³. La estenosis aórtica somete al VI a una sobrecarga de presión progresivamente creciente, que provoca un remodelado del miocardio caracterizado por el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos y el desarrollo de fibrosis intersticial y perivascular. Inicialmente, la hipertrofia VI constituye un mecanismo adaptativo dirigido a reducir el estrés parietal pero, con el tiempo, el remodelado miocardio patológico puede conducir a la insuficiencia cardiaca³⁴. El único tratamiento efectivo para la estenosis aórtica severa es la sustitución de la válvula aórtica. Después de la cirugía y debido a reducción del estrés biomecánico, el miocardio experimenta una paulatina recuperación estructural que se denomina remodelado inverso³⁵. Sin embargo, no todos los pacientes consiguen normalizar las alteraciones estructurales miocárdicas provocadas por la EA. La regresión de la hipertrofia tras la sustitución valvular aórtica está inversamente relacionada con el grado de deterioro estructural miocárdico preoperatorio. Además, la persistencia de hipertrofia miocárdica tras el recambio valvular es un factor que ensombrece los resultados postoperatorios, penalizando el estado clínico de los pacientes y su supervivencia tanto a corto como a largo plazo. Por el contrario, la normalización de la masa cardiaca tras la cirugía es un predictor independiente de buen pronóstico funcional y de supervivencia³⁶.

Con el objetivo de lograr la comprensión de los mecanismos implicados en el remodelado del VI y su regresión se han desarrollado modelos experimentales que tratan de reproducir la situación clínica de estrés hemodinámico. El más exitoso y popular de ellos es la constricción controlada del arco aórtico (CAT) en ratones mediante la técnica de Rockman, que permite estudiar las alteraciones hemodinámicas y estructurales propias del remodelado miocárdico. Los ratones sometidos a este procedimiento, una vez transcurrido el tiempo de sobrecarga de presión deseado, pueden ser re-operados para retirar la constricción mediante el procedimiento de de-CAT, lo que permite estudiar el proceso de remodelado inverso.

En el presente trabajo, se aportan diversas innovaciones técnicas que incrementan la eficiencia y utilidad del CAT y de-CAT para el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el remodelado miocárdico secundario a la sobrecarga de presión y en su regresión tras la eliminación del estrés biomecánico.

La discusión del presente trabajo se abordará en tres apartados sucesivos:

1. Mejoras técnicas en el procedimiento quirúrgico y métodos de valoración de la función cardiaca introducidos en el modelo.
2. Análisis de los cambios funcionales en el corazón sometido a sobrecarga de presión mediante CAT.
3. Remodelado inverso tras la eliminación de dicho estrés hemodinámico mediante de-CAT.

5.1 MEJORAS TÉCNICAS INTRODUCIDAS A LAS TÉCNICAS CAT Y DE-CAT EN RATONES.

El primer objetivo fue optimizar el modelo de constricción del arco aórtico descrito por Rockman que, a pesar de ser el más utilizado, ha sido cuestionado por diversos investigadores. Teóricamente, los puntos fuertes del modelo CAT de Rockman son su reproducibilidad y el desarrollo de un aumento significativo y consistente de la masa VI, en un corto período de tiempo. En la práctica, sin embargo, la reproducibilidad está limitada por factores como la utilización de forma estandarizada de una misma cánula (27 G = 0,41 mm de diámetro externo) para todos los animales, independientemente del sexo, genotipo, peso, edad, talla corporal y tamaño de la aorta. Existen otros factores que añaden variabilidad a la técnica de Rockman, como son la tensión con la que se realiza el anudado de la sutura³⁷ y la complicación, relativamente frecuente (hasta un 30% de los casos) y a menudo ignorada, de la migración intraluminal de la sutura.

Otro inconveniente del método de Rockman es el elevado riesgo de rotura de la pared de la aorta que en el momento crítico del anudado tiene que soportar, no solo el estrés de cizalladura que ejerce la sutura contra el metal de la cánula, sino además el violento aumento de la presión arterial proximal por la oclusión completa transitoria del flujo sanguíneo que se produce en ese punto. Este fenómeno provoca la rotura de la arteria en un elevado número de ratones, con la consecuente hemorragia exanguinante y muerte del animal y es particularmente importante en ratones manipulados genéticamente con aortas más frágiles. Por otra parte, la oclusión total del arco aórtico transverso producida de forma temporal durante la maniobra del anudado produce una sobrecarga instantánea y brutal sobre el VI que no es tolerada por algunos animales y puede producir en los supervivientes una sobredistensión VI, con daño agudo de miocardio.

A pesar de que se intente homogeneizar al máximo las características de los animales (edad, peso, talla, género y genotipo) y que su nivel de entrecruzamiento genético sea elevado, existen ciertas diferencias interindividuales en el tamaño de la aorta. Es por ello que, si se utiliza la misma cánula para calibrar la constricción de ratones con aortas de distinto diámetro, el grado de constricción generado no es el mismo. El Dr. Nistal desarrolló un procedimiento que permite un cálculo individual del diámetro del CAT, en función del calibre de la luz arterial. La individualización de la constricción a las características morfométricas particulares de cada animal constituye un avance importante en el intento de optimizar la técnica de CAT. Se demostró, en primera instancia, la fiabilidad de la medición ecográfica del diámetro luminal del arco aórtico transverso, estimación imprescindible para poder llevar a cabo una constricción individualizada para cada animal. Además, se determinó el espesor de la pared promediando una serie de mediciones realizadas en ratones a los que se les hizo un molde intravascular de silicona. Por este procedimiento se estableció que el espesor parietal de la aorta transversa es de aproximadamente 0,06 mm. Este valor se extrapoló al resto de series experimentales ya que las características morfométricas de los animales utilizados en este trabajo eran similares. Gracias a estas valoraciones ecocardiográficas previas y a la aplicación del algoritmo que se elaboró para calcular la distancia a la que deben estar los nudos de la sutura, se consiguió individualizar el grado de estenosis, aplicando el mismo porcentaje de reducción del área de flujo

aórtico a cada ratón, independientemente de su tamaño, en lugar de dejar un área luminal estándar, que para un ratón pequeño puede resultar excesiva, mientras que puede ser escasa para un ratón grande.

Por otro lado, con la nueva técnica de ligadura con doble vuelta personalizada, se solventan otros inconvenientes de la técnica original de Rockman. Así, con la sustitución del anudado de la arteria junto a una cánula de referencia por un cerclaje con una sutura de polipropileno, cerrada con un micro clip, se consigue simplificar la maniobra de CAT reduciendo significativamente la mortalidad intraoperatoria. Además, la exactitud de la constricción es mucho mayor al estar determinada por la distancia a la que se encuentran los nudos de la sutura. Todo ello redundará en un mayor rendimiento del modelo y menor utilización de animales. La realización de la doble vuelta cumplió otros dos fines. Por un lado, reduce a la mitad las inexactitudes cometidas en la distancia que separa los nudos de la sutura, con respecto al cerclaje simple, al duplicar el recorrido de la misma. Además, al aumentar la superficie de la constricción se reduce la presión que ejerce la sutura en cada punto de la pared vascular, lo que puede reducir el riesgo de migración de la sutura al interior de la luz vascular. La "internalización" de la sutura a través de la pared aórtica, hacia el espacio intraluminal, es una complicación descrita que alcanza hasta un 30% de los animales cuando se emplea la técnica clásica de CAT y se relaciona con el decúbito que produce la sutura sobre la pared aórtica con erosión progresiva de la misma, formación de un falso aneurisma y finalmente migración de la sutura hacia la luz³⁸.

En el modelo de CAT, la internalización del cerclaje alivia parcialmente la estenosis, lo que se traduce en un menor estrés hemodinámico, menor desarrollo de hipertrofia VI y menor compromiso funcional³⁹. En las distintas series experimentales realizadas con esta modificación técnica de la constricción con clip + doble vuelta no se detecta este fenómeno en ningún caso. El reparto de la presión de la sutura sobre la pared vascular entre las dos vueltas del hilo y el menor traumatismo intraoperatorio de la pared aórtica con supresión del estrés del anudado sobre la aguja, podrían ser las causas más plausibles para explicar la prevención de este fenómeno.

Una última ventaja de esta técnica quirúrgica es que, una vez transcurrido el tiempo programado de estrés biomecánico, la retirada del micro clip que mantiene la ligadura de la aorta es muy sencilla, lo que facilita sustancialmente el procedimiento de de-CAT para el estudio del remodelado inverso. El nuevo procedimiento, además de simplificar la liberación de la sutura, previene la laceración accidental de la pared vascular durante la maniobra de corte de la ligadura, que conlleva la muerte por exanguinación del animal.

En resumen, las modificaciones del Dr. Nistal de las técnicas originales de CAT y de -CAT aportan varias ventajas:

1. Permite individualizar la constricción en función de las características morfométricas de la aorta de cada animal.
2. Ofrece un mayor control de la constricción, ya que el grado de ésta no depende de la tensión de anudado de la ligadura. Durante la cirugía, se puede comprobar la calidad de la constricción producida. Una vez que los dos nudos de la sutura están en paralelo y el

microclip inmediatamente debajo de ellos, se sabe el perímetro y el área residual de flujo exactos de la aorta. Esto contrasta con la técnica de Rockman donde la comprobación del grado de constricción de la aorta es subjetiva e imprecisa.

3. No requiere oclusión, tracción, ni cizalladura de la aorta, lo que reduce la mortalidad quirúrgica por rotura vascular y reduce, además, el estrés VI al no tener lugar el pico de presión generado al ocluir completamente la aorta.

4. Previene la migración de la sutura al espacio intraluminal, responsable de la reducción tardía del gradiente transcoartacional.

5. Facilita la realización del de-CAT al simplificar la sección de la sutura de la aorta, evitando la laceración de la pared vascular y la muerte del animal durante la maniobra.

5.2 MODIFICACIONES FUNCIONALES SECUNDARIAS A LA SOBRECARGA DE PRESIÓN MEDIANTE CAT Y SU REGRESIÓN TRAS DE-CAT.

En la clínica, uno de los parámetros más utilizados para determinar la severidad de la estenosis aórtica es el gradiente máximo de presión registrado en la zona inmediatamente distal a la válvula aórtica. Con la ecocardiografía Doppler se registra la velocidad del flujo sanguíneo transvalvular (en m/s), y con la ecuación modificada de Bernoulli se calcula el gradiente de presión (en mm Hg): $GP = 4 V_{max}^2$.

En humanos existe una fórmula matemática, el modelo de regresión de Cox, establece tres grados de severidad de la estenosis aórtica en función del gradiente de presión transvalvular. Cuando este gradiente es ≤ 36 mmHg ($V_{max}=3$ m/s) la probabilidad de que se produzca un episodio clínico en un periodo de 5 años es baja. Por el contrario, si el gradiente es ≥ 64 mmHg ($V_{max}=4,0$ m/s) existe una probabilidad superior al 50% de que aparezcan síntomas o se produzca incluso la muerte del paciente en un periodo de 2 años.

Bjørnstad y cols.⁴⁰ propusieron que el gradiente transcoartacional en el modelo murino de CAT aórtico debe ser mayor de 36 mmHg si se pretende conseguir una hipertrofia significativa del VI. El gradiente transcoartacional permite comprobar la correcta realización del procedimiento quirúrgico, así como la homogeneidad del grado de constricción entre animales. En nuestros ratones, el gradiente máximo promedio generado por la constricción fue de 45mmHg, con un incremento de la masa VI del 42% a las cuatro semanas de la cirugía CAT.

Sin embargo, en la literatura los métodos utilizados para determinar el gradiente son variables; en unos casos se trata de métodos invasivos, con registro de la presión arterial proximal y distal a la constricción, y en otros, se determinó mediante ecografía Doppler, midiendo la velocidad del flujo sanguíneo en la zona inmediatamente distal a la constricción o comparando los registros Doppler en ambas arterias carótidas. La variabilidad en los resultados publicados en cuanto a los gradientes de presión generados utilizando el mismo tamaño de cánula, que frecuentemente no se correlacionan con el grado de hipertrofia desarrollado, probablemente refleje

imprecisión en la medición del gradiente o inadecuación del grado de constricción a las características morfométricas del animal. La medición mediante catéteres de presión de alta fidelidad es el método más preciso, pero presenta el inconveniente de no poderse realizar repetidamente sino sólo en el estudio terminal, por lo que no permite realizar un seguimiento de la evolución temporal del gradiente transcoartacional.

En nuestro modelo de coartación aórtica, mediante ecocardiografía con Doppler pulsado, observamos una gran homogeneidad en los gradientes transcoartación producidos por el CAT y una buena correlación entre gradiente y severidad del remodelado, que se refleja en el grado de concordancia entre el gradiente registrado tras la cirugía y el incremento de la masa VI indexada al peso del animal en el momento del sacrificio. Estos buenos resultados también podrían estar relacionados con la constricción individualizada propia de nuestro modelo.

El aumento del estrés sistólico parietal del VI, provocado por el aumento de la impedancia a la eyección tras el CAT, promueve la activación de cascadas de señalización que inician un proceso progresivo de alteraciones estructurales y funcionales denominado remodelado miocárdico. A nivel estructural, dicho remodelado se caracteriza por el crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos acompañado de un incremento en la síntesis y deposición de proteínas de matriz extracelular que se traduce en fibrosis miocárdica intersticial y perivascular⁴¹. La fibrosis excesiva tiene como consecuencia inicial el deterioro de la función diastólica VI y la alteración de la conducción eléctrica, aumentando el riesgo de disfunción ventricular y de arritmias⁴². La deposición incrementada de elementos fibrosos en la matriz extracelular se asocia a un peor pronóstico clínico de los pacientes en términos de situación funcional y de morbilidad.

Por otro lado, la hipertrofia fue considerada tradicionalmente un mecanismo compensador dirigido a normalizar el estrés parietal sistólico y preservar la función VI. Sin embargo, este concepto ha sido cuestionado en estudios clínicos que demuestran las consecuencias deletéreas a largo plazo de la hipertrofia VI y ponen de manifiesto su papel predictor de morbi-mortalidad cardiovascular⁴³.

En nuestro modelo experimental de sobrecarga de presión mediante CAT, los animales desarrollaron hipertrofia VI progresiva a expensas de un engrosamiento de las paredes. El máximo grado de hipertrofia se alcanzó a las cuatro semanas de CAT, pero los cambios más intensos se produjeron en el transcurso de las dos primeras semanas, lo que indicaría una hipertrofia cardiomiocitaria generada en respuesta a la mayor demanda funcional. Durante el periodo de estudio, el engrosamiento parietal no se acompañó de dilatación significativa de la cámara, indicando que esta tiende a una geometría concéntrica. El remodelado concéntrico es una característica típica de la sobrecarga de presión en humanos⁴⁴.

Estudios previos realizados por el Dr. Nistal y su equipo indican que, al igual que sucede en la clínica, existen diferencias de sexo en el patrón de la hipertrofia VI experimental; los ratones machos muestran mayor tendencia a la dilatación VI, mientras que las hembras desarrollan una hipertrofia más concéntrica⁴⁵. La ausencia

de andrógenos se ha postulado como la razón más plausible para explicar este patrón de remodelado en las hembras.

En el presente estudio, los parámetros ecocardiográficos indicadores de función VI, tanto sistólica como diastólica, se vieron alterados en los ratones sometidos a CAT. La valoración de la función sistólica del VI se sustentó en dos indicadores: la función en el eje corto, reflejada por la FEVI, y la función en el eje largo, reflejada por la MAPSE. El parámetro más comúnmente utilizado para determinar el deterioro funcional global del VI es la FEVI que, en condiciones de sobrecarga de presión, sufre un deterioro progresivo. No obstante, se ha observado que la fibrosis miocárdica, incluso cuando es severa, no siempre origina un deterioro significativo de la FEVI. Por el contrario, la MAPSE se deteriora precozmente desde los primeros estadios de la sobrecarga de presión, incluso estando relativamente preservada la función VI en el eje corto⁴⁶. El deterioro precoz de la MAPSE se ha explicado en base a la orientación longitudinal de la mayor parte de las fibras musculares subendocárdicas del VI.

Esta región del miocardio es la más vulnerable al aumento del estrés parietal sistólico y suele ser donde debuta el desarrollo de fibrosis en respuesta al estrés biomecánico y a la isquemia subendocárdica que la acompaña⁴⁷. En consonancia con los resultados en humanos, en el estudio la máxima reducción de la MAPSE se produjo durante la primera semana de constricción (-55%), y permaneció prácticamente estable durante las 4 semanas de seguimiento (+17%). Por el contrario, la FEVI se deterioró menos intensamente y de forma más progresiva, alcanzando su máxima reducción transcurridas 4 semanas de CAT (-24%).

La fibrosis miocárdica se asocia a cambios en la distensibilidad y en las propiedades viscoelásticas del miocardio que condicionan el desarrollo de disfunción diastólica. Así, parámetros que determinan la conducta del VI durante la diástole, como la distensibilidad pasiva, la viscoelasticidad y la relajación, se ven fuertemente afectados cuando los miocitos son sustituidos o se ven rodeados por un exceso de tejido fibroso⁴⁸. La disfunción diastólica se refleja por un incremento de la presión de llenado VI.

En los ratones del estudio, se estimó la presión de llenado del VI mediante el parámetro E/e' , que aumentó significativamente después de la cirugía en ausencia de un deterioro severo de la FEVI; estos resultados sugieren la existencia de disfunción diastólica. Los datos concuerdan con los hallazgos clínicos en humanos con estenosis aórtica severa. En estos pacientes se ha observado que existe una correlación positiva entre la severidad histológica de la fibrosis del VI y los valores ecocardiográficos de E/e' .

5.3 REMODELADO INVERSO TRAS EL DE-CAT.

El remodelado cardiaco provocado por la sobrecarga de presión puede regresar si se libera el miocardio del estrés hemodinámico mediante tratamiento médico, como en el caso de la hipertensión arterial, o quirúrgico en el caso de la EA. En la actualidad, el único tratamiento que se ha mostrado eficaz para mejorar la supervivencia de los pacientes con estenosis aórtica severa sintomática es la substitución o implantación valvular aórtica. Una vez paliado el estrés hemodinámico, el remodelado, en términos de hipertrofia, tiende a regresar hacia la normalidad a lo largo los meses siguientes, no alcanzándose la recuperación total hasta transcurrido más de un año de la cirugía⁴⁹. Diversos estudios indican que, en aquellos pacientes que acceden a la cirugía cuando el remodelado es muy severo, algunos de los daños estructurales son irreversibles⁵⁰. Varios autores han observado que algunos pacientes con estenosis aórtica severa y fibrosis miocárdica extensa, determinada histológicamente y por resonancia magnética, no mejoraban su clase funcional tras la cirugía⁵¹. Los estudios de seguimiento postquirúrgico han puesto de manifiesto que la persistencia de hipertrofia residual tras el recambio valvular es un predictor negativo en cuanto a supervivencia, situación funcional y necesidad de ingreso hospitalario⁵².

En este estudio experimental, la liberación de la sobrecarga de presión se correspondió con una drástica reducción del gradiente aórtico que permitió la puesta en marcha de proceso de reversión de la hipertrofia VI. Los cambios morfológicos y funcionales del miocardio siguieron cursos temporales diferentes en su retorno hacia los niveles previos al CAT. Así, la regresión de la hipertrofia mostró dos fases temporales bien diferenciadas tras el de-CAT. Observamos una fase precoz, que abarca la 1ª semana tras la cirugía, durante la cual se produjo una importante pérdida de masa VI (-33%), a expensas de una reducción significativa en los espesores parietales. Esta regresión precoz tras de-CAT es especular a la reacción hipertrófica post CAT, lo que sugiere una alta sensibilidad de los mecanismos responsables del crecimiento hipertrófico de los cardiomiocitos al incremento en la carga unitaria. Transcurrida esta fase de recuperación precoz, la posterior pérdida de masa VI fue mucho menos acusada y, de hecho, la masa no llegó a normalizarse transcurridas las 4 semanas de seguimiento post de-CAT. Estos resultados indican que, en este modelo experimental, 4 semanas de de-CAT no son suficientes para que la masa VI hipertrofiada a lo largo de 4 semanas de sobrecarga hemodinámica pueda regresar hasta alcanzar valores normales.

Tanto los espesores parietales como el espesor relativo de la PP de los ratones mantienen valores significativamente superiores a los observados durante el estudio ecocardiográfico basal. La recuperación de la función sistólica en el eje corto, reflejada por la FEVI, siguió una evolución más paulatina que la de la hipertrofia, pero llegó a recuperar valores similares a los basales transcurridas las 4 semanas de de-CAT. Lo mismo podemos afirmar respecto a la función diastólica reflejada ecocardiográficamente como la relación E/e' . Sin embargo, no ocurrió lo mismo con la función sistólica en el eje largo, reflejada por la MAPSE, que no llegó a normalizarse en todo el periodo de seguimiento. Estos resultados ponen nuevamente de manifiesto la sensibilidad de este parámetro como marcador de daño estructural miocárdico. Es importante reseñar que una MAPSE reducida se asocia con un mal pronóstico en

pacientes con insuficiencia cardiaca, fibrilación auricular, post-infarto de miocardio y en pacientes con estenosis aórtica sometidos a recambio valvular⁵³.

Algunos autores, han analizado en modelos murinos la repercusión de la duración en el tiempo de la sobrecarga de presión sobre el grado de recuperación morfológica y funcional tras el de-CAT⁵⁴. Sus datos permiten concluir que a mayor duración del periodo de CAT más prolongado es el periodo de recuperación tras el de-CAT, de tal forma que los cambios estructurales y funcionales podrían llegar a ser irreversibles si el periodo de sobrecarga de presión es muy prolongado. Esta variable no ha sido evaluada en los animales del presente estudio, ya que la duración de la fase de CAT fue la misma para todos los grupos.

En conjunto, los resultados indican que el proceso de remodelado miocárdico inverso en el ratón se pone en marcha de forma muy rápida tras la reducción del estrés hemodinámico, tal y como algunos autores han observado en la clínica de la EA, durante el seguimiento postquirúrgico de los pacientes tras el recambio valvular aórtico⁵⁵. Así, en el presente estudio durante la fase inicial (primera semana) se produjo una importante recuperación morfológica, estructural (en términos de expresión de genes de remodelado y fibrosis histológica) y funcional. Sin embargo, tal y como sucede en la clínica, la regresión posterior del remodelado tiene lugar de forma mucho más tórpida, e incluso la hipertrofia y la función sistólica longitudinal (MAPSE) no llegan a alcanzar la normalización completa a pesar del prolongado periodo (4 semanas) de seguimiento.

6. CONCLUSIONES

6. CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado innovaciones metodológicas en las técnicas de constricción del arco aórtico y posterior retirada de la misma para el estudio en ratones de modificaciones ecocardiográficas de los fenómenos implicados en el remodelado miocárdico secundario a la sobrecarga de presión y en su regresión (las modificaciones quirúrgicas fueron llevados a cabo por el Dr. Nistal y su equipo, pero está incluido porque todos los ratones estudiados fueron llevados a cabo mediante este procedimiento).

2. Ventajas de éste modelo quirúrgico respecto a las técnicas convencionales:

- a. Permite individualizar el grado de constricción en base a los datos morfométricos de la aorta en cada animal, mejorando la reproducibilidad de la constricción.
- b. Reduce la mortalidad quirúrgica secundaria a la oclusión completa de la aorta y a la rotura de la arteria.
- c. Facilita la retirada posterior de la constricción.
- d. No se requiere un entrenamiento quirúrgico altamente cualificado para llevar a cabo los procedimientos.

Los cambios ecocardiográficos morfo-funcionales en este modelo murino (C57/BL6) muestran paralelismo con los de los pacientes con estenosis aórtica, observándose hipertrofia ventricular concéntrica, acompañada de deterioro significativo de la función sistólica en los ejes corto (reflejada por la FEVI) y largo (reflejada por la MAPSE) y de la función diastólica reflejada por la relación E/e'. Tanto el diámetro telesistólico, como el diastólico, la masa cardiaca y la masa ajustada al peso, el grosor del septo y la pared posterior aumentaron después del CAT.

Tras la liberación de la constricción aórtica se produjo una drástica reducción del gradiente transcoartacional que permitió la puesta en marcha del proceso de regresión del remodelado ventricular. En términos morfo-funcionales, se produjo una recuperación completa de la pared posterior, del diámetro telesistólico, de la FEVI, de la masa cardiaca y del gradiente.

Al contrario, el grosor del septo interventricular, el diámetro telediastólico, la MAPSE, la relación E/e' y la relación entre la masa del ventrículo izquierdo ajustada al peso no llegaron a normalizarse transcurridas cuatro semanas.

Hay que destacar que los resultados de este estudio pueden haber estado influenciados por el bajo tamaño muestral.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Nkomo VT, Gardin JM, Skelton TN, Gottdiener JS, Scott CG, Enriquez-Sarano M. 2006. **Burden of valvular heart diseases: a population-based study.** *Lancet.* 368: 1005-1011.
- ² Dweck MR, Khaw HJ, Sng GK, Luo EL, Baird A, Williams MC, Makiello P, Mirsadraee S, Joshi NV, van Beek EJ, Boon NA, Rudd JH, Newby DE. 2013. **Aortic stenosis, atherosclerosis, and skeletal bone: is there a common link with calcification and inflammation?** *Eur Heart J.* 34: 1567-1574.
- ³ Maron BJ. 2009. **Distinguishing hypertrophic cardiomyopathy from athlete's heart physiological remodelling: clinical significance, diagnostic strategies and implications for preparticipation screening.** *Br J Sports Med.* 43: 649-656.
- ⁴ Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. 2011. **Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling.** *J Mol Cell Cardiol.* 51: 600-606.
- ⁵ Burchfield JS, Xie M, Hill JA. 2013. **Pathological ventricular remodeling: mechanisms: part 1 of 2.** *Circulation.* 128:388-400.
- ⁶ Dorn GW. 2007. **The fuzzy logic of physiological cardiac hypertrophy.** *Hypertension.* 49: 962-970.
- ⁷ Dobaczewski M, Chen W, Frangogiannis NG. 2011. **Transforming growth factor (TGF)- β signaling in cardiac remodeling.** *J Mol Cell Cardiol.* 51: 600-606.
- ⁸ Ganau A, Devereux R B, Roman MJ, et al. Patterns of left ventricular hypertrophy and geometric remodeling in essential hypertension. *J Am Coll Cardiol* 1992;19:1550-8.
- ⁹ Osler W. The principles and practice of medicine. New York: Appleton, 1892.
- ^{10A} Lorell BH, Carabello BA. 2000. **Left ventricular hypertrophy: Pathogenesis, detection and prognosis.** *Circulation.* 102: 470-479.
- ^{10B} Carabello BA. Is cardiac hypertrophy good or bad? The answer, of course, is yes. *JACC Cardiovasclmaging.* 2014;7:1081-1083.
- ¹¹ Maciver DH, Townsend M. 2008. **A novel mechanism of heart failure with normal ejection fraction.** *Heart.* 94: 446-449.
- ¹² Kong P, Christia P, Frangogiannis NG. 2014. **The pathogenesis of cardiac fibrosis.** *Cell Mol Life Sci.* 71: 549-574.
- ¹³ Tirziu D, Giordano FJ, Simons M. 2010. **Cell communications in the heart.** *Circulation.* 122: 928-937.
- ¹⁴ Liu Z, Yue S, Chen X, Kubin T, Braun T. 2010. **Regulation of cardiomyocyte polyploidy and multinucleation by CyclinG1.** *Circ Res.* 106: 1498-1506.

- ¹⁵Chien KR, Knowlton KU, Zhu H, Chien S. 1991. **Regulation of cardiac gene expression during myocardial growth and hypertrophy: molecular studies of an adaptive physiologic response.** *FASEB J.* 5: 3037-3046.
- ¹⁶Scheuer J, Buttrick P. 1987. **The cardiac hypertrophic responses to pathologic and physiologic loads.** *Circulation.* 75: 163-68.
- ¹⁷ Lee Y, Gustafsson AB. 2009. **Role of apoptosis in cardiovascular disease.** *Apoptosis.* 14: 536-548.
- ¹⁸ Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, Beer M, Gattenlöhner S, Voelker W, Ertl G, Strotmann JM. 2009. **Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis.** *Circulation* 120: 577-584.
- ¹⁹ Heymans S, Schroen B, Vermeersch P, Milting H, Gao F, Kassner A, Gillijns H, Herijgers P, Flameng W, Carmeliet P, Van de Werf F, Pinto YM, Janssens S. 2005. **Increased cardiac expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and tissue inhibitor of metalloproteinase-2 is related to cardiac fibrosis and dysfunction in the chronic pressure-overloaded human heart.** *Circulation.* 112: 1136-1144.
- ²⁰Givvimani S, Tyagi N, Sen U, Mishra PK, Qipshidze N, Munjal C, Vacek JC, Abe OA, Tyagi SC. 2010. **MMP-2/TIMP-2/TIMP-4 versus MMP-9/TIMP-3 in transition from compensatory hypertrophy and angiogenesis to decompensatory heart failure.** *Arch PhysiolBiochem.* 116: 63-72.
- ²¹Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. 2007. **Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis.** *Nat Med.* 13: 952-961.
- ²²Berk BC, Fujiwara K, Lehoux S. 2007. **ECM remodelling in hypertensive heart disease.** *J Clin Invest.* 117: 568-575.
- ²³Creemers EE, Pinto YM. 2011. **Molecular mechanisms that control interstitial fibrosis in the pressure-overloaded heart.** *Cardiovasc. Res.* 89 265-272.
- ²⁴ Fairbairn TA, Steadman CD, Mather AN, Motwani M, Blackman DJ, Plein S, McCann GP, Greenwood JP. 2013. **Assessment of valve haemodynamics, reverse ventricular remodelling and myocardial fibrosis following transcatheter aortic valve implantation compared to surgical aortic valve replacement: a cardiovascular magnetic resonance study.** *Heart.* 99:1185-1191.
- ²⁵Petrov G, Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Krabatsch T, Dunkel A, Dandel M, Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Becher E, Hampl H, Hetzer R. 2010. **Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women?** *Circulation.* 122: S23-28.

- ²⁶ Christakis GT, Joyner CD, Morgan CD, Fremes SE, Buth KJ, Sever JY, Rao V, Panagiotopoulos KP, Murphy PM, Goldman BS. 1996. **Left ventricular mass regression early after aortic valve replacement.** *Ann Thorac Surg.* 62(4):1084-1089.
- ²⁷ Biederman RW, Magovern JA, Grant SB, Williams RB, Yamrozik JA, Vido DA, Rathi VK, Rayarao G, Caruppanan K, Doyle M. 2011. **LV reverse remodeling imparted by aortic valve replacement for severe aortic stenosis; is it durable? A cardiovascular MRI study sponsored by the American Heart Association.** *J Cardiothoracic Surg.* 6:53.
- ²⁸ Lim E, Ali A, Theodorou P, Sousa I, Ashrafian H, Chamageorgakis T, Duncan A, Henein M, Diggle P, Pepper J. 2008. **Longitudinal study of the profile and predictors of left ventricular mass regression after stentless aortic valve replacement.** *Ann. Thorac. Surg.* 85:2026–2029.
- ²⁹ García R, Villar AV, Cobo M, Llano M, Martín-Durán R, Hurlé MA, Nistal JF. 2013. **Circulating levels of miR-133a predict the regression potential of left ventricular hypertrophy after valve replacement surgery in patients with aortic stenosis.** *J Am Heart Assoc.* 2(4).
- ³⁰ Esposito G, Rapacciuolo A, NagaPrasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. 2002. **Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress.** *Circulation.* 105: 85-92.
- ³¹ Krayenbuehl HP, Hess OM, Monrad ES, Schneider J, Mall G, Turina M. 1989. **Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement.** *Circulation.* 79: 744-755.
- ³² Rockman HA, Ross RS, Harris AN, Knowlton KU, Steinhilper ME, Field LJ, Ross J Jr, Chien KR. 1991. **Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an in vivo murine model of cardiac hypertrophy.** *Proc Natl Acad Sci USA.* 88: 8277-8281.
- ³³ Rosenhek R, Zilberszac R, Schemper M, Czerny M, Mundigler G, Graf S, Bergler-Klein J, Grimm M, Gabriel H, Maurer G. 2010. **Natural History of Very Severe Aortic Stenosis.** *Circulation.* 121: 151-156.
- ³⁴ Hill JA, Karimi M, Kutschke W, Davisson RL, Zimmerman K, Wang Z, Kerber RE, Weiss RM. 2000. **Cardiac hypertrophy is not a required compensatory response to short-term pressure overload.** *Circulation.* 101: 2863-2869.
- ³⁵ Petrov G, Regitz-Zagrosek V, Lehmkuhl E, Krabatsch T, Dunkel A, Dandel M, Dworatzek E, Mahmoodzadeh S, Schubert C, Becher E, Hampl H, Hetzer R. 2010. **Regression of myocardial hypertrophy after aortic valve replacement: faster in women?** *Circulation.* 122: S23-28.
- ³⁶ Ali A, Patel A, Ali Z, Abu-Omar Y, Saeed A, Athanasiou T, Pepper J. 2011. **Enhanced left ventricular mass regression after aortic valve replacement in patients with aortic**

stenosis is associated with improved long-term survival. *J Thorac Cardiovasc Surg.*142: 285-291.

³⁷deAlmeida AC, van Oort RJ, Wehrens XH. 2010. **Transverse aortic constriction in mice.** *J Vis Exp.* 38: 1729.

³⁸Lygate CA, Schneider JE, Hulbert K, ten Hove M, Sebag-Montefiore LM, Cassidy PJ, Clarke K, Neubauer S. 2006. **Serial high resolution 3D-MRI after aortic banding in mice: band internalization is a source of variability in the hypertrophic response.** *Basic Res Cardiol.* 101: 8-16.

³⁹Lygate CA, Schneider JE, Hulbert K, ten Hove M, Sebag-Montefiore LM, Cassidy PJ, Clarke K, Neubauer S. 2006. **Serial high resolution 3D-MRI after aortic banding in mice: band internalization is a source of variability in the hypertrophic response.** *Basic Res Cardiol.* 101: 8-16.

⁴⁰Bjørnstad JL, Skrbic B, Sjaastad I, Bjørnstad S, Christensen G, Tønnessen T. 2012. **A mouse model of reverse cardiac remodelling following banding-debanding of the ascending aorta.***Acta Physiol.* 205: 92-102.

⁴¹Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. 2005. **Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H8–H16.

⁴²Liu PP, Villarreal FJ, Garcia RA. 2014. **Dynamic changes in myocardial matrix and relevance to disease: translational perspectives.** *Circ Res.* 114:916-927.

⁴³Berenji K, Drazner MH, Rothermel BA, Hill JA. 2005. **Does load-induced ventricular hypertrophy progress to systolic heart failure?** *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 289: H8–H16.

⁴⁴Opie LH, Commerford PJ, Gersh BJ, Pfeffer MA. 2006. **Controversies in ventricular remodelling.** *Lancet.* 367(9507):356-367.

⁴⁵ Montalvo C, Villar AV, Merino D, García R, Ares M, Llano M, Cobo M, Hurlé MA, Nistal JF. 2012. **Androgens contribute to sex differences in myocardial remodeling under pressure overload by a mechanism involving TGF- β .** *PLoS One.* 7: e35635.

⁴⁶Krayenbuehl HP, Hess OM, Monrad ES, Schneider J, Mall G, Turina M. 1989. **Left ventricular myocardial structure in aortic valve disease before, intermediate, and late after aortic valve replacement.***Circulation.*79: 744-755.

⁴⁷Pibarot P, Dumesnil JG. 2010. **Longitudinal myocardial shortening in aortic stenosis: ready for prime time after 30 years of research?** *Heart.* 96: 95-96.

⁴⁸Maciver DH, Townsend M. 2008.**A novel mechanism of heart failure with normal ejection fraction.***Heart.* 94: 446-449.

⁴⁹ Lim E, Ali A, Theodorou P, Sousa I, Ashrafian H, Chamageorgakis T, Duncan A, Henein M, Diggle P, Pepper J. 2008. **Longitudinal study of the profile and predictors of left**

ventricular mass regression after stentless aortic valve replacement. *Ann. Thorac. Surg.* 85:2026–2029.

⁵⁰Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, Beer M, Gattenlöhner S, Voelker W, Ertl G, Strotmann JM. 2009. **Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis.** *Circulation* 120: 577-584.

⁵¹Weidemann F, Herrmann S, Störk S, Niemann M, Frantz S, Lange V, Beer M, Gattenlöhner S, Voelker W, Ertl G, Strotmann JM. 2009. **Impact of myocardial fibrosis in patients with symptomatic severe aortic stenosis.** *Circulation* 120: 577-584.

⁵²Zybach-Benz RE, Aeschbacher BC, Schwerzmann M. 2006. **Impact of left ventricular hypertrophy late after aortic valve replacement for aortic stenosis on cardiovascular morbidity and mortality.** *Int J Cardiol.* 109: 41-47.

⁵³ Hu K, Liu D, Herrmann S, Niemann M, Gaudron PD, Voelker W, Ertl G, Bijmens B, Weidemann F. 2013. **Clinical implication of mitral annular plane systolic excursion for patients with cardiovascular disease.** *Eur Heart J Cardiovasc Imaging.* 14:205-212.

⁵⁴Gao XM, Kiriazis H, Moore XL, Feng XH, Sheppard K, Dart A, Du XJ. 2005. **Regression of pressure overload-induced left ventricular hypertrophy in mice.** *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 288: H2702-H2707.

⁵⁵ Christakis GT, Joyner CD, Morgan CD, Fremes SE, Buth KJ, Sever JY, Rao V, Panagiotopoulos KP, Murphy PM, Goldman BS. 1996. **Left ventricular mass regression early after aortic valve replacement.** *Ann Thorac Surg.* 62(4):1084-1089.

8. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento al Dr. Nistal y a la Dra. Hurlé, directores de mi Trabajo Fin de Grado, sin ellos el resultado de todo esto habría sido muy diferente. Por vuestra constante disponibilidad, por vuestra ayuda para orientar el trabajo, por vuestras ideas y correcciones, muchas gracias.

A mis padres y a mi hermano, por mostrarme siempre todo su apoyo, sus palabras de ánimo y por su confianza.

9. ANEXOS

IMPRESO DE INFORMACIÓN AL PACIENTE Y CONSENTIMIENTO INFORMADO PARA ESTUDIO DE INVESTIGACIÓN MÉDICA

Solicitamos su participación en este estudio.

Título: “Papel de la adiponectina y su relación con TGF- β en el remodelado miocárdico inducido por la sobrecarga de presión en la estenosis aórtica y en su regresión postquirúrgica” (Referencia 2012.090)

Investigador principal del proyecto y médico de referencia y responsable de la obtención de las muestras:

Dr. Juan Francisco Nistal Herrera, Médico Adjunto de Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander (Tel.: 942.202.536).

Información general del estudio

La investigación en Medicina es fundamental para avanzar en el conocimiento, prevención, diagnóstico y tratamiento de las enfermedades. Los médicos e investigadores del Servicio de Cirugía Cardiovascular del Hospital “Marqués de Valdecilla” y del Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina de Santander, hemos puesto en marcha un proyecto de investigación en el que estudiamos los mecanismos moleculares por los que el corazón aumenta el espesor de sus paredes en ciertas enfermedades. Solicitamos su colaboración para la realización de este estudio. Este estudio tiene una duración prevista de 10 años y se prevé reclutar 100 pacientes.

La hipertrofia, término con el que se denomina a este aumento de grosor de las paredes, se acompaña de un aumento de peso del corazón y tiene inicialmente una misión compensadora, destinada a permitir que siga pasando sangre, en volumen suficiente, a través de la válvula de salida del corazón (válvula aórtica) que abre mal. Se trata de un fenómeno que se desarrolla a lo largo de mucho tiempo y que se acentúa a medida que la válvula va cerrándose más y más. Aunque, inicialmente, la hipertrofia es útil pues permite mantener dentro de lo normal la cantidad de sangre que bombea el corazón, a partir de cierto punto se convierte en un problema en sí misma, porque el aumento de espesor de las paredes no es armónico y su riego sanguíneo no crece paralelamente al aumento de peso, lo que puede generar problemas graves para el paciente. Por otra parte, la hipertrofia no aparece en igual medida en todos los pacientes que tienen estrecha la válvula aórtica, ni tampoco desaparece en igual medida en los que son operados para cambiarles la válvula aórtica enferma.

Si comprendiéramos mejor cómo y por qué se produce la hipertrofia de las paredes del corazón podríamos:

1. Desarrollar tratamientos que nos permitirían limitar este fenómeno hasta el nivel más beneficioso para los pacientes con la válvula aórtica estrecha pero que todavía no necesitan ser operados.
2. Evitar que se produzca una hipertrofia muy severa que sabemos aumenta el riesgo de la operación cuando llega el momento de realizarla.
3. Facilitar el adelgazamiento de las paredes tras la operación, pues sabemos que los riesgos asociados a la hipertrofia no desaparecen inmediatamente después de que el paciente es operado, sino que van disminuyendo a medida que el corazón adelgaza.
4. Tratar a ciertos pacientes en los que las paredes del corazón se engruesan de manera espontánea, aunque la válvula aórtica sea normal, y para los que, en la actualidad, no disponemos de ningún tratamiento que ataque la causa de la enfermedad.

¿Qué me supone participar en el estudio y qué riesgos podría tener?

Para este estudio precisamos obtener de los pacientes **muestras de sangre** antes de ser operados, a los pocos (6-8) días y a los 4 y 12 meses después de la intervención. Las extracciones de estas muestras de sangre se harán coincidir con la analítica de rutina del paciente de forma que se le eviten molestias o pinchazos innecesarios. Las extracciones de sangre no suponen ningún riesgo para su salud ya que forman parte del tratamiento habitual de su enfermedad.

También nos es necesario tomar, durante la operación que se le va a realizar, dos pequeñas **muestras del músculo de su corazón**. Una de estas muestras procede de un pequeño fragmento que se quita como parte del procedimiento normal de conexión del paciente a la máquina corazón-pulmón utilizada para la intervención. En otras palabras, se trata de tejido que normalmente se elimina. La segunda muestra procede de la cara externa del ventrículo izquierdo, la parte del corazón cuyas paredes se han engrosado, y se recoge durante la parte central de la intervención con una aguja especial de biopsia (aguja tru-cut). Se trata de una muestra muy pequeña (0,1 gramos). La recogida de esta muestra es, en términos generales, segura y bien tolerada ya que se realiza con control visual directo, aunque en un pequeño porcentaje de casos (menor del 1%) pueden aparecer complicaciones del tipo de la perforación cardíaca, lesión coronaria o hemorragia.

El propósito de las muestras de sangre y de músculo cardíaco es determinar en ellas moléculas de las que sabemos que podrían jugar un papel importante en el desarrollo del corazón y en el aumento de espesor de sus paredes, ya sea este espontáneo o por la aparición de una dificultad para el vaciado cardíaco.

La tercera fuente de datos para nuestra investigación es el estudio de la evolución del grosor de las paredes de su corazón. Para ello es necesario realizar un estudio con **ecocardiografía transtorácica** antes de la operación, a los pocos (6-8) días y a los 4 y 12 meses. Estos estudios no son invasivos (no hay que pinchar o poner medicamentos al paciente) ni especialmente molestos, no suponen ningún riesgo y forman parte de los controles rutinarios que se realizan a los pacientes tras este tipo de operaciones.

Tanto los datos obtenidos de su Historia Clínica como sus muestras recibirán un código que no permitirá identificarlos como suyos salvo por el investigador principal. La manipulación y el análisis de los datos obtenidos durante el estudio se harán manteniendo en todo momento la confidencialidad acerca de la identidad de los pacientes de acuerdo con la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal. Su identidad permanecerá confidencial y los datos no podrán ser relacionados con usted aunque los resultados del estudio sean publicados en revistas científicas.

En el periodo de 10 años que durará el estudio, cualquier sub-estudio que se quiera llevar a cabo y que implique el uso de las muestras de la colección del estudio principal será evaluado por un Comité Ético de Investigación Clínica. El paciente tiene derecho a conocer en qué sub-estudios han sido utilizadas sus muestras contactando con el investigador principal del estudio.

Sus muestras serán almacenadas en el Departamento de Fisiología y Farmacología de la Facultad de Medicina. La colección de muestras se encuentra inscrita en el Registro Nacional de Biobancos (ref. C.000843). Una vez finalizado el estudio, si existiera muestra sobrante será destruida. No se proporcionarán sus muestras a terceros. Si usted desea retirarse del estudio y que su muestra sea destruida, sólo tiene que contactar con el investigador principal y solicitarlo.

Con fecha 25 de octubre de 2013, el Comité Ético de Investigación Clínica de Cantabria ha aprobado la realización de este estudio (acta 32/2013).

Su participación en este estudio es voluntaria, de tal forma que usted puede decidir no participar y también puede retirarse en cualquier momento del desarrollo del estudio, sin que esa decisión afecte en ningún sentido la atención que usted recibe de sus médicos.

Beneficios de su participación en el estudio

Este estudio no va a repercutir directa e inmediatamente sobre su enfermedad. Sin embargo, puede tener un enorme valor para futuros pacientes, gracias al avance científico en el diseño de nuevos tratamientos.

Usted no recibirá ningún tipo de compensación económica o de cualquier otro tipo por su participación.

La donación de muestras para investigación es voluntaria y altruista. Su único beneficio es el que corresponde al avance de la medicina en beneficio de la sociedad, y el saber que ha colaborado en este proceso.

Consentimiento Informado

He sido informado/a de que mis datos personales serán protegidos de acuerdo con lo que dispone la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal, reguladora de esta materia y no serán usados sin mi consentimiento previo.

Entiendo que la información que se obtenga de los análisis que se efectuarán en mis muestras no aportará beneficios directos sobre la evolución de mi enfermedad.

He leído en su totalidad este impreso del que se me ha explicado, además, su contenido.

Comprendo que mi participación es voluntaria y altruista.

Comprendo que puedo retirarme del estudio:

Cuando quiera
Sin tener que dar explicaciones
Sin que esto repercuta en mis cuidados médicos

Presto libremente mi conformidad para participar en el estudio, donando sangre y tejido.

En Santander, a

Fdo. El paciente Da.....:

D.N.I. número

Nombre y firma del médico que da la información:

Dr. Juan Francisco Nistal Herrera

REVOCACIÓN DEL CONSENTIMIENTO

Yo,, revoco el consentimiento de participación en el proceso, arriba firmado y solicito que mi muestra sea destruida.

Firma y Fecha de la revocación: