

Medicina cardiovascular traslacional (I)

Modelos animales de enfermedad cardiovascular

Francisco J. Chorro, Luis Such-Belenguer y Vicente López-Merino

Servicio de Cardiología. Hospital Clínico Universitario de Valencia. Departamentos de Medicina y Fisiología de la Universidad de Valencia. Valencia. España.

La utilización de modelos animales para el estudio de enfermedades cardiovasculares ha contribuido sustancialmente al progreso en el conocimiento de su patogenia y ha permitido el desarrollo de técnicas diagnósticas y la validación de procedimientos preventivos y terapéuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas. Las diferencias existentes entre la enfermedad humana y la inducida experimentalmente, tanto en los mecanismos de regulación genética como en los factores que determinan la función cardíaca y vascular, son sus principales limitaciones. Entre los modelos y las preparaciones empleados en la investigación cardiovascular, se encuentran los basados en la utilización de células aisladas y tejidos y estructuras en baños de órganos. El sistema de Langendorff permite el estudio directo del corazón aislado y perfundido aplicando diversas técnicas tanto sin someter al corazón a un trabajo como con una carga controlada. En mamíferos pequeños existen varios tipos de modelos de alteraciones cardiovasculares que ocurren por mutaciones genéticas espontáneas o son inducidos mediante modificaciones específicas del genoma. Entre los procedimientos utilizados se encuentran los basados en la transferencia genética con provocación controlada de mutaciones que dan lugar a la expresión de alteraciones asociadas al desarrollo de gran número de enfermedades cardiovasculares. Animales de mayor tamaño se emplean en modelos en los que se considera relevante que estén presentes los mecanismos de regulación y homeostasis del organismo.

Palabras clave: Investigación cardiovascular. Investigación básica. Modelos animales.

Animal Models of Cardiovascular Disease

The use of animal models to study cardiovascular disease has made a substantial contribution to increasing our understanding of disease pathogenesis, has led to the development of diagnostic techniques, and has made it possible to verify the effectiveness of different preventative and therapeutic approaches, whether pharmacological or interventional. The main limitations stem from differences between human and experimentally induced pathology, in terms of both genetic regulatory mechanisms and factors that influence cardiovascular function. The experimental models and preparations used in cardiovascular research include those based on isolated cells or tissues or structures immersed in organ baths. The Langendorff system enables isolated perfused hearts to be studied directly under conditions of either no load or controlled loading. In small mammals, a number of models have been developed of cardiovascular conditions that result from spontaneous genetic mutations or, alternatively, that may be induced by specific genomic modification. One of the techniques employed is gene transfer, which can involve the controlled induction of mutations that result in the expression of abnormalities associated with the development of a broad range of different types of cardiovascular disease. Larger animals are used in experimental models in which it is important that physiological regulatory and homeostatic mechanisms are present.

Key words: Cardiovascular research. Preclinical research. Animal models.

Full English text available from: www.revespcardiol.org

CONCEPTOS GENERALES

En el ámbito de las enfermedades cardiovasculares, la utilización de modelos animales ha contribui-

do sustancialmente al progreso en el conocimiento de su patogenia y ha permitido el desarrollo de técnicas diagnósticas y la validación de procedimientos preventivos y terapéuticos, tanto farmacológicos como intervencionistas¹⁻⁸.

Aunque los modelos animales nunca se asemejan completamente a la realidad observada en la clínica, sí que permiten obtener información directa de determinados fenómenos, con un control adecuado de diversas variables y utilizando procedimientos precisos, con frecuencia invasivos y difícilmente aplicables en estudios clínicos. La información ob-

Este trabajo ha sido realizado en parte con las ayudas a la investigación del Ministerio de Sanidad PI06/0758 (Proyecto FIS) y RD06/0003/0010 (RETIC: REDINSCOR).

Correspondencia: Dr. F.J. Chorro.
Servicio de Cardiología. Hospital Clínico Universitario.
Avda. Blasco Ibañez, 17. 46010 Valencia. España.
Correo electrónico: Francisco.J.Chorro@uv.es

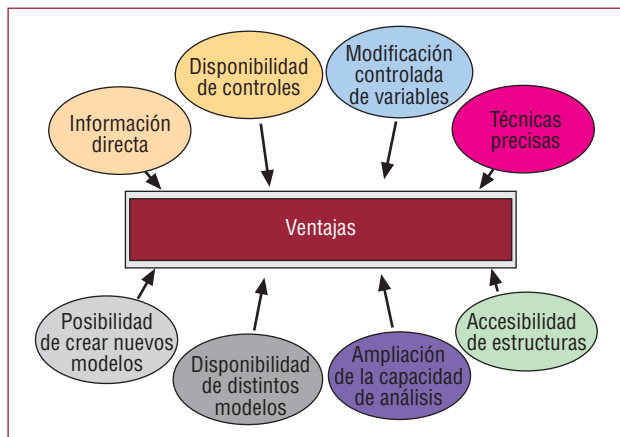


Fig. 1. Principales ventajas de los modelos animales utilizados en el estudio de las enfermedades cardiovasculares.

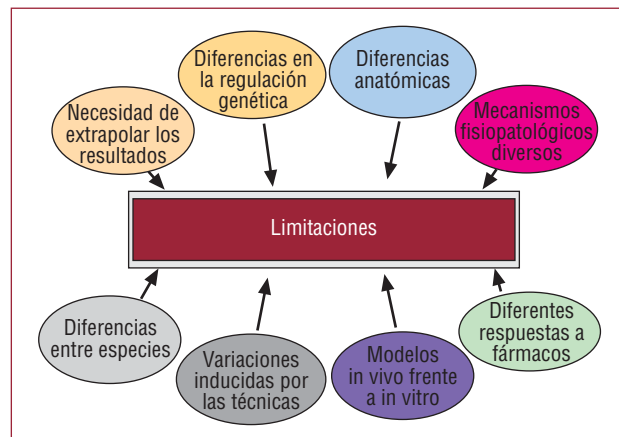


Fig. 2. Limitaciones de los modelos animales utilizados en la investigación sobre las enfermedades cardiovasculares.

tenida a partir de los modelos animales requiere el análisis de su aplicabilidad a la patología humana, y por ello la información obtenida en ambos contextos debe ser complementaria.

En la actualidad la experimentación animal es un requisito legal encaminado a garantizar la seguridad antes de introducir fármacos y diversos procedimientos diagnósticos y terapéuticos en la clínica. Por otra parte, existe una normativa y unos procedimientos de regulación de la experimentación cuya finalidad es evitar el sufrimiento de los animales durante el desarrollo de los estudios experimentales^{9,10}. La implementación de los medios necesarios para cumplir los requisitos establecidos y de los procedimientos de aprobación y control de los protocolos experimentales es preceptiva. Facilitar el desarrollo y la aceptación de métodos alternativos para demostrar determinadas hipótesis fisiopatológicas o terapéuticas, la comercialización de las técnicas relacionadas (p. ej., la producción *in vitro* de sustancias obtenidas a partir de modelos animales) y la incentivación de su utilización son medidas que pueden ayudar a desarrollar las condiciones de la experimentación con modelos animales.

Las principales ventajas de este tipo de modelos son la posibilidad de utilizar controles y de fijar las condiciones que podrían modificar los resultados al variar uno o varios factores (fig. 1). Entre las limitaciones se encuentran las diferencias existentes entre la enfermedad humana y la inducida experimentalmente como, entre otras, las diferencias en los mecanismos de regulación genética o en los factores que determinan las funciones cardiaca y vascular¹ (fig. 2). Especies filogenéticamente distintas pueden presentar diferencias anatómicas importantes, pueden responder a mecanismos fisiopatológicos diferentes y los tratamientos farmacológicos pueden actuar de modo diverso. Por estos motivos, la extrapolación de los resultados de la investigación

básica a la patología humana siempre se debe efectuar con cautela.

Por otra parte, la distancia entre el laboratorio y la clínica en ocasiones implica que no se perciba con claridad la utilidad de los resultados de un determinado estudio. Para acortar esa distancia hay que desarrollar los eslabones intermedios que acerquen los resultados de un descubrimiento básico al quehacer diario encaminado a prevenir, diagnosticar o tratar las enfermedades cardiovasculares. También hay que transmitir al científico básico las inquietudes surgidas de la práctica clínica, los problemas no resueltos o las limitaciones observadas, para señalar las lagunas existentes y procurar orientar los esfuerzos de la investigación básica hacia la resolución de estos problemas. La comunicación y la discusión científica en el seno de equipos multidisciplinarios es necesaria para mejorar los resultados de la investigación que en última instancia debe encaminarse hacia el mejor control de las enfermedades y hacia la promoción de la salud de nuestra sociedad.

TIPOS DE MODELOS ANIMALES

La aplicación de procedimientos quirúrgicos, la administración controlada de fármacos y sustancias, la selección de mutaciones genéticas espontáneas y, más recientemente, las alteraciones genéticas dirigidas mediante procedimientos de recombinación han permitido disponer de un gran número de modelos para el estudio de las enfermedades cardiovasculares. Los sustratos anatómicos y fisiopatológicos pueden diferir según las especies animales utilizadas, y los diferentes modelos pueden presentar respuestas diversas ante las modificaciones inducidas experimentalmente¹¹.

La elección adecuada del modelo experimental debe basarse fundamentalmente en la finalidad del estudio, es decir, hay que elegir aquel que mejor

se adapte a los objetivos de la investigación, aunque en esta decisión influyen diversos factores, entre ellos las técnicas y los métodos necesarios para obtener la información, su disponibilidad y accesibilidad, las condiciones necesarias para la estabulación, el número de experimentos, el tipo de estudio, agudo o crónico, y en este caso, su duración.

Entre los modelos y las preparaciones utilizados en la investigación cardiovascular se encuentran los que se exponen a continuación.

Células aisladas y cultivos celulares

Existen distintas técnicas para aislar miocitos cardiacos de distintas especies animales. Los procedimientos utilizados consisten, básicamente, en aislar el corazón, perfundirlo con soluciones enzimáticas sin calcio para degradar la matriz de colágeno que interconecta los miocitos y extraer las células^{4,12}. Una vez comprobada la viabilidad de las células, pueden aplicarse diversas técnicas de estudio, por ejemplo técnicas electrofisiológicas como las de *patch-clamp*, que permiten analizar las corrientes iónicas o los cambios de voltaje transmembrana (fig. 3).

El desarrollo de las técnicas implicadas en los cultivos celulares conjuntamente con las de la ingeniería genética ha ampliado las posibilidades de análisis de diversos fenómenos^{5,13-17}. Así, mediante las técnicas de transfección, que consisten en la introducción de material genético (ADN recombinante) en el núcleo de diversas células de mamíferos, se ha hecho posible modificar su expresión proteínica y, con ello, sus funciones. Entre los estudios en que se utilizan estas técnicas, se encuentran los dirigidos a analizar el comportamiento de los canales iónicos implicados en la cinética del potencial de acción transmembrana tanto en condiciones basales como bajo la acción de diversos fármacos¹⁴⁻¹⁶.

En otros ámbitos, como el de la medicina regenerativa y el de la ingeniería tisular, se están desarrollando múltiples líneas de investigación encaminadas a conocer y controlar el proceso de diferenciación celular. Entre sus posibles aplicaciones están el desarrollo de estructuras tisulares de potencial aplicación clínica¹⁸.

Preparaciones en baño de órganos y tejidos

El estudio de determinadas estructuras de diversas especies animales, como músculos papilares, fibras de Purkinje, láminas de tejido miocárdico o vasos arteriales y venosos, aporta información en diversos campos que abarcan desde la mecánica cardiaca o vascular hasta la electrofisiología.

Las preparaciones de músculo papilar obtenidas a partir de animales de pequeño tamaño se basan en la extracción del músculo para situarlo en una cá-

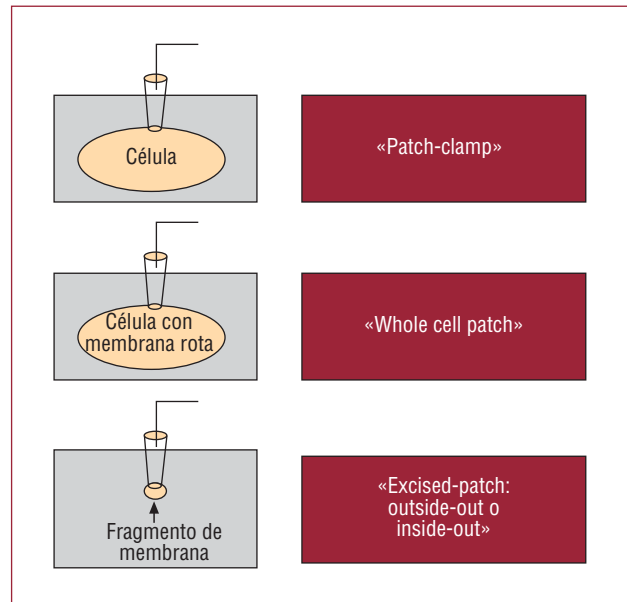


Fig. 3. Esquema sobre la utilización de la técnica de patch-clamp en células aisladas con la membrana íntegra (parte superior), tras perforar la membrana (parte intermedia) o utilizando fragmentos de membrana celular (parte inferior).

mara en la que fluye líquido nutricio a una temperatura constante y que permite que los extremos del músculo puedan fijarse a electrodos de estimulación y transductores de fuerza. En estas preparaciones se puede estudiar diversas propiedades mecánicas, como la relación fuerza-frecuencia, las respuestas a distintos tipos de sobrecarga y los mecanismos que las regulan, así como los efectos de diversas manipulaciones farmacológicas o no farmacológicas^{19,20}. La utilización de microelectrodos o electrodos extracelulares permite estudiar las propiedades electrofisiológicas de los miocitos y analizar los efectos de los fármacos²¹, por ejemplo, su capacidad de prolongar la repolarización a distintas frecuencias¹². La utilización de estas técnicas en modelos modificados genéticamente amplía la capacidad de análisis de los procesos fisiopatológicos implicados en diversas enfermedades del ser humano.

También en baño de órganos pueden estudiarse láminas de miocardio, anillos vasculares o diversas preparaciones que incluyen al nodo sinusal, al nodo auriculoventricular o las fibras de Purkinje. La accesibilidad de los elementos que constituyen la preparación permite obtener información relevante sobre su comportamiento²²⁻²⁴. Uno de los inconvenientes de estas preparaciones de tejidos y órganos reside en la dificultad que pueda haber para la difusión adecuada del oxígeno, los solutos o los fármacos y las sustancias estudiadas hasta sus capas más internas^{25,26}. No hay esta dificultad en las preparaciones de miocitos aislados¹². También puede obviarse utilizando procedimientos experimenta-

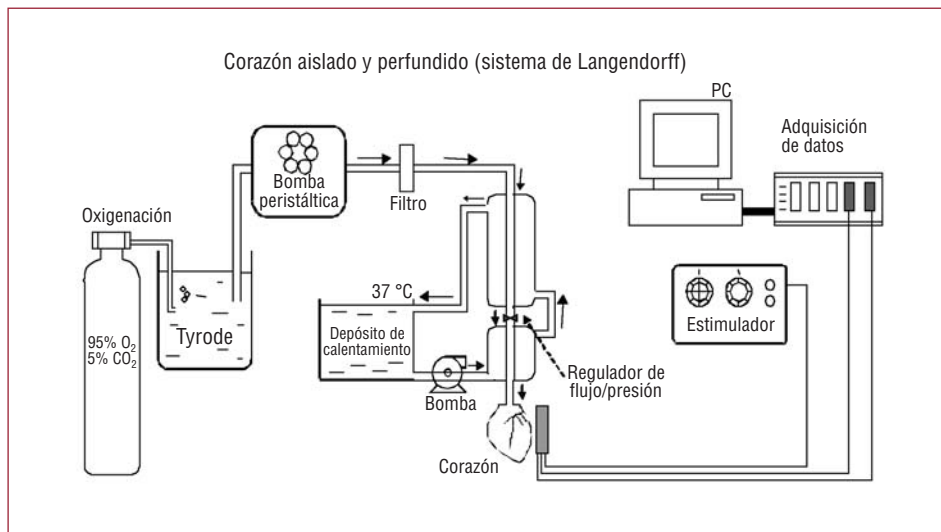


Fig. 4. Esquema del sistema de Langendorff utilizado para el estudio de preparaciones de corazón aislado y perfundido de distintas especies animales.

les más complejos²⁷, en los que se aísla la parte del corazón que se va a estudiar (p. ej., la aurícula derecha con el nodo sinusal o el músculo papilar unido al septo interventricular) y se irriga con sangre procedente del sistema arterial de otro animal (circulación cruzada) o con líquido nutritivo, a través de las arterias coronarias que suplen la circulación a estos tejidos (p. ej., la arteria del nodo sinusal o la arteria septal anterior).

Sistema de Langendorff (corazón aislado)

El método de Langendorff para estudiar corazones aislados fue descrito a finales del siglo XIX. Permite el estudio de los fenómenos sin influencias neurohumorales y en condiciones controladas, accediendo directamente a las zonas de interés (fig. 4). La perfusión miocárdica se efectúa a través de las arterias coronarias que se rellenan retrógradamente. En la preparación clásica, el corazón se contrae sin realizar trabajo, aunque existen variantes (*working heart*) en las que, mediante diversos dispositivos, el corazón se contrae con una determinada carga (balón intraventricular relleno de líquido, perfusión desde la aurícula izquierda con conexión de la aorta a un sistema que regula la resistencia al flujo, etc.)^{2,28}. La isquemia miocárdica puede producirse tras la ligadura de una arteria coronaria o reduciendo la oxigenación del líquido nutritivo. Se utilizan corazones de distintas especies que abarcan desde la rata hasta animales grandes. Tras la extracción del corazón, se canula la aorta seccionada en su porción ascendente y por ella se suministra el líquido nutritivo que, desde los senos de Valsalva y por las coronarias, irriga el miocardio y es drenado al exterior por el sistema venoso cardiaco. La pre-

sión de perfusión (entre 60 y 80 mmHg) o el flujo (entre 1,5 y 2,5 ml/g) se mantienen constantes y la oxigenación del líquido nutritivo se efectúa con una mezcla de O₂ (95%) y CO₂ (5%). Este líquido contiene las proporciones adecuadas de electrolitos y glucosa (solución de Krebs-Henseleit, solución de Tyrode, etc.) y puede complementarse con albúmina o sangre, especialmente cuando se utilizan corazones de especies grandes. El pH se mantiene entre 7,35 y 7,4 y la temperatura, habitualmente, entre 36 y 37 °C.

En el corazón aislado y perfundido pueden emplearse electrodos múltiples extracelulares, tanto epicárdicos como endocárdicos o intramiocárdicos, para efectuar estudios cartográficos de la actividad eléctrica cardíaca y analizar las propiedades electrofisiológicas básicas (refractariedad, conducción, automatismo), sus modificaciones mediante fármacos, agentes físicos, estímulos eléctricos u otros procedimientos, así como los mecanismos de inicio, perpetuación o cese de las arritmias cardíacas²⁹⁻³³ (figs. 5-8). Si el corazón aislado se encuentra sumergido en suero salino o en el propio líquido nutritivo, puede registrarse el equivalente a las derivaciones electrocardiográficas y analizar sus variaciones ante distintas maniobras o fármacos. La utilización de electrodos de succión o de presión permite obtener los llamados potenciales de acción monofásicos, que guardan relación con las características del potencial de acción transmembrana³⁴. La utilización de sistemas ópticos basados en el registro de los cambios de luminiscencia de un marcador en función de las variaciones del potencial de membrana (fig. 9) ha hecho posible acercarse al estudio de las arritmias cardíacas disponiendo de información adicional sobre la duración del potencial de acción³⁵⁻³⁷.

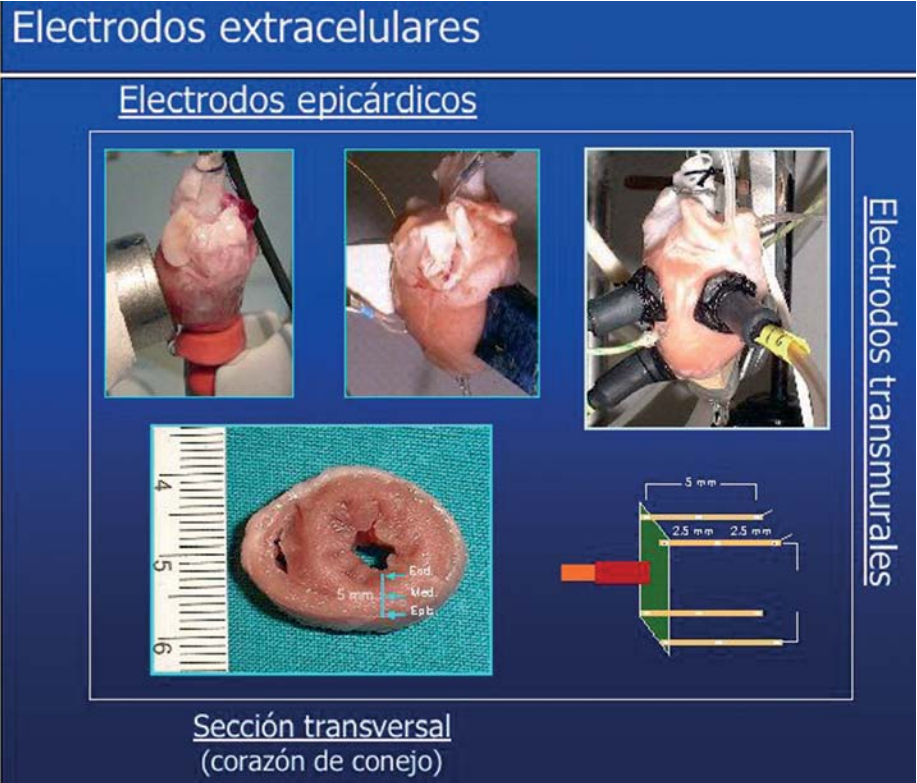


Fig. 5. Diversos tipos de electrodos extracelulares utilizados para el registro de los procesos de activación miocárdica en el corazón aislado y perfundido de conejo.



Fig. 6. Dispositivos utilizados para efectuar estudios cartográficos de la actividad eléctrica cardiaca introduciendo variaciones térmicas localizadas en el corazón aislado y perfundido de conejo.

Mamíferos de pequeño tamaño

Entre las características que hay que tener presentes al elegir y utilizar modelos basados en animales pequeños, se encuentran las propias de cada especie; así, por ejemplo, en el cobaya la circulación colateral del árbol coronario está muy desarrollada

y por eso la ligadura de una de las ramas principales no permite reproducir de manera estable situaciones de isquemia miocárdica. Entre otras ventajas relacionadas con la utilización de este tipo de animales, la alta tasa de reproducción (importante en la selección de casos con determinadas características genéticas en un tiempo adecuado) y la vida me-

Cartografía óptica de la actividad eléctrica cardiaca

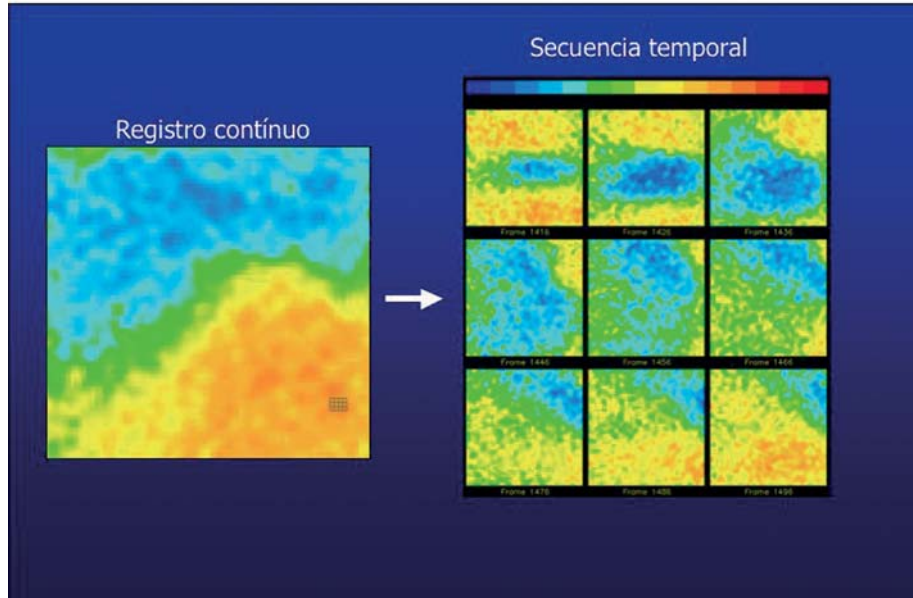


Fig. 9. Imágenes obtenidas con un sistema de cartografía óptica durante un episodio de fibrilación ventricular mediante el que se registran los cambios de luminiscencia de un marcador en función de las variaciones del potencial de membrana.

rren espontáneamente o son inducidos experimentalmente³. Las posibilidades de estudio se amplían al disponer de un número mayor mediante crianza selectiva. Los modelos de ratones basados en alteraciones genéticas espontáneas y el desarrollo de cepas con alteraciones poligénicas o de un único gen han facilitado el estudio de los mecanismos de diversos procesos fisiopatológicos y sus determinantes genéticos. Por otra parte, los avances tecnológicos han permitido originar, en animales como el ratón, modelos con alteraciones en sitios específicos del genoma. Estos procedimientos abarcan desde los no transgénicos, basados en la inducción de mutaciones y en el desarrollo de cepas obtenidas de diferentes tipos de embriones, hasta los originados por transferencia genética, que se iniciaron hace más de 25 años y han dado lugar a los procedimientos de provocación controlada de mutaciones con expresión de alteraciones relacionadas con el desarrollo de gran número de enfermedades^{3,5,7,38,39}.

Los modelos transgénicos se basan en la introducción de ADN en el genoma de un determinado animal, hecho que ha sido posible tras el desarrollo tecnológico empleado en producir cultivos celulares, manipular embriones y recombinar el ADN. Entre las técnicas directamente relacionadas se encuentran la inyección pronuclear, la transgénesis viral y la recombinación homóloga. En el primer caso se efectúa una microinyección de ADN en el pronúcleo del cigoto y en el segundo caso se utilizan vectores virales en la introducción de genes para que se expresen o alteren el genoma. Las técnicas recom-

binantes se utilizan para introducir una alteración definida en un sitio específico del genoma. En estos casos la modificación genética se efectúa de manera dirigida modificando genes de modo específico. Así, en los denominados ratones *knockout* (inactivación genética mediante recombinación homóloga), se inactivan genes específicos para conseguir información sobre su función (permiten estudiar enfermedades originadas por mutaciones en las que hay pérdida total o parcial de formación de las proteínas mediante las que se expresa el gen)³. Por otra parte, en los denominados ratones *knockin* se reemplazan o se mutan determinados genes y se analizan sus patrones de expresión y los efectos de estas variaciones que conllevan cambios en una función^{3,39}.

El procedimiento de formación de estos modelos se basa, en primer lugar, en la manipulación de células madre embrionarias. Éstas se obtienen de la masa de células internas de blastocistos machos tras la fertilización del huevo y, una vez cultivadas, se efectúan mutaciones específicas *in vitro*. Estas células son pluripotentes y son utilizadas para generar los ratones con las mutaciones elegidas. Las mutaciones se efectúan introduciendo en la célula embrionaria el material genético construido previamente. Para ello se utiliza el procedimiento de electroporación mediante choque eléctrico, tras el cual una pequeña proporción de las células sometidas al proceso incorporan las modificaciones diseñadas y construidas con anterioridad. Tras multiplicar las células embrionarias con la mutación (heterocigóticas), éstas son inyectadas en blastocistos almace-

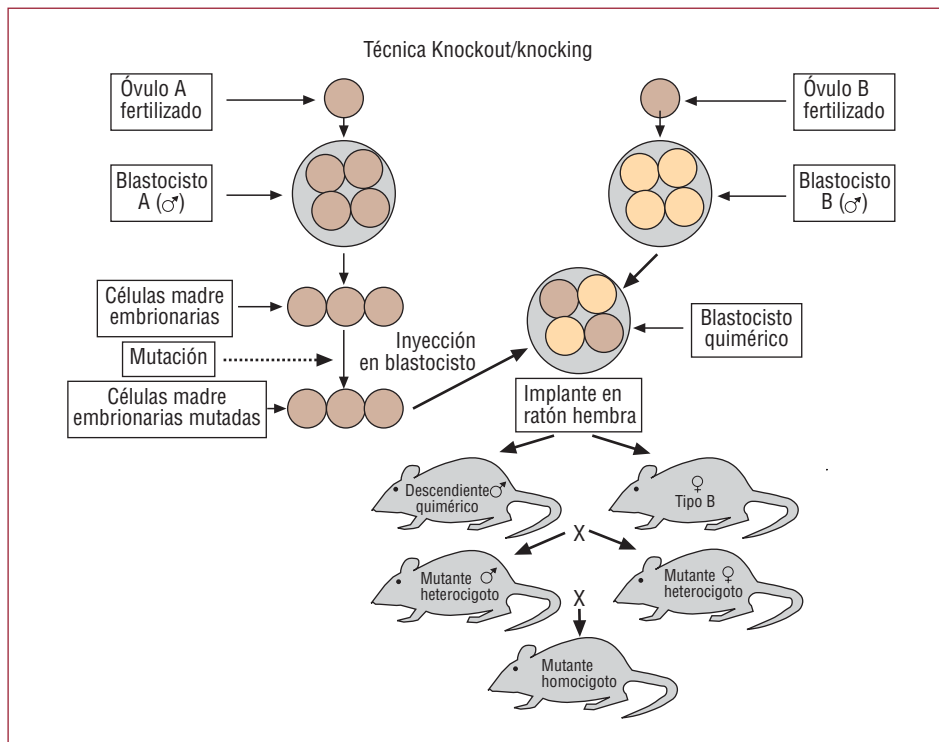


Fig. 10. Procedimientos de modificación genética mediante los que se inactivan, se reemplazan o se mutan genes específicos. Se basan en primer lugar en la manipulación de células madre embrionarias y en las que se efectúan mutaciones específicas introduciendo material genético construido previamente. Tras multiplicar las células embrionarias con la mutación (heterocigóticas), se las inyecta en blastocistos que después se implantan en ratones hembras. Tras el cruce de los descendientes quiméricos heterocigotos se obtienen los ratones mutantes homocigotos.

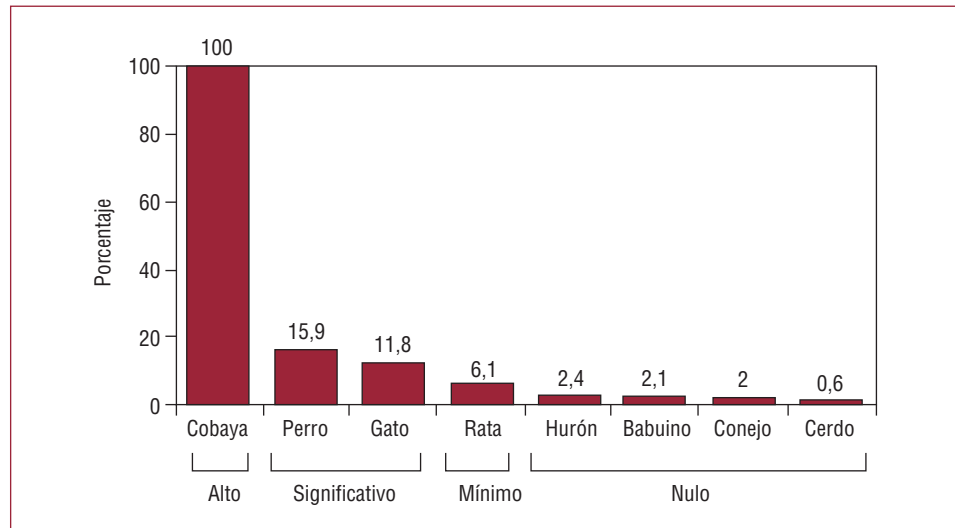
nados previamente que después son implantados en ratones hembras pseudopreñadas. Sus descendientes quiméricos, que en parte se derivan de las células embrionarias modificadas y en parte de los blastocistos donantes, son identificados y, tras el cruce de los heterocigotos, se obtienen los ratones mutantes homocigotos (fig. 10).

En modelos transgénicos de roedores se ha modificado el metabolismo lipídico aproximándolo al del ser humano para producir modelos de aterosclerosis^{40,41}. También se han desarrollado modelos de insuficiencia cardíaca⁴²⁻⁴⁴, de diversos tipos de miocardiopatías⁷ o de arritmias determinadas genéticamente que permiten identificar las formas de expresión y analizar los genes relacionados^{2,5-6,38,39}. Así se estudian modelos de síndromes arrítmicos con características comunes a las encontradas en el ser humano. Por ejemplo, en relación con la fibrilación auricular, algunos de los modelos transgénicos se caracterizan por el desarrollo de fibrosis auricular o se trata de modelos *knockout* de la conexina 40, en los que hay alteraciones de la conducción. También se han creado modelos en los que se alteran las propiedades electrofisiológicas miocárdicas acortando la repolarización, tal como sucede en aquellos en que se sobreexpresa la proteína Kir2.1 alterando la corriente rectificadora de potasio IK1⁶. En relación con la cardiopatía isquémica se han desarrollado diversos modelos, entre otros los utilizados para estudiar el preconditionamiento isquémico y su relación con la conexina 43 y las *gap junctions*^{45,46}.

Mamíferos de mayor tamaño

Animales grandes se emplean en modelos en los que se considera relevante que estén presentes los mecanismos de regulación y homeostasis. Diversos aspectos pueden dificultar la interpretación de los resultados y hay que tenerlos presentes al plantear y diseñar los estudios². Existen diferencias entre especies; por ejemplo, en las características de la circulación coronaria, que en el cerdo es terminal, sin anastomosis entre las ramas vasculares, mientras que en el modelo canino existen colaterales (fig. 11). Así, la ligadura coronaria en el cerdo se asemeja a la oclusión coronaria en sujetos sin circulación colateral, pero se aleja de la de los pacientes que la han desarrollado espontáneamente o en el contexto de la cardiopatía isquémica crónica. Por otra parte, también hay diferencias entre especies en la importancia relativa de las distintas ramas del árbol coronario, en función de la extensión del territorio que irrigan. En relación con el sistema de conducción cardíaco, la distribución de las fibras de Purkinje no es uniforme; en el cerdo es transmural, abarcando desde el endocardio hasta el epicardio², mientras que en el perro o en el gato es predominantemente subendocárdica, por lo que se asemeja más a la del ser humano y por este motivo presentan una secuencia de activación ventricular más parecida. Existen diferencias entre el proceso de repolarización miocárdica de los modelos caninos y el de los seres humanos, diferencias que dificultan la

Fig. 11. Características de la circulación colateral en distintas especies animales (modificado de: Maxwell MP, Hearse DJ, Yellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res.* 1987;21:737-46).



comparación de los cambios ocurridos en el intervalo QT o en la onda T en distintas circunstancias. Otras diferencias entre especies son las derivadas de la expresión de los canales iónicos que regulan las características de los potenciales de acción de las células miocárdicas, ya que en algunas especies, como las ratas, no se expresan los canales IKr, pero sí que ocurre en conejos, cobayas y perros, y este hecho condiciona la posibilidad de análisis de algunos fenómenos como las arritmias relacionadas con la prolongación del intervalo QT.

Otro de los aspectos que hay que considerar al utilizar estos modelos experimentales es la selección de la anestesia adecuada, ya que sus efectos pueden modificar los fenómenos estudiados². El pentobarbital tiene efectos parasimpaticolíticos e influye en la distribución del flujo sanguíneo intramiocárdico, mientras que la combinación de morfina y alfacloralosa modifica en menor medida el control autónomo del sistema cardiovascular, aunque prolonga la repolarización ventricular. Los anestésicos de acción breve pueden ser de ayuda en los momentos iniciales de determinados protocolos en los que después se mantiene la anestesia con otros fármacos. El régimen de administración de los agentes anestésicos puede influir en la estabilidad del grado de sedación y hay que tener en cuenta algunos de sus efectos, como la depresión de la contractilidad o las modificaciones del tono autónomo (pentobarbital, propofol). Determinados anestésicos inhalatorios pueden modificar las propiedades electrofisiológicas de las células miocárdicas y tener efectos proarrítmicos (halotano, enflurano).

Los experimentos crónicos abarcan desde los basados en una intervención aguda tras la que se observan los efectos producidos por ella en presencia o ausencia de determinados fármacos (como las modificaciones en el grado de fibrosis miocárdica

tras provocar una sobrecarga auricular por disfunción valvular) hasta aquellos que requieren la utilización de equipos especiales con los que se monitorizan las variables estudiadas mediante distintos procedimientos, como la telemetría o la transmisión por cable, y que, por lo tanto, requieren el implante de diversos sistemas (tabla 1).

MODELOS ANIMALES EN DISTINTAS ÁREAS DE INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR

Aterosclerosis

Se ha estudiado un amplio número de procesos relacionados con la aterosclerosis en modelos animales⁴⁰. Se han utilizado conejos alimentados con dietas ricas en colesterol para analizar la formación y la evolución de las lesiones, así como su regresión al modificar la dieta⁴⁷ o al añadir tratamientos específicos⁴⁸⁻⁵¹, hechos también comprobados en otras especies animales⁵²⁻⁵⁶. En roedores, la aplicación de técnicas transgénicas ha permitido crear modelos con alteraciones del metabolismo lipídico presentes en el ser humano⁵⁷, por ejemplo, mediante la manipulación de la expresión de la apoproteína E⁵⁸. En estos ratones la transferencia genética con vectores que contienen apoA-IcDNA para aumentar la concentración del colesterol de las lipoproteínas de alta densidad (cHDL) ha dado lugar a la remisión de las lesiones⁵⁹, que también se ha conseguido aumentando de manera prolongada la expresión de apolipoproteína E mediante vectores virales^{60,61}. El trasplante de segmentos de aorta que contienen lesiones ateroscleróticas desde modelos de ratones transgénicos con niveles altos de apolipoproteína B, bajas concentraciones de cHDL y alimentación con dietas hiperlipídicas a receptores normales permite el estudio de los procesos implicados en la estabilización y

TABLA 1. Principales ventajas y limitaciones de los modelos animales y preparaciones utilizados en investigación cardiovascular

Modelo o preparación	Ventajas y aportaciones	Desventajas y limitaciones
Células aisladas, cultivos celulares	Posibilidad de utilizar técnicas específicas (patch-clamp, microelectrodos, etc.) Modificación de la expresión de proteínas mediante métodos de transfección Ingeniería tisular Estudios moleculares	Procesos de extracción o aislamiento celular complejos Necesidad de controlar la viabilidad y la estabilidad de las células una vez aisladas Requerimientos de tecnología compleja
Preparaciones en baño de órganos (músculo papilar, fibras de Purkinje, estructuras cardíacas, vasos, etc.)	Diversidad de preparaciones y técnicas (estudios de mecánica, electrofisiología, fármacos...) Accesibilidad de las estructuras estudiadas Disponibilidad de modelos modificados genéticamente	Difusión inadecuada de O ₂ , nutrientes o fármacos Estabilidad de las preparaciones Complejidad de las técnicas
Corazón aislado y perfundido (sistema de Langendorff convencional)	Facilidad técnica Accesibilidad de las estructuras Ausencia de interferencias neurohumorales -Controles adecuados	No permite el estudio de respuestas integradas en el organismo completo Estabilidad de las preparaciones
Corazón aislado y perfundido tipo <i>working heart</i>	Permite estudios de la mecánica cardíaca Control de la carga y de las condiciones de trabajo	Complejidad técnica Estabilidad de las preparaciones
Mamíferos de pequeño tamaño	Alta tasa de reproducción que facilita los procedimientos de selección Vida media corta que facilita el análisis de los resultados de las modificaciones experimentales Posibilidad de efectuar modificaciones genéticas Disponibilidad de técnicas de estudio basadas en la imagen	Diferencias entre especies Requerimientos técnicos especiales (tamaño reducido) Modificación de las condiciones hemodinámicas en los modelos estudiados con apertura del tórax Modificación de los resultados por el efecto de los anestésicos
Mamíferos de mayor tamaño	Mecanismos de regulación neurohumoral y de homeostasis activos Diversidad de técnicas invasivas y no invasivas Accesibilidad de las estructuras en modelos agudos con apertura del tórax Disponibilidad de sistemas de monitorización en modelos crónicos Disponibilidad de técnicas de estudio basadas en la imagen	Diferencias entre especies Modificaciones producidas por las técnicas quirúrgicas Modificación de los resultados por el efecto de los anestésicos

remisión de las placas^{62,63}. Fenómenos como el de la trombogénesis y la función plaquetaria también se analizan en modelos animales⁶⁴, en los que la utilización de cámaras de perfusión especialmente diseñadas⁶⁵ permite analizar los mecanismos implicados en la trombosis mural.

Isquemia-reperfusión e infarto de miocardio

Diversas líneas de investigación en modelos animales se han dirigido a analizar la posibilidad de limitar el tamaño del infarto. Hace algunas décadas se plantearon estudios sobre fármacos y sustancias que pudieran enlentecer o evitar el desarrollo de la necrosis^{66,67}, con resultados limitados y no reprodu-

cibles⁴⁶. Sin embargo, los modelos experimentales de oclusión coronaria proporcionaron datos precisos sobre el desarrollo de la necrosis⁶⁸⁻⁷³. Tras reconocerse el papel relevante de la reperfusión para salvar miocardio isquémico, se comenzó a analizar también su participación en el desarrollo de la lesión. En modelos animales se han identificado mecanismos patológicos asociados a la sobrecarga de calcio, la acción de los radicales de oxígeno libres y la acción de células inflamatorias con implicación de leucocitos, moléculas de adhesión y citocinas, entre otros factores⁷⁴. También se ha analizado el daño mitocondrial⁷⁵ identificando alteraciones de la membrana (formación de poros) que la hacen permeable a diversas sustancias y iones y determinan

la muerte celular. La inhibición de la apertura de estos poros podría asociarse a la cardioprotección durante la isquemia-reperusión.

Otro de los temas en el que se ha avanzado es el del preconditionamiento y el poscondicionamiento isquémico^{76,77}. Existen protocolos experimentales con intervenciones que limitan el tamaño del infarto de manera reproducible debido al preconditionamiento; por ejemplo, en modelos caninos, efectuando varios periodos de oclusión de la arteria coronaria descendente anterior de 5 min, separados por lapsos similares en los que se restablece la perfusión y tras los cuales se efectúa una oclusión duradera. El poscondicionamiento también reduce el tamaño del infarto; por ejemplo, efectuando varios periodos intermitentes de oclusión coronaria de corta duración (30 s) al principio de la reperusión tras una oclusión duradera. Ambos fenómenos han sido estudiados en distintas especies animales y se ha analizado la evolución temporal del efecto protector y los mecanismos moleculares implicados, que siguen siendo objeto de investigación^{46,78-84}.

Miocardiopatías

La miocardiopatía dilatada, que se caracteriza por la dilatación ventricular y el deterioro de la función sistólica, es la más frecuente y una de las causas importantes de insuficiencia cardiaca. Entre los estudios dirigidos a analizar su etiopatogenia, se encuentran los centrados en las formas familiares, relacionadas con mecanismos genéticos que dan lugar a diversas alteraciones, como en la actina alfa cardiaca, la cadena pesada de la betamiosina o la troponina T.

Se han desarrollado modelos en animales pequeños como ratas, ratones y hámsters para el estudio de la patogenia^{7,42,85,86}. En cepas de hámster con miocardiopatía dilatada espontánea (BIO14.6, CHF 147) se ha descrito un desarrollo progresivo de miolisis, hipertrofia, dilatación e insuficiencia cardiaca congestiva, con cambios en la expresión enzimática que conducen a un aumento del estrés oxidativo (cepa TO-2). En modelos modificados genéticamente^{42,86} se han inducido miocardiopatías dilatadas que incluyen mutaciones en los genes que regulan el citoesqueleto (ausencia de genes para distrofina y utrofina) y desarrollan distrofias musculares y miocardiopatías. También se han originado modelos *knockout* de la proteína LIM muscular que desarrollan miocardiopatías dilatadas. La sobreexpresión de proteínas G da lugar a miocardiopatías en las que intervienen los mecanismos de apoptosis. Existen mutaciones mitocondriales con déficit en la fosforilación oxidativa que cursan con miocardiopatías dilatadas. En modelos con animales grandes, más cercanos a la clínica, se analizan aspectos rela-

cionados con la mecánica, las alteraciones moleculares y metabólicas y las adaptaciones neurohumorales inadecuadas.

Insuficiencia cardiaca

En el terreno de la insuficiencia cardiaca, el análisis de sus causas y la traslación de los conocimientos existentes desde los estudios experimentales a la práctica clínica, tanto en el terreno de la protección miocárdica como en el del remodelado ventricular, son otro de los retos que tiene ante sí el investigador que estudia las enfermedades cardiovasculares.

En el desarrollo de la insuficiencia cardiaca intervienen tanto el corazón como la circulación periférica y los complejos mecanismos neurohumorales que regulan los procesos hemodinámicos. Existen cepas de animales pequeños en los que la insuficiencia cardiaca ha aparecido debido a alteraciones genéticas espontáneas. También se utilizan animales en los que se han efectuado modificaciones genéticas artificialmente^{43,44,86}. Entre los modelos murinos en los que se aplica la tecnología transgénica y de *knockout*^{43,44}, se encuentran los que se caracterizan por alteraciones en el manejo del calcio y el desarrollo de hipertrofia^{42,86}. En ellos se estudia la relación entre la expresión de la Ca²⁺-ATPasa del retículo sarcoplásmico (SERCA) y el desarrollo de insuficiencia cardiaca tras alterar su expresión.

En animales de mayor tamaño existen diversos procedimientos para producir modelos de insuficiencia cardiaca, entre ellos la estimulación auricular o ventricular a una frecuencia rápida (frecuencia 3-4 veces superior a la espontánea sinusal)⁸⁷, que en un plazo de 3-5 semanas origina insuficiencia cardiaca con reducción de la función sistólica, disminución del gasto cardiaco, aumento de las resistencias vasculares sistémicas, aumento del estrés sistólico de la pared ventricular y alteraciones electrofisiológicas y metabólicas. También se emplean diversos tipos de sobrecarga de presión y de volumen o de isquemia miocárdica; por ejemplo, mediante la provocación de insuficiencias valvulares que dan lugar a sobrecargas de volumen o aumentando la impedancia a la eyección ventricular, que origina sobrecarga de presión. En estos modelos, además de analizar los factores determinantes del deterioro de la función ventricular, se analizan las respuestas a diversos tratamientos y se ponen a prueba diversas técnicas de asistencia circulatoria.

Arritmias

Es difícil encontrar modelos de arritmias que reúnan todos los factores determinantes anatómopatológicos, electrofisiológicos, bioquímicos y moleculares que están presentes en la clínica. En

modelos transgénicos se estudian los mecanismos implicados en la génesis de diversos tipos de arritmias cardiacas en el contexto de las canalopatías y diversos tipos de miocardiopatías^{5,38,39}. En relación con la fibrilación auricular, los modelos animales han aportado información relevante sobre sus mecanismos y sobre diversos procedimientos terapéuticos⁶. Existen diversos modelos de fibrilación auricular en diferentes contextos cuya información es complementaria: estimulación vagal o perfusión continua de acetilcolina, sobrestimulación persistente, insuficiencia cardiaca congestiva, pericarditis estéril, isquemia auricular, insuficiencia mitral, sobrecarga de volumen, insuficiencia respiratoria, acciones de fármacos (cesio para inducir la formación de pospotenciales y automatismos anormales, aconitina para crear focos ectópicos) y modelos transgénicos, entre otros⁶.

En el contexto de la isquemia miocárdica y de la reperfusión, se generan diversos tipos de arritmias^{46,88,89}. Su análisis ha aportado información relevante en relación con la muerte súbita, por ejemplo. Uno de los modelos animales más utilizados para estudiar estos fenómenos es el de Harris en dos etapas, en el que, tras ligadura de la arteria coronaria descendente anterior situando una aguja hipodérmica paralela a la arteria, ésta es retirada inmediatamente para evitar su oclusión completa, pero produciendo una estenosis y la consiguiente reducción del flujo; 30 min después se ocluye completamente la arteria mediante una segunda ligadura^{2,90,91}. Mediante este procedimiento, o los que se han derivado de él utilizando ligaduras con un grado de obstrucción controlado mediante el análisis del flujo distal, se evita el desarrollo inmediato de fibrilación ventricular gracias al preconditionamiento isquémico⁹² y con ello se puede estudiar diversos fenómenos producidos por la isquemia miocárdica, tanto mecánicos como eléctricos. En estos modelos se ha determinado el papel relevante del automatismo anormal de las fibras de Purkinje, parcialmente despolarizadas, en el inicio de arritmias sostenidas durante las primeras horas tras la oclusión coronaria⁸⁹. También se ha observado que la actividad desencadenada por pospotenciales es un fenómeno más tardío.

Para aproximarse a los acontecimientos que ocurren en la cardiopatía isquémica crónica se han desarrollado diversos modelos⁹³. La simultaneidad de isquemia y ejercicio físico puede ayudar a comprender los mecanismos implicados en la aparición de arritmias en estas situaciones, tanto sin infarto previo como tras él, así como los factores que determinan o facilitan su aparición o los posibles efectos beneficiosos de actuaciones terapéuticas, como las encaminadas a evitar la fibrilación ventricular y la muerte súbita. La actividad vegetativa desencade-

nada por los reflejos iniciados por la isquemia, por los cambios hemodinámicos producidos por ella o por el ejercicio efectuado simultáneamente ha sido estudiada desde diversos puntos de vista, incluido el análisis de la intensidad de la respuesta de los barorreceptores, que determina la probabilidad de que se produzca fibrilación ventricular^{93,94}.

La inducibilidad de determinadas arritmias también puede ser estudiada mediante procedimientos de estimulación programada. Otros métodos de inducción de arritmias² se basan en la utilización de fármacos o sustancias que facilitan la producción de pospotenciales (catecolaminas, digitálicos)⁹⁵ o generan actividad repetitiva (focos ectópicos, aconitina) o simulan o favorecen la producción de arritmias asociadas al alargamiento del intervalo QT (taquicardias ventriculares en *torsades de pointes*) (fármacos antiarrítmicos con efecto inverso dependiente de la frecuencia o de otro tipo). El clofilium, que disminuye la conductancia de los canales HERG, o la metoxamina pueden producir en conejos in vivo taquicardias de puntas retorcidas. La veratridina en corazones de cobaya aislados y perfundidos² o la bradicardia por bloqueo auriculoventricular completo en animales de mayor tamaño, que da lugar a dilatación e hipertrofia ventricular, son otros modelos utilizados para inducir taquicardias polimórficas. En estos modelos se han analizado parámetros predictores de arritmias como los relacionados con la variabilidad del QT y también la proarritmogenicidad de determinados fármacos antes de introducirlos en la clínica².

El concepto de remodelado eléctrico y estructural en la fibrilación auricular ha partido de estudios experimentales⁹⁶⁻⁹⁸ y ha conducido a replantear acciones terapéuticas. En esta arritmia se han estudiado los cambios en la refractariedad, en la velocidad de conducción y en la longitud de onda del proceso de activación asociados al tiempo de desarrollo de la arritmia⁹⁹, así como los mecanismos iónicos implicados, y los cambios asociados al remodelado estructural caracterizado por el desarrollo de fibrosis y alteraciones de la conducción. Diversas aproximaciones terapéuticas encaminadas al control de la fibrilación auricular se han beneficiado de la información obtenida en modelos animales, tanto sobre los mecanismos causales como sobre las respuestas a intervenciones farmacológicas, quirúrgicas o basadas en procedimientos de ablación con radiofrecuencia¹⁰⁰⁻¹⁰⁶. Se ha comprobado que determinados fármacos detienen la arritmia sin modificar la longitud de onda del proceso de activación miocárdico¹⁰⁷.

El control de la muerte súbita por arritmias ventriculares sigue siendo un problema no resuelto y un reto para los investigadores que trabajan en disciplinas diversas. Los resultados clínicos de los des-

fibriladores automáticos implantables han supuesto un avance en este terreno y en su desarrollo han contribuido los estudios experimentales¹⁰⁸.

FUTURAS DIRECCIONES

Los avances en el control de las enfermedades cardiovasculares se apoyan en el mejor conocimiento de aspectos muy diversos, que abarcan desde los abordados en estudios epidemiológicos, ensayos clínicos y registros hasta los estudiados en los trabajos de investigación básica. En este terreno se ha progresado en el análisis molecular: los determinantes genéticos de gran número de procesos, sus interacciones, los mecanismos de transcripción o las vías de señalización, información que ha de proporcionar nuevas claves en el conocimiento del desarrollo y las funciones de órganos y sistemas.

La utilización de técnicas clásicas como las del sistema de Langendorff, con variantes en las que el corazón se somete a cargas controladas, conjuntamente con los procedimientos de modificación genética, ha ampliado las posibilidades de estudio de la mecánica cardíaca y de los procesos de contracción y relajación, lo que permite el análisis de los efectos funcionales de alteraciones en la expresión de proteínas relacionadas con el retículo sarcoplásmico, el manejo intracelular del calcio o los elementos contráctiles del músculo cardíaco¹⁰⁹. Las determinaciones *in vivo* efectuadas en modelos murinos con alteraciones genéticas que producen hipertrofia aportan información sobre los factores que determinan la función sistólica y la diastólica y sobre las intervenciones farmacológicas que las modifican. La utilización de estos modelos requiere la adaptación de los sistemas de registro a las características de los animales transgénicos de pequeño tamaño.

La introducción de técnicas no invasivas como la ecocardiografía, con transductores y capacidad de resolución adecuados (frecuencias de emisión altas y mejor resolución temporal para adecuarla a la frecuencia cardíaca elevada de estos animales), ha permitido ampliar la información sobre la anatomía y la función cardíaca y estudiar las consecuencias de sobrecargas de presión y de volumen en modelos transgénicos, para analizar los factores relacionados con el desarrollo de hipertrofia o dilatación ventricular. La combinación de catéteres intracavitarios y técnicas ultrasónicas añade el análisis de las curvas presión-volumen.

En los estudios experimentales se ha introducido más recientemente la resonancia magnética cardíaca para obtener información anatómica y funcional, que se ha añadido a las técnicas ultrasónicas en cuanto a la posibilidad de aplicarla *in vivo*. También aporta información sobre la perfusión y el metabolismo miocárdicos, la existencia de ne-

crosis miocárdica o sobre el manejo del ión calcio durante los procesos de excitación-contracción¹¹⁰. Se están desarrollando herramientas para el estudio de la función mecánica intramiocárdica y de los fenómenos de torsión. El análisis metabólico incluye métodos espectroscópicos para detectar el P³¹ o el H¹, estableciendo cocientes como el de la fosfocreatina y el ATP, relacionado con la producción de energía. También permite el análisis de los mecanismos básicos que influyen en la función cardíaca o en los procesos de remodelado ventricular y de formación de la cicatriz postinfarto. El estudio de nuevos agentes que permiten contrastar el miocardio de manera dirigida abre paso a la evaluación de diversos fenómenos como la apoptosis de las células miocárdicas.

La tomografía de emisión de positrones está siendo utilizada en modelos experimentales para el análisis y la cuantificación del recambio de glucosa en el miocardio o para detectar defectos regionales de la perfusión y, junto con la tomografía computarizada de emisión monofotónica (SPECT), aporta información molecular mediante la utilización de marcadores que se unen a dianas específicas.

En el terreno de la electrofisiología cardíaca, el perfeccionamiento de los sistemas ópticos hasta conseguir resoluciones temporales comparables a las obtenidas con electrodos extracelulares amplía las posibilidades de estudio de las arritmias cardíacas. También supone un avance el desarrollo de matrices de microelectrodos capaces de estimulación y registro de las señales bioeléctricas con una gran resolución temporal y espacial, que permite estudiar con precisión las interacciones y conexiones entre diferentes tipos de células y tejidos, así como determinar los efectos de los fármacos en las características del potencial de acción¹¹¹.

BIBLIOGRAFÍA

1. Hearse DJ, Sutherland FJ. Experimental models for the study of cardiovascular function and disease. *Pharmacol Res.* 2000;41:597-603.
2. Hamlin RL. Animal models of ventricular arrhythmias. *Pharmacol Ther.* 2007;113:276-95.
3. Roths JB, Foxworth WB, McArthur MJ, Montgomery CA, Kier AB. Spontaneous and engineered mutant mice as models for experimental and comparative pathology: history, comparison, and developmental technology. *Lab Anim Sci.* 1999;49:12-34.
4. Yong SL, Wang QK. Animal models for cardiac arrhythmias. *Methods Mol Med.* 2006;129:127-48.
5. Tamargo J, Caballero R, Núñez L, Gómez R, Vaquero M, Delpón E. Genetically engineered mice as a model for studying cardiac arrhythmias. *Front Biosci.* 2007;12:22-38.
6. Nattel S, Shiroshita-Takeshita A, Brundel BJ, Rivard L. Mechanisms of atrial fibrillation: lessons from animal models. *Prog Cardiovasc Dis.* 2005;48:9-28.

7. Dalloz F, Osinska H, Robbins J. Modelos animales genéticamente modificados en investigación cardiovascular. *Rev Esp Cardiol.* 2001;54:764-89.
8. Kantor B, Ashai K, Holmes DR Jr, Schwartz RJ. The experimental animal models for assessing treatment of reestenosis. *Cardiovasc Radiat Med.* 1999;1:48-54.
9. Technical Expert Working Group for the revision of directive 86/609/EEC on the protection of animals used for experimental and other scientific purposes. Final report subgroup on ethical review. Bruselas: Comisión Europea; 2003.
10. NIH Guide for the care and use of laboratory animals. ILAR, National Research Council, 1966.
11. Zadelaar S, Kleemann R, Verschuren L, De Vries-Van der Weij J, Van der Hoorn J, Princen HM, et al. Mouse models for atherosclerosis and pharmaceutical modifiers. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2007;27:1706-21.
12. Terrar DA, Wilson CM, Graham SG, Bryant SM, Heath BM. Comparison of guinea-pig ventricular myocytes and dog Purkinje fibres for in vitro assessment of drug-induced delayed repolarization. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2007;56:171-85.
13. Caballero R, Delpón E, Valenzuela C, Longobardo M, Tamargo J. Losartan and its metabolite E3174 modify cardiac delayed rectifier K(+) currents. *Circulation.* 2000;101:1199-205.
14. Caballero R, Moreno I, Gonzalez T, Arias C, Valenzuela C, Delpon E, et al. Spironolactone and its main metabolite, canrenoic acid, block human ether-a-go-go related gene channels. *Circulation.* 2003;107:889-95.
15. Tutor AS, Delpón E, Caballero R, Gómez R, Núñez L, Vaquero M, et al. Association of 14-3-3 proteins to B1-adrenergic receptors modulates Kv11.1K+ channel activity in recombinant systems. *Mol Biol Cell.* 2006;17:4666-74.
16. Weerapura M, Nattel S, Courtemanche M, Doem D, Ethier N, Ebert T. State-dependent barium block of wild-type and inactivation-deficient HERG channels in *Xenopus* oocytes. *J Physiol.* 2000;526:265-78.
17. Beaumont J, Arias T, Ravassa S, Diez J. Overexpression of human truncated peroxisome proliferator-activated receptor (alpha) induces apoptosis in HL-1 cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 2008;79:458-60.
18. Yuasa S, Fukuda K. Recent advances in cardiovascular regenerative medicine: the induced pluripotent stem cell era. *Expert Rev Cardiovasc Ther.* 2008;6:803-10.
19. Taylor DG, Parilak LD, LeWinter MM, Knot HJ. Quantification of the rat left ventricle force and Ca²⁺-frequency relationships: similarities to dog and human. *Cardiovasc Res.* 2004;61:77-86.
20. Endoh M. Force-frequency relationship in intact mammalian ventricular myocardium: physiological and pathophysiological relevance. *Eur J Pharmacol.* 2004;500:73-86.
21. Delpón E, Valenzuela C, Perez O, Casis O, Tamargo J. Propafenone preferentially blocks the rapidly activated component of delayed rectifier K⁺ current in guinea pig ventricular myocytes: voltage-independent and time-dependent block of the slowly activating component. *Circ Res.* 1995;76:223-35.
22. Perez O, Valenzuela C, Delpón E, Tamargo J. Electrophysiological effects of CI-980, a tubulin binding agent, on guinea pig papillary muscles. *Br J Pharmacol.* 1997;120:187-92.
23. Janse MJ, Van Capelle FJ, Anderson RH, Billete J, Becker AE, Durrer D. Correlation between electrophysiologic recordings and morphologic findings in the rabbit atrioventricular node. *Arch Int Physiol Biochim.* 1974;82:331-2.
24. Van Capelle FJ, Janse MJ, Varghese PJ, Freud GE, Mater C, Durrer D. Spread of excitation in the atrioventricular node of isolated rabbit hearts studied by multiple microelectrode recordings. *Circ Res.* 1972;31:602-16.
25. Cavero I, Mestre M, Guillon JM, Hevillet E, Roach AG. Preclinical in vitro cardiac electrophysiology. A method of predicting arrhythmogenic potential of antihistamines in humans. *Drug Safety.* 1999;21 Suppl 1:19-31.
26. Hagashi S, Kii Y, Tabo M, Fukuda H, Itoh T, Shimosato T, et al. QT Product: a multi-site study of in vitro action potential assays on 21 compounds in isolated guinea-pig papillary muscles. *J Pharmacol Sci.* 2005;99:423-37.
27. Sugiyama A, Motomura S, Hashimoto K. Comparison of cardiovascular effects of a novel class IC antiarrhythmic agent, NIK-244, with those of flecainide in isolated canine heart preparations cross-circulated with a donor dog. *Jpn J Pharmacol.* 1991;56:1-12.
28. Galinanes M, Hearse DJ. Assessment of ischemic injury and protective interventions: the Langendorff versus the working rat heart preparation. *Can J Cardiol.* 1990;6:83-91.
29. Brugada J, Boersma L, Abdollah H, Kirchhof C. Echo-wave termination of ventricular tachycardia. A common mechanism of termination of reentrant arrhythmias by various pharmacological interventions. *Circulation.* 1992;85:1879-87.
30. Boersma L, Zetelaki Z, Brugada J, Alessie M. Polymorphic reentrant ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart studied by high-density mapping. *Circulation.* 2002;105:3053-61.
31. Chorro FJ, Cánoves J, Guerrero J, Mainar L, Sanchis J, Such L, et al. Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil, and sotalol: an experimental study. *Circulation.* 2000;101:1606-15.
32. Chorro FJ, Trapero I, Guerrero J, Such LM, Cánoves J, Mainar L, et al. Modification of ventricular fibrillation activation patterns induced by local stretching. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2005;16:1087-96.
33. Trapero I, Chorro FJ, Such-Miquel L, Cánoves J, Tormos A, Pelechano F, et al. Efectos de la estreptomycin en las modificaciones de la activación miocárdica durante la fibrilación ventricular inducidas por el estiramiento. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:201-5.
34. Franz MR. Current status of monophasic action potential recording: theories, measurements and interpretations. *Cardiovasc Res.* 1999;41:25-40.
35. Gray RA, Pertsov AM, Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. *Nature.* 1998;392:75-8.
36. Moreno J, Zaitsev AV, Warren M, Berenfeld O, Kalifa J, Lucca E, et al. Effect of remodelling, stretch and ischemia on ventricular fibrillation frequency and dynamics in a heart failure model. *Cardiovasc Res.* 2005;65:158-66.
37. Valderrábano M, Yang J, Omichi C, Kil J, Lamp ST, Qu Z, et al. Frequency analysis of ventricular fibrillation in swine ventricles. *Circ Res.* 2002;90:213-22.
38. Salama G, London B. Mouse models of Long QT syndrome. *J Physiol.* 2007;578:43-53.
39. Nilles KM, London B. Knockin animal models of inherited arrhythmogenic diseases: what have we learned from them. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 2007;18:1117-25.
40. Williams KJ, Feig JE, Fisher EA. Rapid regression of atherosclerosis: insights from the clinical and experimental literature. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med.* 2008;5:91-102.
41. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, Van Gorp PJ, Van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoE and LDLr mice. *Clin Chem Lab Med.* 2005;43:470-9.
42. Lebeche D, Dalal R, Jang M, Del Monte F, Hajjar RJ. Transgenic models of heart failure: Elucidation of the molecular mechanisms of heart disease. *Heart Fail Clin.* 2005;1:219-36.
43. Dillmann WH. Calcium regulatory proteins and their alteration by transgenic approaches. *Am J Cardiol.* 1999;83:H89-91.

44. Babu GJ, Periasamy M. Transgenic mouse models for cardiac dysfunction by a specific gene manipulation. *Methods Mol Med.* 2005;112:365-77.
45. Schulz R, Heusch G. Connexin 43 and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res.* 2004;62:335-44.
46. Ferdinandy P, Schulz R, Baxter GF. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning, and postconditioning. *Pharmacol Rev.* 2007;59:418-58.
47. Golino P, Maroko PR, Carew TE. The effect of acute hypercholesterolemia on myocardial infarct size and the non-reflow phenomenon during coronary occlusion-reperfusion. *Circulation.* 1987;75:292-8.
48. Friedman M, Byers SO, Rosenman RH. Resolution of aortic atherosclerotic infiltration in the rabbit by phosphatide infusion. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1957;95:586-8.
49. Wissler RW, Vesselinovitch D. Studies of regression of advanced atherosclerosis in experimental animals and man. *Ann N Y Acad Sci.* 1976;275:363-78.
50. Miyazaki A, Sakuma S, Morikawa W, Takiue T, Miake F, Terano T, et al. Intravenous injection of rabbit apolipoprotein A-I inhibits the progression of atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995;15:1882-8.
51. Aikawa M, Libby P. Lipid lowering reduces proteolytic and prothrombotic potential in rabbit atheroma. *Ann N Y Acad Sci.* 2000;902:140-52.
52. Williams KJ, Werth VP, Wolff JA. Intravenously administered lecithin liposomes: a synthetic antiatherogenic lipid particle. *Perspect Biol Med.* 1984;27:417-31.
53. Maruffo CA, Portman OW. Nutritional control of coronary artery atherosclerosis in the squirrel monkey. *J Atheroscler Res.* 1968;8:237-47.
54. Armstrong ML, Megan MB. Evidence of regression of atherosclerosis in primates and man. *Postgrad Med J.* 1976;52:456-61.
55. Armstrong ML, Warner ED, Connor WE. Regression of coronary atheromatosis in rhesus monkeys. *Circ Res.* 1970;27:59-67.
56. Daoud AS. Sequential morphologic studies of regression of advanced atherosclerosis. *Arch Pathol Lab Med.* 1981;105:233-9.
57. Walsh A, Ito Y, Breslow JL. High levels of human apolipoprotein A-I in transgenic mice result in increased plasma levels of small high density lipoprotein (HDL) particles comparable to human HDL3. *J Biol Chem.* 1989;264:6488-94.
58. Plump AS, Smith JD, Hayek T, Aalto-Setälä K, Walsh A, Verstuyft JG, et al. Severe hypercholesterolemia and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice created by homologous recombination in ES cells. *Cell.* 1992;71:343-53.
59. Tangirala RK, Tsukamoto K, Chun SH, Usher D, Puré E, Rader DJ. Regression of atherosclerosis induced by liver-directed gene transfer of apolipoprotein A-I in mice. *Circulation.* 1999;100:1816-22.
60. Tsukamoto K, Smith P, Glick JM, Rader DJ. Liver-directed gene transfer and prolonged expression of three major human ApoE isoforms in ApoE-deficient mice. *J Clin Invest.* 1997;100:107-14.
61. Harris JD, Graham IR, Schepelman S, Stannard AK, Roberts ML, Hodges BL, et al. Acute regression of advanced and retardation of early aortic atheroma in immunocompetent apolipoprotein-E (apoE) deficient mice by administration of a second generation [E1(-), E3(-), polymerase (-) adenovirus vector expressing human apoE. *Hum Mol Genet.* 2002;11:43-58.
62. Trogan E, Feig JE, Dogan S, Rothblat GH, Angeli V, Tacke F, et al. Gene expression changes in foam cells and the role of chemokine receptor CCR7 during atherosclerosis regression in ApoE-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006;103:3781-6.
63. Trogan E, Fayad ZA, Itskovich VV, Aguinaldo JG, Mani V, Fallon JT, et al. Serial studies of mouse atherosclerosis by in vivo magnetic resonance imaging detect lesion regression after correction of dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004;24:1714-9.
64. Casani L, Segales E, Vilahur G, Bayés de Luna A, Badimón L. Moderate daily intake of red wine inhibits mural thrombosis and monocyte tissue factor expression in an experimental porcine model. *Circulation.* 2004;110:460-5.
65. Badimón L, Turitto V, Rosemark JA, Badimón JJ, Fuster V. Characterization of a tubular flow chamber for studying platelet interaction with biologic and prosthetic materials: deposition of indium 111-labeled platelets on collagen, subendothelium and expanded polytetrafluoroethylene. *J Lab Clin Med.* 1987;110:706-18.
66. Braunwald E, Maroko PR. Protection of the ischemic myocardium. *Cardiovasc Dis.* 1975;2:129-47.
67. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J, et al. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusion. *Circulation.* 1971;43:67-82.
68. Schaper J. Ultrastructure of the myocardium in acute ischemia. En: *The pathophysiology of myocardial perfusion.* Schaper W, editor. Amsterdam: Elsevier; 1979. p. 581-674.
69. Schaper J. Ultrastructural changes of the myocardium in regional ischemia and infarction. *Eur Heart J.* 1986 7 Suppl B:3-9.
70. Schaper J, Schaper W. Time course of myocardial necrosis. *Cardiovasc Drugs Ther.* 1988;2:17-25.
71. Jennings RB, Baum J, Herdson P. Fine structural changes in myocardial ischemic injury. *Arch Pathol.* 1965;79:135-43.
72. Jennings RB, Ganote E. Structural changes in myocardium during acute ischemia. *Circ Res.* 1974;35 Suppl 3:156-72.
73. Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE. Total ischemia in dog hearts, in vitro. I. Comparison of high energy phosphate production, utilization, and depletion, and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo. *Circ Res.* 1981;49:892-900.
74. Huang Y, Rabb H, Womer KL. Ischemia-reperfusion and immediate T cell responses. *Cell Immunol.* 2007;248:4-11.
75. Kroemer G, Galluzzi L, Brenner C. Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev.* 2007;87:99-163.
76. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation.* 1986;74:1124-36.
77. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol.* 2003;285:H579-88.
78. Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev.* 2003;83:1113-51.
79. Armstrong SC. Protein kinase activation and myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 2004;61:427-36.
80. Hausenloy DJ, Yellon DM. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc Res.* 2006;70:240-53.
81. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol.* 2006;40:16-23.
82. Otani H. Reactive oxygen species as mediators of signal transduction in ischemic preconditioning. *Antioxid Redox Signal.* 2004;6:449-69.
83. Rodriguez-Sinovas A, Boengler K, Cabestrero A, Gres P, Morente M, Ruiz-Meana M, et al. Translocation of connexin 43 in the inner mitochondrial membrane of cardiomyocytes through the heat shock protein 90-dependent TOM pathway and its importance in cardioprotection. *Circ Res.* 2006;99:93-101.

84. Garcia-Dorado D, Vinten-Johansen J, Piper HM. Bringing preconditioning and postconditioning into focus. *Cardiovasc Res.* 2006;70:167-9.
85. Recchia FA, Lionetti V. Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Vet Res Commun.* 2007;31 Suppl 1:35-41.
86. Christensen G, Wang Y, Chien KR. Physiological assessment of complex cardiac phenotypes in genetically engineered mice. *Am J Physiol.* 1997;272:H2513-24.
87. Whipple GH, Sheffield LT, Woodman EG, Theophilis C, Friedman S. Reversible congestive heart failure due to chronic rapid stimulation of the normal heart. *Proc N Engl Cardiovasc Soc.* 1962;20:39-40.
88. Carmeliet E. Cardiac ionic currents and acute ischemia: from channels to arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999;79:917-1017.
89. Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 1989;69:1049-169.
90. Harris AS, Guevara Rojas A. The initiation of ventricular fibrillation due to coronary occlusion. *Exp Med Surg.* 1943;1:105-11.
91. Harris AS. Delayed development of ventricular ectopic rhythms following experimental coronary occlusion. *Circulation.* 1950;1:1318-28.
92. Taggart P, Yellon DM. Preconditioning and arrhythmias. *Circulation.* 2002;106:2999-3001.
93. Schwartz PJ, Billman GE, Stone HL. Autonomic mechanisms in ventricular fibrillation induced by myocardial ischemia during exercise in dogs with healed myocardial infarction: an experimental preparation for sudden cardiac death. *Circulation.* 1984;69:790-800.
94. Schwartz PJ, La Rovere MT, Vanoli E. Autonomic nervous system and sudden death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. *Circulation.* 1992;85 Suppl 1:77-91.
95. Wit AL, Rosen MR. After depolarizations and triggered activity. En: Fozzard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, editores. *The heart and cardiovascular system.* New York: Raven Press; 1986. p. 1449-90.
96. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Allesie MA. Atrial fibrillation begets atrial fibrillation. A study in awake chronically instrumented goats. *Circulation.* 1995;92:1954-68.
97. Wijffels MC, Kirchhof CJ, Dorland R, Power J, Allesie MA. Electrical remodelling due to atrial fibrillation in chronically instrumented conscious goats: Roles of neurohumoral changes, ischemia, atrial stretch, and high rate of electrical activation. *Circulation.* 1997;96:3710-20.
98. Morillo CA, Klein GJ, Jones DL, Guiraudon CM. Chronic rapid atrial pacing. Structural, functional and electrophysiological characteristics of a new model of sustained atrial fibrillation. *Circulation.* 1995;91:1588-95.
99. Allesie MA, Boyden PA, Camm AJ, Kleber AG, Lab MJ, Legato MJ. Pathophysiology and prevention of atrial fibrillation. *Circulation.* 2001;103:769-77.
100. Harada A, D'Agostino HJ Jr, Schuessler RB, Boineau JP, Cox JL. Right atrial isolation: a new surgical treatment for supraventricular tachycardia. I. Surgical technique and electrophysiologic effects. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1988;95:643-50.
101. Cox JL, Schuessler RB, D'Agostino HJ Jr, Stone CM, Chang BC, Cain ME, et al. The surgical treatment of atrial fibrillation. III. Development of a definitive surgical procedure. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;101:569-83.
102. Huang SK, Bharati S, Graham AR, Gorman G, Lev M. Chronic incomplete atrioventricular block induced by radiofrequency catheter ablation. *Circulation.* 1989;80:951-61.
103. Chorro FJ, Sanchis J, Lopez-Merino V, Such L, Cerdá M, Burguera M. Transcatheter ablation of the sinus node in dogs using high-frequency current. *Eur Heart J.* 1990;11:82-9.
104. Chorro FJ, Mainar L, Cánoves J, Sanchis J, Such LM, Porres JC, et al. Características de los electrogramas auriculares registrados en las líneas de bloqueo producidas con radiofrecuencia en un modelo experimental. *Rev Esp Cardiol.* 2000;53:1596-606.
105. Chorro FJ, Blasco E, Trapero I, Cánoves J, Ferrero A, Mainar L, et al. Selective myocardial isolation and ventricular fibrillation. *Pacing Clin Electrophysiol.* 2007;30:359-70.
106. Chorro FJ, Guerrero J, Cánoves J, Trapero I, Mainar L, Pelechano F, et al. Modificaciones de las características espectrales de la fibrilación ventricular en las lesiones producidas con radiofrecuencia. Estudio experimental. *Rev Esp Cardiol.* 2008;61:394-403.
107. Wijffels MC, Dorland R, Mast F, Allesie MA. Widening of the excitable gap during pharmacological cardioversion of atrial fibrillation in the goat: Effects of cibenzoline, hydroquinidine, flecainide, and D-sotalol. *Circulation.* 2000;101:260-7.
108. Mirowsky M, Mower MM, Langer A, Heilman MS, Schreibman J. A chronically implanted system for automatic defibrillation in active conscious dogs. Experimental model for treatment of sudden death from ventricular fibrillation. *Circulation.* 1978;58:90-4.
109. James JF, Hewett TE, Robbins J. Cardiac physiology in transgenic mice. *Circ Res.* 1998;82:407-15.
110. Epstein FH. MR in mouse models of cardiac disease. *NMR Biomed.* 2007;20:238-55.
111. Stett A, Egert U, Guenther E, Hofmann F, Meyer T, Nisch W, et al. Biological application of microelectrode arrays in drug discovery and basic research. *Anal Bioanal Chem.* 2003;377:486-95.