
Estandarización del modelo langendorff de corazón aislado para evaluar los daños inducidos por isquemia-reperfusión

Mero, Aldahir

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
Ciudad de Panamá, Panamá
aldahirmero_20@hotmail.com

Guerrero, Estela

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
Ciudad de Panamá, Panamá
ORCID: 0000-0002-0029-1827

Diaz, Maricelis

Centro de investigaciones Psicofarmacológicas, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá. Ciudad de Panamá, Panamá
maricselis@hotmail.com

Morales, Abdy

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
Ciudad de Panamá, Panamá
moba245@gmail.com

Morán-Pinzón, Juan

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
Ciudad de Panamá, Panamá
coljamp@gmail.com

Hernandez, Xenia

Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad de Panamá
Ciudad de Panamá, Panamá
xeniagiselle12@gmail.com

Abstract

The ischemia-reperfusion model is an experimental pathway to reproduce the characteristics of an acute cardiac ischemic event. Our aim was to validate the Langendorff isolated rat heart model. The hearts were harvested and connected to a perfusion system to assess

tissue viability, and we performed two perfusion rate protocols: 10.5 and 12.0 mL/min. On the other hand, the ischemia induction was assessment by perfusion suppressing or oxygen deprivation in the perfused solution. Cardiac parameters were obtained at 30 minutes, just before ischemia was induced (suspension of perfusion or oxygen deprivation). These parameters were also obtained at 70 and 120 minutes of the experiment. In all cases, a control group was used, where perfusion and oxygenation were kept continuous. For the determination infarct area (percentage), we found that this value was approximately 5% for both controls. In suspension-induced ischemia group by of perfusion at 10.5 mL/min rate was 22% meanwhile 38% was observed at 12 mL/min rate. When the ischemia was induced by oxygen deprivation, we observed that at 10.5 and 12 mL/min perfusion rate, the infarct areas was 44% and 58%, respectively. We conclude that tissue viability is more stable at a perfusion rate of 10.5 mL/min, and that ischemia is more reliably when oxygenation is suppressed.

Keywords: Standardization, ischemia, reperfusion, Langendorff, infarct area.

Resumen

El modelo de isquemia-reperfusión representa una vía experimental para reproducir las características de un evento isquémico cardiaco agudo. Nuestro objetivo era validar el modelo Langendorff en corazón aislado de rata. Extrajimos el corazón y lo conectamos a un sistema de perfusión para evaluar la viabilidad del tejido, en donde modificamos la velocidad de perfusión (10.5 y 12.0 mL/min) y por otra parte, la inducción de la isquemia, que se realizó mediante la suspensión de la perfusión o la privación del oxígeno en la solución perfundida. Los parámetros cardiacos controles se obtuvieron justo antes de generar la isquemia y los 70 y 120 minutos de iniciada la perfusión. En todos los casos, mantuvimos un grupo control donde la perfusión fue continua, igual que la oxigenación del tejido cardiaco. En la determinación del % de área de infarto se encontró que este valor fue de aproximadamente 5% para ambos controles. En la isquemia inducida por la suspensión de la perfusión la velocidad de 10.5 fue de 22% y un 38% en la velocidad de 12 mL/min. Cuando la isquemia fue inducida por privación de oxígeno los grupos de 10.5 y 12 ml/min indujeron un 44% y 58%, respectivamente. Logramos concluir que la viabilidad del tejido es más estable cuando se perfunde a una velocidad de 10.5 mL/min, y que la isquemia se alcanza con mayor fiabilidad cuando se interrumpe de la oxigenación del tejido.

Palabras claves: Estandarización, isquemia, reperfusion, Langendorff, área de infarto

1. INTRODUCCIÓN

Podemos denominar al método de Langendorff de corazón aislado, como la perfusión de las arterias coronarias de un corazón por una solución nutritiva y oxigenada que fluye retrogradamente desde la aorta [1]. Este método fue establecido en 1897 por Oscar Langendorff y sus experimentos se llevaron a cabo principalmente utilizando corazones de gatos, pero también de perros y conejos. [2]. Con el tiempo el método de Langendorff de corazón aislado se ha convertido en el modelo estándar para la enseñanza y la investigación cardiovascular básica, realizando aportes sobre temas como la regulación de la función cardíaca, flujo coronario y el metabolismo cardíaco [3].

En este modelo, el corazón extraído de un animal anestesiado, se canula y conecta a un aparato de perfusión. El sistema permanece conectado a un bomba que perfunde la solución nutritiva, burbujeada continuamente con carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), desde un reservorio, pasando a través de tubos termostatizados a 37 ° C, hasta el tejido aislado [1].

A partir de este modelo obtenemos parámetros fisiológicos, morfológicos y bioquímicos, que pueden ser modificados a través de intervenciones farmacológicas. Adicionalmente, el modelo de Langendorff permite fácilmente derivaciones protocolares para reproducir procesos isquémicos y arritmias, lo que también permite valorar las acciones de fármacos y diferentes compuestos sobre estas patologías. (4).

Entre las desventajas de este método cuentan que la preparación requiere habilidad y delicadeza debido que el corazón es vulnerable a las contusiones. [2].

2. MÉTODO

A. Modelo animal

El estudio utilizó ratas Wistar albinas con un peso entre de 250 a 300 g, provenientes del Bioterio del Instituto de Investigaciones Científicas de Alta Tecnología (INDICASAT-AIP). Los animales se mantuvieron a una temperatura de 21 ± 2°C y con un ciclo normal de 12 horas de luz/oscuridad. Este estudio fue realizado siguiendo las normas de manejo de animales recogida en la guía titulada “Guide for the care and use of laboratory animals” y el protocolo fue aprobado por el Comité de Bioética de la Universidad de Panamá (Nota No CBUP/153/2020).

B. Extirpación del corazón

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (50 mg/kg) y anticoagulados con heparina sódica (500 U/kg). Una vez comprobado el plano anestésico en el animal, abrimos la cavidad abdominal realizando una incisión transversal. El diafragma se seccionó y se hicieron incisiones laterales a lo largo de la caja torácica. El corazón se separó, haciendo

un solo corte con las tijeras a través de este punto y del tejido conectivo que fija al corazón. Seguidamente, el corazón se colocó en un vaso que contenía solución amortiguadora de Krebs-Henseleit helada. Por último, la aorta del corazón se canuló y se conectó al sistema de perfusión. [5].

C. Modificaciones protocolares para controlar viabilidad e inducir la isquemia

Entra las variables modificadas están la velocidad de perfusión, que se ha relacionado con la viabilidad del corazón. Con base a estudios previos (datos no publicados), seleccionamos las velocidades de 10.5 y 12 ml/min para ser empleadas en la perfusión del corazón aislado. Considerando ambas velocidades, establecimos grupos controles y grupos en los que se induce isquemia reperusión. La inducción de la isquemia, que se relaciona con el daño asociado a la isquemia reperusión, se produjo mediante la suspensión de la perfusión (SP) o por la privación de oxígeno (DO) en la solución perfundida.

En todos los protocolos se mantiene un grupo control, donde los corazones son perfundidos de forma continua y con solución oxigenada durante 120 minutos, mientras que, el grupo isquemia reperusión, se estabiliza perfundiéndolo durante los primeros 30 min, seguido por un periodo de isquemia por SP o DO de 30 min., para proceder al periodo de reperusión durante una hora.

D. Determinación de los parámetros cardiacos

El registro de los datos fue por medio de un balón de látex, insertado en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral y conectándolo a un transductor de presión. Para todos los corazones, cambios en la presión desarrollada en el ventrículo izquierdo (PDVI) y la frecuencia cardíaca (FC) se registraron continuamente utilizando un sistema de adquisición de datos PowerLab v8. Además, se logró calcular otros valores de la funcionalidad cardiaca como lo son el MaxdP/dt (indicador de la contracción miocárdica), MindP/dt (indicador de la relajación miocárdica) y el doble producto que nos indica el trabajo cardiaco total. [6].

E. Determinaciones histológicas del corazón

Una vez concluida la fase de I/R, los corazones fueron sometidos a un proceso de fijación y tinción. El corazón se congeló y obtuvimos secciones desde el ápice hacia la base del corazón, las cuales fueron tratadas con TTC al 1% durante 15-20 minutos y se fijaron con formaldehído al 10% durante 20 min. Las secciones teñidas se fotografiaron bajo estereoscopio y, utilizando el software Image J®, se trazaron las zonas de infarto y se calcularon las áreas respectivas en términos de píxeles [7].

3. RESULTADOS

A. Determinación de los parámetros cardiacos

Cuando el tejido fue perfundido a la velocidad de 10,5 mL/min, observamos que la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI), se mantuvo constante a lo largo del experimento con valores aproximados de 80,00 mmHg. Sin embargo, la perfusión a una velocidad de 12 mL/min genera un estrés que empobrece el desarrollo de la PDVI y observamos que esta se reduce en el tiempo y pasa de un valor control de 79,01 a 61,14 mmHg a los 120 minutos. En contraste, la viabilidad del tejido se mantiene cuando se perfunde a 10,5 mL/min (79,06 a 82,36 mmHg control y 120 minutos, respectivamente). Autores como Liu y col. (2018) reportan valores de PDVI similares a los obtenidos en nuestro estudio [8]. Al valorar el impacto que sobre este parámetro poseen las intervenciones para generar I/R, observamos que la DO redujo la PDVI. En este grupo el valor control, antes de inducir la isquemia, fue de $95,71 \pm 11,87$ mmHg y disminuyó hasta $47,52 \pm 10,65$ mmHg al minuto 70 cuando la perfusión se realizó a 10,5 mL/min. (Fig 1A).

El doble producto (DP) se encuentra disminuido en los procesos de isquemia reperfusión [9] y esto quedó demostrado en la DO del corazón perfundido a la velocidad de 10.5mL/min, en donde, al minuto 70, disminuyó hasta un valor de 10361 ± 2260 , en comparación con el control que mantiene un valor de 22391 ± 2286 (Fig 1C). En la figura 1D se representan los resultados del doble productos para corazones sometidos a una perfusión a 12 mL/min. Evaluando este parámetro, volvemos a observar como el estrés inducido por una elevada velocidad de perfusión genera una reducción del trabajo cardiaco en el tiempo, enmascarando el efecto de la inducción de la isquemia por DO (Fig 2). Autores como Liu y col (2018) reportan valores de DP parecidos a los nuestros [8].

Durante la isquemia se genera una disfunción y muerte de los cardiomiocitos empobreciendo la contractilidad, parámetro que en nuestro estudio es valorado a través de la determinación del Max dP/dt. Con la perfusion de 10,5 y 12 mL/min, al minuto 70 y en los protocolos de DO, se refleja una reducción significativa del Max dP/dt, hasta valores de $1580,71 \pm 365,48$ y $1488,26 \pm 318,38$ mmHg/s, respectivamente, frente a los valores promedios desarrollados en el control (2978 ± 262 mmHg/s). Este hallazgo a todas luces es un dato indicativo del proceso isquémico (Fig 2A y 2B). (Fig 3). Hallazgos similares han sido publicados por otros autores [10].

La relajación miocardica es un parámetro relacionado al Min dP/dt, que al igual que el Max dP/dt se afectan en los procesos isquemico cardiacos. En nuestro estudio, quedo registrado una reducción de este parámetro al minuto 70 en el protocolo de DO, alcanzando

un valor de $-969,97 \pm 180,59$ mm Hg/s. mientras que el valor del control fue de -1831 ± 190 mm Hg/s.(Fig 2C y 2D) Se han publicado valores de Min dP/dt parecidos a los obtenidos por nosotros [11].

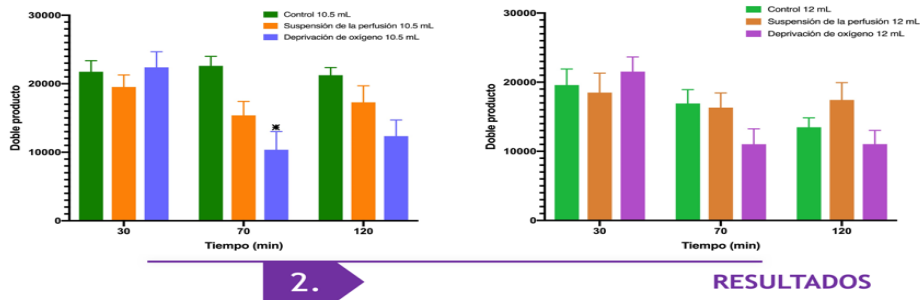
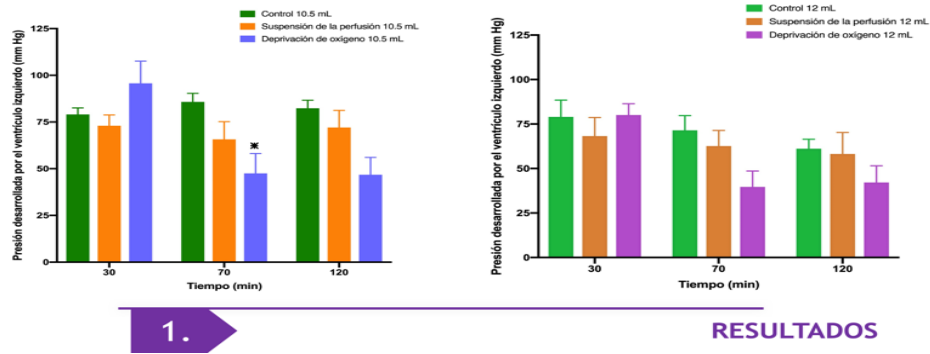
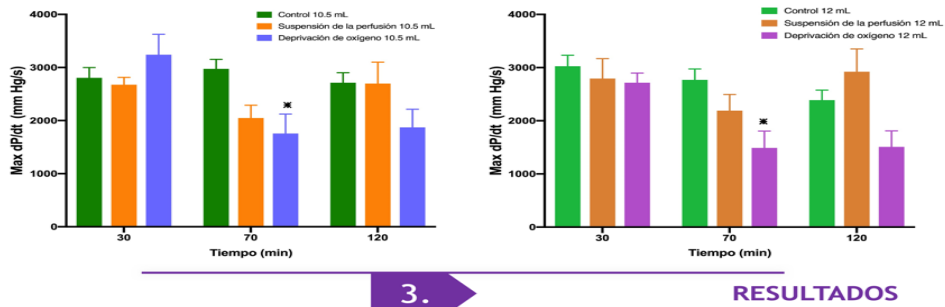
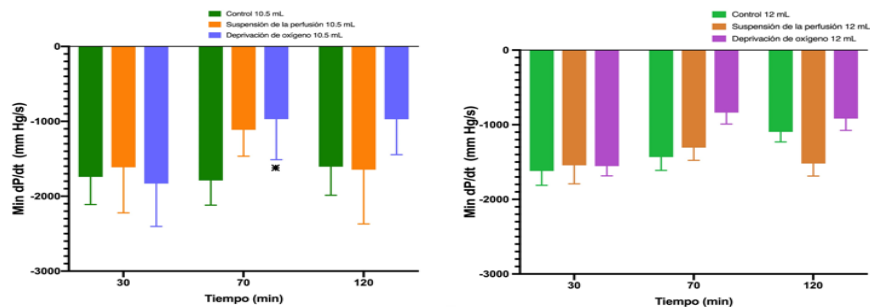


Figura 1. Efecto del tipo de inducción de la isquemia sobre la presión desarrollada por el ventriculo izquierdo en corazones perfundidos a 10,5 mL/min (A) y 12,0 mL/min (B); y sobre el doble producto cuando la velocidad de perfusion fue de 10,5 mL/min (C) y 12,0 mL/min (D) * p<0,05 frente al control.





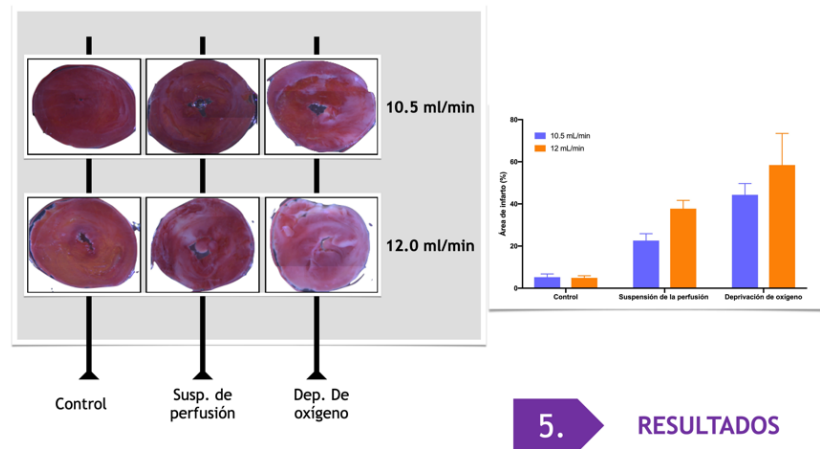
4

RESULTADOS

Figura 2. Efecto del tipo de inducción de la isquemia sobre el Max dP/dt en corazones perfundidos a 10,5m L/min (A) y 12,0 ml/min (B); y sobre el Min dP/dt cuando la velocidad de perfusion fue de 10,5 mL/min (C) y 12,0 mL/min (D) * p<0,05 frente al control.

B. Determinaciones histológicas del corazón

Los corazones controles evidenciaron un 6% de área de infarto. Cuando se inducía la isquemia por SP en la velocidad de 10,5 mL/min se generó un 22% y un 38% de área de infarto en la velocidad de 12 mL/min. En cambio el protocolo de DO los grupos de 10,5 y 12 indujeron un 44% y 58% de area de infarto, respectivamente. .(Fig 3)



5.

RESULTADOS

Figura 3. Cortes histológicos teñidos con TTC para determinar el área de infarto

3. CONCLUSIONES

Se ha estandarizado una vía experimental válida para reproducir las características de un evento isquémico cardiaco agudo mediante el método de corazón aislado de Langendorff, la cual se podría traducir en una herramienta que funcione para búsqueda de nueva terapias para el tratamiento de esta enfermedad. Este estudio concluye que, bajo las condiciones de nuestro laboratorio, cuando se perfunde a una velocidad de 10,5 mL/min la viabilidad del corazón se mantiene durante el tiempo del experimento. Además, la privación del oxígeno al tejido cardiaco logra inducir una isquemia significativa que se refleja en un 44% de área de infarto obtenida con este protocolo. La puesta a punto de esta técnica nos ha permitido establecer una nueva línea de investigación de Ciencias Biomédicas con énfasis en la Farmacología cardiovascular, que buscará aportar información que se extrapole al manejo y terapéutica de las cardiopatías isquémicas en nuestro país.

Bibliografía

- [1] O. Langendorff, "Untersuchungen am überlebenden Säugethierherzen," *Pflüger, Arch. Für Die Gesamte Physiol. Des Menschen Und Der Thiere*, vol. 61, no. 6, pp. 291–232, 1895, doi: 10.1007/bf01812150.
- [2] H. G. Zimmer, "Modifications of the isolated frog heart preparation in Carl Ludwig's Leipzig Physiological Institute: Relevance for cardiovascular research," *Can. J. Cardiol.*, vol. 16, no. 1, 2000.
- [3] M. Skrzypiec-Spring, B. Grotthus, A. Szelag, and R. Schulz, "Isolated heart perfusion according to Langendorff-Still viable in the new millennium," *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*, vol. 55, no. 2, pp. 113–126, 2007, doi: 10.1016/j.vascn.2006.05.006.
- [4] H. J. Döring, "The isolated perfused heart according to Langendorff technique--function--application," *Physiol. Bohemoslov.*, vol. 39, no. 6, p. 481–504, 1990, [Online]. Available: <http://europepmc.org/abstract/MED/2103635>.
- [5] R. M. Bell, M. M. Mocanu, and D. M. Yellon, "Retrograde heart perfusion: The Langendorff technique of isolated heart perfusion," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 50, no. 6, pp. 940–950, 2011, doi: 10.1016/j.yjmcc.2011.02.018.
- [6] D. J. Herr, E. S. Aune, and D. R. Menick, "Induction and assessment of ischemia-reperfusion injury in langendorffperfused rat hearts," *J. Vis. Exp.*, vol. 2015, no. 101, pp. 1–7, 2015, doi: 10.3791/52908.
- [7] W. D. Ito et al., "Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide," *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 29, no. 8, pp. 2169–2175, 1997, doi: 10.1006/jmcc.1997.0456.
- [8] Q. Liu et al., "Hydromorphone postconditioning protects isolated rat heart against ischemia-reperfusion injury via activating P13K/Akt/eNOS signaling," *Cardiovasc. Ther.*, vol. 36, no. 6, pp. 1–9, 2018, doi: 10.1111/1755-5922.12481.
- [9] Z. Tang et al., "Taxifolin protects rat against myocardial ischemia/reperfusion injury by modulating the mitochondrial apoptosis pathway," *PeerJ*, vol. 2019, no. 1, pp. 1–17, 2019, doi: 10.7717/peerj.6383.
- [10] J. Xiao, Z. P. Ke, Y. Shi, Q. Zeng, and Z. Cao, "The cardioprotective effect of thymoquinone on ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart via regulation of apoptosis and autophagy," *J. Cell. Biochem.*, vol. 119, no. 9, pp. 7212–7217, 2018, doi: 10.1002/jcb.26878.
- [11] A. M. Petkovic et al., "The Effects of Potassium Cyanide on the Functional Recovery of Isolated Rat Hearts after Ischemia and Reperfusion: The Role of Oxidative Stress," *Oxid. Med. Cell. Longev.*, vol. 2018, 2018, doi: 10.1155/2018/5979721.

Agradecimientos

Al Sistema Nacional de Investigación (Investigador Nacional/ Estela Guerrero), al financiamiento recibido por la Vicerrectoría de la Universidad de Panamá (VIP-01-07-07-2021-03) y la Secretaría Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación (PAAC-NI-2020-II-29).

Autorización y Licencia CC

Los autores autorizan a APANAC XVIII a publicar el artículo en las actas de la conferencia en Acceso Abierto (Open Access) en diversos formatos digitales (PDF, HTML, EPUB) e integrarlos en diversas plataformas online como repositorios y bases de datos bajo la licencia CC:

Attribution-NonCommercial-ShareAlike 4.0 International (CC BY-NC-SA 4.0) <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>.

Ni APANAC XVIII ni los editores son responsables ni del contenido ni de las implicaciones de lo expresado en el artículo.