

**Universitat Autònoma de Barcelona**

**Departament de Medicina i Cirurgia Animals**



# **USO DE TÉCNICAS DE IMAGEN EN EL FENOTIPADO CARDIOVASCULAR DEL RATÓN**



**Memoria presentada por Elisabet Domínguez Miño para optar al grado de  
Doctor en Veterinaria**

**Directores de tesis: Yvonne Espada Gerlach y Jesús Ruberte París**



## **AGRADECIMIENTOS**



A la Dra. Fátima Bosch y a todo el CBATEG por hacer posible la realización de este trabajo, por disponer de todo el material y los recursos apropiados para la realización del mismo.

A mis directores de tesis. A Yvonne por haber pensado en mí para este proyecto, por haberme enseñado el mundo de la imagen, por haberme ayudado con los ratones y haber tenido paciencia cada vez que las cosas no salían bien. Y también por haberme dado todas las facilidades para seguir aprendiendo, seguir formándome y crecer profesionalmente.

A Jesús por haber querido trabajar conmigo sin conocerme y sin haberme escogido. Por el tiempo que me ha dedicado y por haberme enseñado cosas que nunca pensé que fuera a conocer.

A Rosa por enseñarme, por corregirme las presentaciones de los congresos y por estar siempre disponible para resolver dudas y aclararme un poco. Por ser una persona tranquila y por mantener la calma pase lo que pase.

A Marc por contestar todas las preguntas que le hago, por haberme ayudado con mucha parte de este trabajo. A Víctor por su ayuda estadística, por todas las veces que lo he molestado con mis gráficos, medidas, áreas, etc. A Ana por enseñarme anatomía cuando hacíamos las ecografías juntas.

A mis compañeros del laboratorio (Mari, David, Verónica y Ángel), por todo el trabajo que han hecho, por las fotos, las barras de las figuras, por estar de buen humor, por enseñarme una forma diferente de trabajar.

A Lorena por ayudarme siempre y por haberme enseñado todo lo que he aprendido en el laboratorio. Por aguantarme cada mañana y no estresarse con mis idas y venidas de veterinaria al CBATEG y por recordarme que tengo que aprender a estar 5 minutos quieta.

A Silvia por saber tanto de MRI y saber explicarlo.

A Débora por su ayuda con los cardiomiocitos.

A José por hacer que la estadística sea diferente. Por contestar todas las dudas que tengo aunque al cabo de cinco minutos vuelva a estar como al principio.

A Teresa y Montse por haberme dado trabajo en la parte final de la tesis, por haber creído en mí.



## **ABREVIATURAS**



- a: aceleración
- A: área
- ACCI: arteria carótida común izquierda
- AD: atrio derecho
- AFI: arteria femoral izquierda
- AI: atrio izquierdo
- Ao: aorta
- ARD: arteria renal derecha
- ASCI: arteria subclavia izquierda
- BSA: área de superficie corporal
- Ca: capilar
- CM: cardiomiocito
- CVD: cavidad del ventrículo derecho
- CVI: cavidad del ventrículo izquierdo
- D: diámetro
- DCM: cardiomiopatía dilatada
- F: flujo sanguíneo
- HR: frecuencia cardiaca
- IHQ: inmunohistoquímica
- KO: ratón knock-out
- MDV: velocidad diastólica mínima
- Me: medula espinal
- MRI: resonancia magnética nuclear
- NBF: formol tamponado al 10%
- P0: ratones de un día de edad
- PBI: *phosphate buffered Igepal*
- PBS: tampón fosfato salino
- PI: índice de pulsatilidad
- PuD: pulmón derecho
- PV: peso vivo
- PSV: velocidad sistólica máxima
- Pul: pulmón izquierdo
- PVD: pared del ventrículo derecho
- PVI: pared del ventrículo izquierdo

- RI: índice de resistencia
- S: septo interventricular
- SD: desviación estándar
- SIRT1: sirtuina 1 (*NAD-dependent deacetylase sirtuin-1*): proteína codificada por el gen *Sirt1*
- *Sir2: Silent Information Regulator 2 Gen.* Codifica la proteína SIR2
- t: tiempo de aceleración
- TAMX: velocidad media
- TB: tronco braquiocefálico
- WB: tampón de lavado

**RESUMEN**



Los modelos animales se han convertido en una herramienta fundamental en el estudio de los mecanismos fisiopatológicos responsables del desarrollo de diversas enfermedades humanas, y en el avance, tanto en el diagnóstico como en el tratamiento, de las mismas. Esto se debe a que ofrecen una serie de ventajas, principalmente la posibilidad de trabajar con controles sanos y adecuados en cada caso, y a la ausencia de factores de variabilidad, como las diferencias debidas a la edad, a enfermedades concomitantes y a tratamientos farmacológicos.

Uno de los campos en los que el uso de animales de experimentación ha experimentado más avances es en el estudio de las enfermedades cardiovasculares, ya que representan uno de los principales problemas médicos de los países industrializados.

En los últimos años se han desarrollado y mejorado diferentes técnicas de diagnóstico por imagen no invasivas destinadas al estudio de animales de experimentación de pequeño tamaño. Además de permitir la medición de las dimensiones de los órganos o lesiones, las técnicas de imagen permiten tener acceso a parámetros funcionales normales en estos animales, incluso antes del nacimiento, lo que posibilita investigar patologías que tienen lugar en el periodo prenatal. Conocer la anatomía y fisiología de los animales de experimentación sanos es de gran importancia para el posterior estudio de modelos de enfermedades humanas.

En este trabajo se ha realizado el estudio de la vascularización arterial del ratón mediante ecografía de alta frecuencia y se ha analizado la estructura histológica de la aorta descendente abdominal y de la arteria femoral del mismo. Por otro lado, se ha estudiado, mediante técnicas de imagen, la morfología de un ratón mutante para la proteína SIRT1, que podría utilizarse como modelo de patología cardíaca.



**ÍNDICE**



A. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS .....	1
A.1 ECOGRAFÍA VASCULAR .....	7
A.2 FISIOLÓGÍA DEL FLUJO SANGUÍNEO .....	8
A.3 PERFILES DE VELOCIDAD DE FLUJO ARTERIALES .....	9
A.3.1 FLUJO LAMINAR .....	9
A.3.2 FLUJO TURBULENTO .....	11
A.3.3 ONDAS DOPPLER ARTERIALES .....	11
A.4 ESTUDIOS CUANTITATIVOS USANDO DATOS DOPPLER .....	13
A.4.1 VELOCIDADES DEL FLUJO SANGUÍNEO .....	13
A.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA IMPEDANCIA .....	13
A.4.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACELERACIÓN Y DEL TIEMPO DE ACELERACIÓN ....	15
A.4.4 CUANTIFICACIÓN DEL FLUJO .....	16
A.5 ANATOMÍA DEL SISTEMA CIRCULATORIO DEL RATÓN ( <i>Mus musculus</i> ) .....	16
A.5.1 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DEL CORAZÓN .....	16
A.5.2 ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL CORAZÓN .....	18
A.5.3 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DE LAS ARTERIAS .....	18
A.5.4 ANATOMÍA MICROSCÓPICA DE LAS ARTERIAS .....	22
A.5.4.1 Arterias elásticas grandes .....	24
A.5.4.2 Arterias musculares de tamaño medio .....	26
A.5.4.3 Arterias pequeñas .....	27
A.5.4.4 Arteriolas .....	27
A.6 ECOGRAFÍA DOPPLER VASCULAR ARTERIAL EN EL RATÓN .....	28
A.6.1 AORTA ASCENDENTE .....	28
A.6.2 ARCO AÓRTICO .....	28
A.6.2.1 Tronco braquiocefálico .....	28
A.6.2.2 Arteria carótida común izquierda .....	29
A.6.2.3 Arteria subclavia izquierda .....	29
A.6.3 AORTA DESCENDENTE .....	29
A.6.4 ARTERIA RENAL .....	30
A.6.5 ARTERIA FEMORAL .....	31
A.7 BIOLOGÍA DE LA FAMILIA DE LAS SIRTUINAS .....	31
A.7.1 FUNCIONES ESPECÍFICAS DE SIRT1 SOBRE EL CORAZÓN .....	32
B. MATERIAL Y MÉTODOS .....	35
B.1 MATERIAL .....	37
B.1.1 ANIMALES .....	37
B.1.2 INSTRUMENTAL Y EQUIPOS .....	38
B.1.2.1 Equipo de ultrasonografía .....	39
B.1.2.2 Resonancia magnética de alto campo/espectroscopía (MRI) .....	40
B.1.2.3 Material general para los estudios <i>in vivo</i> .....	40
B.1.2.4 Material para la eutanasia y procesamiento post mórtem .....	41
B.1.2.5 Microscopios y lupas .....	41
B.1.2.6 Cámaras digitales .....	41
B.1.2.7 Material general de laboratorio .....	42
B.2 MÉTODOS .....	42
B.2.1 ANESTESIA Y PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES .....	42
B.2.1.1 Estudio ecográfico .....	42
B.2.1.2 MRI .....	44
B.2.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL MEDIANTE ECOGRAFÍA DE ALTA FRECUENCIA .....	44
B.2.2.1 Vasos estudiados .....	44
B.2.2.2 Ecografía en modo bidimensional .....	46
B.2.2.3 Ecografía Doppler pulsado .....	47

B.2.3 ESTUDIO MORFOLÓGICO MEDIANTE MRI.....	47
B.2.4 EUTANASIA Y PROCESAMIENTO POST MÓRTEM.....	48
B.2.4.1 Disección.....	49
B.2.5 ESTUDIO MORFOLÓGICO.....	49
B.2.5.1 Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas.....	49
B.2.5.1.1 Tinciones histológicas.....	51
B.2.5.1.2 Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ).....	54
B.2.5.1.3 Observación de las muestras.....	58
B.2.5.2 Análisis mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) de la pared del ventrículo izquierdo.....	58
B.2.6 ESTUDIO MORFOMÉTRICO.....	59
B.2.7 RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	60
B.2.7.1 Recogida de datos ecográficos y análisis estadístico.....	60
B.2.7.1.1 Ecografía bidimensional.....	60
B.2.7.1.2 Ecografía Doppler pulsado.....	60
B.2.7.1.3 Análisis estadístico de los datos ecográficos.....	62
B.2.7.2 Recogida de datos de MRI y análisis estadístico.....	63
B.2.7.3 Recogida de datos de morfometría y análisis estadístico.....	64
C. RESULTADOS.....	65
C.1 ESTUDIO ECOGRÁFICO DE LA AORTA.....	67
C.1.1 AORTA ASCENDENTE.....	67
C.1.1.1 Abordaje ecográfico.....	67
C.1.1.2 Descripción de los resultados obtenidos.....	69
C.1.1.2.1 Ecografía bidimensional.....	69
C.1.1.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	70
C.1.2 ARCO AÓRTICO.....	72
C.1.2.1 Abordaje ecográfico.....	72
C.1.2.2 Descripción de los resultados obtenidos.....	72
C.1.2.2.1 Ecografía bidimensional.....	72
C.1.2.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	76
C.1.3 AORTA DESCENDENTE TORÁCICA.....	81
C.1.3.1 Abordaje ecográfico.....	81
C.1.3.2 Descripción de los resultados obtenidos.....	81
C.1.3.2.1 Ecografía bidimensional.....	81
C.1.3.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	82
C.1.4 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PRERRENAL.....	85
C.1.4.1 Abordaje ecográfico.....	85
C.1.4.2 Descripción de los resultados obtenidos.....	86
C.1.4.2.1 Ecografía bidimensional.....	86
C.1.4.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	87
C.1.5 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL POSTRENAL.....	90
C.1.5.1 Abordaje ecográfico.....	90
C.1.5.2 Descripción de los resultados obtenidos.....	92
C.1.5.2.1 Ecografía bidimensional.....	92
C.1.5.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	92
C.1.6 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PREILIACA.....	95
C.1.6.1 Abordaje ecográfico.....	95
C.1.6.2. Descripción de los resultados obtenidos.....	96
C.1.6.2.1 Ecografía bidimensional.....	96
C.1.6.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	98
C.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL AORTA MURINA.....	99
C.2.1 DIÁMETRO.....	102
C.2.2 ÁREA.....	104

C.2.3 FRECUENCIA CARDIACA .....	105
C.2.4 VELOCIDAD SISTÓLICA MÁXIMA .....	107
C.2.5 VELOCIDAD DIASTÓLICA MÍNIMA .....	109
C.2.6 VELOCIDAD MEDIA .....	111
C.2.7 ACELERACIÓN.....	113
C.2.8 TIEMPO DE ACELERACIÓN.....	115
C.2.9 ÍNDICE DE PULSATILIDAD .....	117
C.2.10 ÍNDICE DE RESISTENCIA.....	118
C.2.11 FLUJO .....	120
C.3 ESTUDIO ECOGRÁFICO VASOS PERIFÉRICOS .....	121
C.3.1 TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO .....	122
C.3.1.1 Abordaje ecográfico .....	122
C.3.1.2 Descripción de los resultados obtenidos .....	122
C.3.1.2.1 Ecografía bidimensional.....	122
C.3.1.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	124
C.3.2 ARTERIA CARÓTIDA COMÚN IZQUIERDA.....	127
C.3.2.1 Abordaje ecográfico .....	127
C.3.2.2 Descripción de los resultados obtenidos .....	127
C.3.2.2.1 Ecografía bidimensional.....	127
C.3.2.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	128
C.3.3 ARTERIA SUBCLAVIA IZQUIERDA.....	130
C.3.3.1 Abordaje ecográfico .....	130
C.3.3.2 Descripción de los resultados obtenidos .....	132
C.3.3.2.1 Ecografía bidimensional.....	132
C.3.3.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	133
C.3.4 ARTERIA RENAL DERECHA.....	135
C.3.4.1 Abordaje ecográfico .....	135
C.3.4.2 Descripción de los resultados obtenidos .....	137
C.3.4.2.1 Ecografía bidimensional.....	137
C.3.4.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	138
C.3.5 ARTERIA FEMORAL IZQUIERDA.....	141
C.3.5.1 Abordaje ecográfico .....	141
C.3.5.2 Descripción de los resultados obtenidos .....	141
C.3.5.2.1 Ecografía bidimensional.....	141
C.3.5.2.2 Ecografía Doppler pulsado.....	143
C.4 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PAREDES ARTERIALES .....	145
C.4.1 TAMAÑO RELATIVO DE LAS ARTERIAS .....	145
C.4.2 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PRERRENAL .....	146
C.4.3 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL POSTRENAL .....	149
C.4.4 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PREILIACA .....	152
C.4.5. ESTRUCTURA DE LA ARTERIA FEMORAL .....	154
C.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS CORAZONES DE LOS RATONES DEFICIENTES PARA <i>Sirt1</i> .....	157
C.5.1 MORFOLOGÍA EXTERNA Y ESTRUCTURA INTERNA.....	157
C.5.2 ANÁLISIS <i>IN VIVO</i> DE LA MORFOLOGÍA CARDIACA .....	159
C.5.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS CARDIOMIOCITOS.....	161
C.5.4 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CARDIOMIOCITOS .....	166
C.5.5 ANÁLISIS DE OTROS MARCADORES DE LESIÓN CARDIACA .....	169
D. DISCUSIÓN.....	173
D.1 RATÓN C57BL/6.....	176
D.2 ECOGRAFÍA DE ALTA FRECUENCIA.....	177
D.2.1 PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES.....	179
D.2.1.1 Anestesia.....	179

D.2.2 ECOGRAFÍA VASCULAR.....	180
D.2.2.1 Descripción de la onda Doppler pulsado .....	181
D.2.2.2 Cálculo del flujo sanguíneo .....	181
D.2.2.3 Otros datos numéricos obtenidos a partir del espectro Doppler.....	183
D.3 ECOGRAFÍA DE LA AORTA ASCENDENTE, ARCO AÓRTICO Y AORTA DESCENDENTE TORÁCICA EN EL RATÓN .....	183
D.3.1 NÚMERO DE ANIMALES .....	183
D.3.2 ABORDAJE .....	184
D.3.3 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA ASCENDENTE .....	185
D.3.4 ESPECTRO DOPPLER PULSADO DE LA AORTA ASCENDENTE .....	186
D.3.4.1 Características hemodinámicas de la aorta ascendente .....	186
D.3.4.1.1 Velocidad sistólica máxima .....	186
D.3.4.1.2 Velocidad diastólica mínima.....	187
D.3.4.1.3 Velocidad media.....	188
D.3.4.1.4 Aceleración y tiempo de aceleración .....	188
D.3.4.1.5 Flujo sanguíneo.....	189
D.3.5 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DEL ARCO AÓRTICO.....	189
D.3.6 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DEL ARCO AÓRTICO .....	190
D.3.7 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA DESCENDENTE TORÁCICA.....	191
D.3.8 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DE LA AORTA DESCENDENTE TORÁCICA .....	191
D.4 ECOGRAFÍA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL.....	192
D.4.1 ABORDAJE .....	192
D.4.2 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL .....	192
D.4.3 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL .....	193
D.5 ESTADÍSTICA INFERENCIAL AORTA.....	203
D.6 VASOS PERIFÉRICOS.....	212
D.6.1 TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO, ARTERIA CARÓTIDA COMÚN IZQUIERDA Y ARTERIA SUBCLAVIA IZQUIERDA .....	212
D.6.2 ARTERIA RENAL DERECHA.....	216
D.7 IMPLICACIONES DE SIRT1 SOBRE LA MORFOLOGÍA CARDIACA.....	218
E. CONCLUSIONES .....	225
F. BIBLIOGRAFÍA .....	229

## **A. INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**



Según las estadísticas publicadas durante el año 2009 por la American Heart Association (Lloyd-Jones et al. 2009), en Estados Unidos mueren cada día cerca de 2400 personas como consecuencia de enfermedad cardiovascular, es decir, una media de una muerte cada 37 segundos. Según el National Center for Health Statistics, si se eliminaran todas las manifestaciones de enfermedad cardiovascular, la esperanza de vida de los americanos se alargaría, al menos, 7 años ([http://www.cdc.gov/nchs/data/lifetables/life89\\_1\\_4.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/lifetables/life89_1_4.pdf)). Estas enfermedades tienen unos costes estimados, tanto directos como indirectos, de más de 475 billones de dólares anuales (<http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>).

En Europa, las enfermedades cardiovasculares causan 4,35 millones de muertes anuales y, en el caso concreto de la Unión Europea, tienen un coste aproximado de 169 billones de euros anuales. De estos, unos 105 billones de euros se destinan a su tratamiento y los 64 billones restantes se producen de forma indirecta como consecuencia de la disminución de la productividad. En el caso concreto de España, las enfermedades cardiovasculares constituyen también la primera causa de muerte para el conjunto de la población ([http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/excelencia/cancer-cardiopatia/CARDIOPATIA/opsc\\_est3.pdf](http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/excelencia/cancer-cardiopatia/CARDIOPATIA/opsc_est3.pdf); <http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t15/p417/a2008/I0/&file=01004.px&type=pcaxis&L=0>).

Debido a la elevada mortalidad y a las pérdidas económicas que generan estas enfermedades, existe un interés creciente en investigar tanto la fisiología como la patología del sistema circulatorio, con el objetivo final de reducir las pérdidas humanas y económicas que de ellas se derivan.

El principal objetivo de la investigación biomédica es aumentar el conocimiento del ser humano para obtener beneficios tanto en la calidad de vida como en la prevención y el tratamiento de las enfermedades (Paigen 1995). Para cumplir este objetivo, es necesario disponer de modelos adecuados a investigar, como por ejemplo, modelos animales. Un modelo animal es un buen representante del ser humano si cumple tres requisitos fundamentales: que tenga conservación evolutiva (que el modelo tenga mecanismos genéticos, fisiológicos y metabólicos muy parecidos a los de los seres humanos), que sea técnicamente adaptable y que sea económico (crianza, mantenimiento, transporte) (Malakoff 2000).

Todos los mamíferos cumplen el primer requisito. Sin embargo, al tener en cuenta los otros dos factores, el ratón se convierte en el mamífero con más utilidad en experimentación. La capacidad para manipular genéticamente a un ratón es superior a la de cualquier eucariota y, al mismo tiempo, es el mamífero de laboratorio más barato y uno de los más fáciles de mantener (Vilahur et al. 2011). Además, presenta otros muchos beneficios como los siguientes:

- Conocimiento de la secuencia completa de su genoma.
- Elevada fecundidad.
- Posibilidad de hacer manipulaciones genéticas dirigidas: añadiendo genes (ratón transgénico), suprimiéndolos (ratón knock-out, KO) o clonando animales.
- Recursos genéticos: actualmente existen cepas endogámicas, mutantes, transgénicos y knock-out que pueden usarse para estudiar enfermedades concretas y genes concretos.

En el año 2000 se estimaba que iban a ser criados más de 25 millones de ratones en todo el mundo para ser usados en experimentación, lo que representa el 90% de todos los mamíferos empleados con este fin. En ese mismo año, las predicciones auguraban un crecimiento del 10-20% anual en el uso de ratones durante la década del 2000 (Malakoff 2000).

Debido a todos estos motivos, el ratón se ha convertido en el principal modelo animal en estudios de fisiología y patología cardiovascular, como por ejemplo, en el estudio de aterosclerosis, aneurismas abdominales, trombosis y cardiomiopatías.

En los últimos años se han desarrollado y mejorado diferentes técnicas de diagnóstico por imagen no invasiva destinadas al estudio de animales de experimentación de pequeño tamaño. Estas técnicas permiten hacer exámenes repetidos y realizar un seguimiento de las lesiones en vivo a lo largo del tiempo, evitando el sacrificio de los animales en cada una de las etapas del proceso experimental. En consecuencia, es posible reducir el número de animales a incluir en los estudios. Cada animal actúa como su propio control, evitando la dispersión de los datos medidos debido a la variabilidad entre sujetos.

Por otro lado, además de permitir la medición de las dimensiones de los órganos o lesiones, las técnicas de imagen permiten también tener acceso a parámetros funcionales normales en estos animales, incluso antes del

nacimiento, lo que posibilita investigar patologías que tienen lugar en el periodo prenatal (Zhou et al. 2002).

Debido a su pequeño tamaño, la utilización de sistemas de diagnóstico por imagen destinados a medicina humana y veterinaria convencional resulta poco apropiada en ratones. Además, al tener una frecuencia cardíaca y respiratoria elevada, es necesario disponer de sistemas con una adquisición de imágenes rápida, sobre todo en el estudio del sistema cardiovascular.

Las técnicas de imagen de alta resolución, y entre ellas la ecografía de alta frecuencia, ofrecen las características técnicas necesarias para hacer posible tanto el análisis morfológico como funcional del sistema cardiovascular del ratón.

Este trabajo, que se centra en el uso de diferentes técnicas de imagen en el fenotipado cardiovascular del ratón, se ha desarrollado en dos partes. Por un lado, se ha realizado el estudio de la vascularización arterial del ratón mediante ecografía de alta frecuencia y se ha relacionado con el análisis de la estructura histológica de la aorta descendente abdominal y de la arteria femoral del ratón. Por otro lado, se ha estudiado, mediante técnicas de imagen, la morfología del corazón de un ratón mutante para la proteína SIRT1, que podría utilizarse como modelo de patología cardíaca.

Los objetivos de este trabajo fueron:

1. Determinar la viabilidad del estudio, mediante ecografía de alta frecuencia, del sistema circulatorio arterial del ratón. Para ello se establecieron los siguientes objetivos específicos:

- A. Estudiar la anatomía de la aorta (aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente torácica y abdominal) y de sus ramas principales en el tórax (tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda y arteria subclavia izquierda), de la arteria renal y de la arteria femoral del ratón C57BL/6, mediante ecografía de alta frecuencia, describiendo el diámetro y el área luminal de estos vasos. Describir los abordajes posibles para realizar este estudio.
- B. Describir las características hemodinámicas de cada uno de estos vasos en el ratón C57BL/6, evaluando de forma específica:
  - a. El perfil de onda Doppler pulsado normal, incluyendo el perfil de velocidad de flujo y el patrón de resistencia.

- b. Las velocidades (máxima, mínima y media), aceleración, tiempo de aceleración, flujo sanguíneo e índices vasculares (índice de resistencia e índice de pulsatilidad) de cada vaso.
  - C. Modelizar el comportamiento de cada una de las variables descritas a lo largo de la aorta del ratón.
  - D. Evaluar el efecto del género y del peso de los animales en las variables descritas anteriormente.
2. Describir la estructura microscópica de la aorta descendente abdominal y de la arteria femoral del ratón C57BL/6 y estudiar la posible relación entre el espectro Doppler obtenido en estos vasos y su estructura microscópica. Para esto se utilizaron técnicas de histología convencional e inmunohistoquímica.
3. Realizar el análisis morfológico del efecto de SIRT1 sobre el corazón del ratón. Para alcanzar este objetivo, se dispuso de un ratón KO para el gen *Sirt1* (Cheng et al. 2003).

## **A.1 ECOGRAFÍA VASCULAR**

La ecografía es una de las técnicas de diagnóstico por imagen más usadas para examinar las estructuras internas del cuerpo de forma no invasiva. Al tratarse de una técnica segura, económica y flexible, que ofrece información anatómica y dinámica, puede utilizarse tanto en medicina humana y veterinaria como en investigación (Nelson y Pretorius 1988).

La ecografía bidimensional (modo-B) permite obtener información en tiempo real de la forma, arquitectura, localización y tamaño de las estructuras anatómicas. También permite evaluar estructuras con movimiento, como el corazón, y realizar aspiraciones con aguja fina o biopsias ecoguiadas cuando es necesario obtener muestras tisulares para diagnóstico citológico o histopatológico (Nyland et al. 2002).

Ecográficamente, en sección longitudinal, los vasos sanguíneos presentan estructura tubular con paredes bien definidas que aparecen como líneas delgadas, lisas, paralelas e hiperecoicas. Al escanearlos transversalmente sin comprimirlos, aparecen como estructuras redondeadas u ovaladas. La luz es anecoica debido a la presencia de sangre en su interior. Cuando el flujo de sangre es lento y el diámetro del vaso es suficientemente grande, es posible ver agregados de eritrocitos en forma de ecos en movimiento (Sigel et al. 1983).

La ecografía vascular en modo-B sirve para localizar anomalías vasculares, medir el diámetro de los vasos (por ejemplo en aneurismas), evaluar la pared de los vasos (grosor y lisura) y detectar la presencia de estructuras intraluminales o perivasculares anómalas (por ejemplo trombos o tumores) (Szatmari et al. 2001).

Sin embargo, se trata de una técnica poco específica y poco sensible debido a que no puede descartarse la existencia de una lesión por el simple hecho de no verla, y a que el aspecto ecográfico de muchas lesiones es similar e inespecífico, por lo que es necesario obtener muestras tisulares para su posterior examen histopatológico para alcanzar un diagnóstico definitivo.

Las técnicas de Doppler color, Doppler potencia, Doppler pulsado y la ecografía de contraste pueden servir para diferenciar y caracterizar algunas de estas lesiones (Nyland et al. 2002).

## A.2 FISIOLÓGÍA DEL FLUJO SANGUÍNEO

La sangre es un tejido líquido móvil, compuesto por plasma y células, cuya viscosidad aumenta directamente con el hematocrito e inversamente con la velocidad del flujo sanguíneo. Debido a que la mayor parte de la resistencia al flujo sanguíneo en el sistema circulatorio tiene lugar en vasos de pequeño calibre y capilares, la viscosidad es importante para determinar la cantidad de trabajo necesario para impulsar la sangre a través de este sistema.

El flujo de sangre a través de un vaso se ve afectado por dos factores: la diferencia de presión entre ambos extremos del vaso y la resistencia al flujo que tiene el vaso. Estos tres elementos se relacionan de la siguiente manera:

$$\text{Flujo} = \text{diferencia de presión/resistencia}$$

El flujo sanguíneo es la cantidad total de sangre que se mueve (en todas las velocidades posibles) a través de un punto determinado. Por lo tanto, se puede estimar el flujo sanguíneo (ml/s) si medimos la distribución de velocidades en un determinado punto.

La resistencia al flujo depende del radio y de la longitud del vaso, y de la viscosidad de la sangre, de la siguiente manera:

$$\text{Resistencia} \propto \sim (\text{viscosidad} \times \text{longitud})/\text{radio}^4$$

Cambios pequeños en el radio del vaso provocarán cambios importantes en la resistencia y por tanto en el flujo.

Debido a que la circulación es un sistema pulsátil, la distribución de velocidades y los espectros del flujo cambian constantemente. Además, cada vaso presenta una forma de onda característica que refleja su posición relativa y estatus fisiológico en el sistema circulatorio. La forma de las ondas también

se ve afectada por el gasto cardiaco, orientación gravitacional, ejercicio, estrés y digestión (Szatmari et al. 2001; Nyland et al. 2002).

La naturaleza pulsátil de la circulación conlleva la existencia de diferentes tipos de flujo y distribución de las velocidades a través de los vasos. La ecografía Doppler pulsado permite evaluar la presencia, dirección y velocidad del flujo sanguíneo dentro del volumen de muestra y distinguir entre arterias y venas. Además, da información de los diferentes perfiles de velocidad de flujo de las arterias y de si se trata de vasos de resistencia alta o baja. Cada vaso tiene su patrón Doppler pulsado característico, lo que ayuda en su identificación. Por otro lado, cambios en este patrón pueden indicar patología subyacente.

### **A.3 PERFILES DE VELOCIDAD DE FLUJO ARTERIALES**

Las arterias pueden presentar flujo laminar (de tipo romo, parabólico o intermedio) o turbulento.

#### **A.3.1 FLUJO LAMINAR**

La mayor parte de vasos sanguíneos tienen flujo de tipo laminar, en el que la sangre se mueve formando capas concéntricas o láminas. Las capas centrales tienen flujos más rápidos que las capas cercanas a la pared, ya que éstas pierden energía debido a las fuerzas de fricción (Finn-Bodner y Hudson 1998).

El flujo laminar puede tener un perfil de velocidad de tipo romo, parabólico o intermedio:

- Perfil de velocidad de flujo romo (Fig. 1A). Se observa en arterias de gran calibre, en las que la velocidad de la sangre es casi igual en el centro del vaso que de la pared. La mayor parte de células sanguíneas se mueve a velocidad uniforme, así que la distribución de las velocidades a través de la luz es muy estrecha. El espectro Doppler se caracteriza por presentar una línea delgada en sístole que delimita un espacio limpio llamado ventana espectral o sistólica.

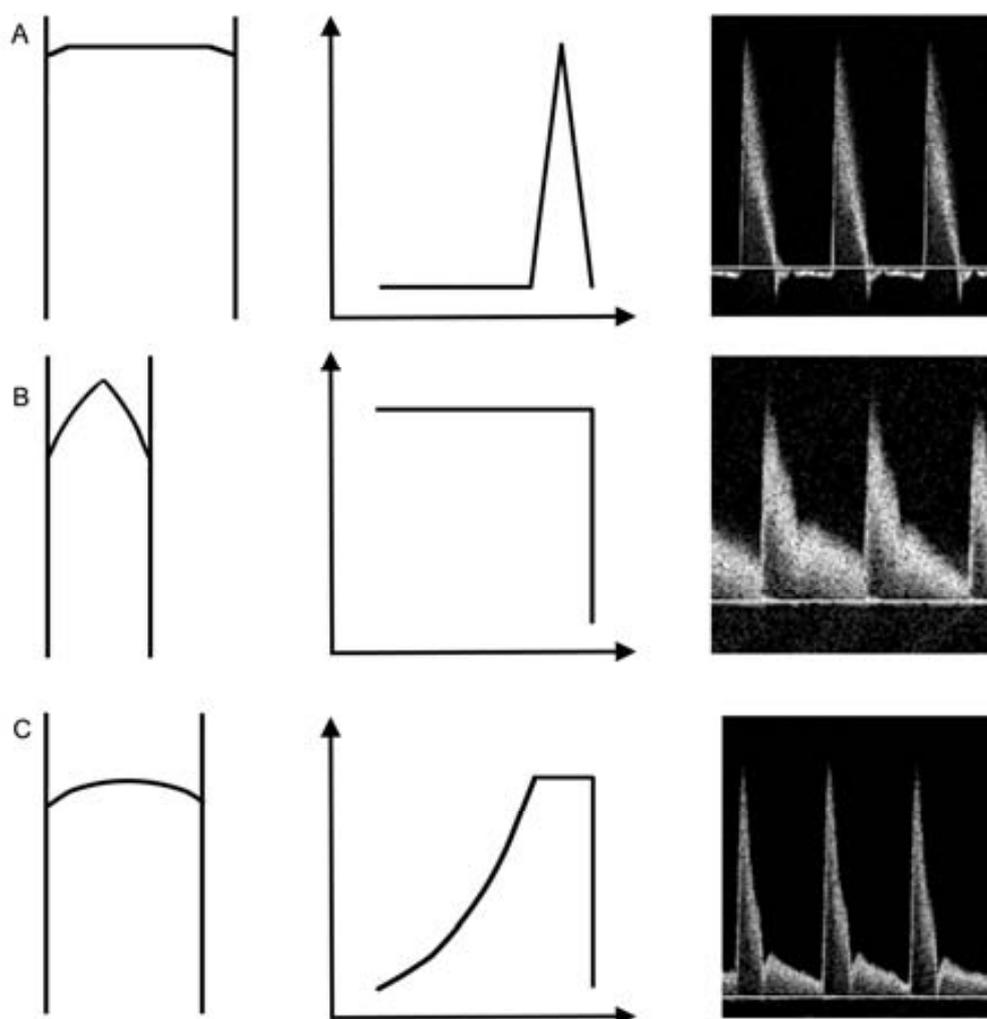


Fig. 1. A. Perfil de velocidad de flujo romo. La mayor parte de células sanguíneas se mueve a velocidad uniforme por lo que la distribución de las velocidades a través de la luz vascular es estrecha. En consecuencia, el espectro se caracteriza por presentar una línea delgada en sístole que rodea un espacio claro llamado ventana espectral o sistólica. B. Perfil de velocidad parabólico. La sangre que se mueve en el centro de la luz tiene una velocidad superior a la que se mueve cerca de la pared del vaso, por lo que la distribución de las velocidades a través de la luz vascular es ancha. No se observa ventana espectral durante la sístole. C. Perfil de velocidad intermedio. En el centro de la luz vascular, el flujo es similar al perfil romo y, en la periferia, es más parecido a un perfil parabólico. Las células sanguíneas quedan representadas en un rango más estrecho de velocidades que en el perfil parabólico. Modificado a partir de Szatmari et al. (2001).

- Perfil de velocidad de flujo parabólico (Fig. 1B). Se observa en arterias de calibre pequeño, en las que la sangre del centro del vaso tiene una velocidad mayor que la que circula cercana a la pared, así que la distribución de las velocidades a través del vaso es más amplia. No se observa ventana espectral durante la sístole porque hay células con un amplio rango de velocidades (desde cero hasta el máximo) a través del volumen de muestra.

- Perfil de velocidad de flujo intermedio (Fig. 1C). Se observa en arterias de tamaño medio, en las que en el centro del vaso el flujo es similar al perfil de velocidad romo, pero en la periferia de la luz vascular el flujo es más parecido a un perfil de velocidad parabólico. En el pico sistólico se representan células con un rango de velocidades pequeño. La distribución de velocidades es más amplia que en un vaso con flujo romo, pero no tan ancha como en uno parabólico. Por lo tanto, hay ventana espectral durante la sístole pero es más pequeña que la de un vaso con flujo romo.

### **A.3.2 FLUJO TURBULENTO**

En bifurcaciones, curvas o ramas puede observarse un rango amplio de velocidades o presencia de flujo reverso, en los que se observan células con diferentes velocidades, desde cero a valores positivos y negativos máximos (Szatmari et al. 2001).

### **A.3.3 ONDAS DOPPLER ARTERIALES**

Las ondas Doppler arteriales pueden presentar un patrón de flujo de resistencia alta, baja o intermedia, cada una con características específicas.

- Patrón de flujo de resistencia alta (Fig. 2A). Presenta picos sistólicos estrechos y flujo reverso al inicio de la diástole. Se puede observar en arterias con pulsatilidad alta y resistencia al flujo alta (Szatmari et al. 2001).
- Patrón de flujo de resistencia baja (Fig. 2B). Presenta picos sistólicos anchos. Durante la diástole la velocidad del flujo es alta y continua y disminuye gradualmente. Se observa en arterias con pulsatilidad baja y resistencia al flujo baja, que irrigan órganos con demanda continua de sangre (Szatmari et al. 2001).

## INTRODUCCIÓN

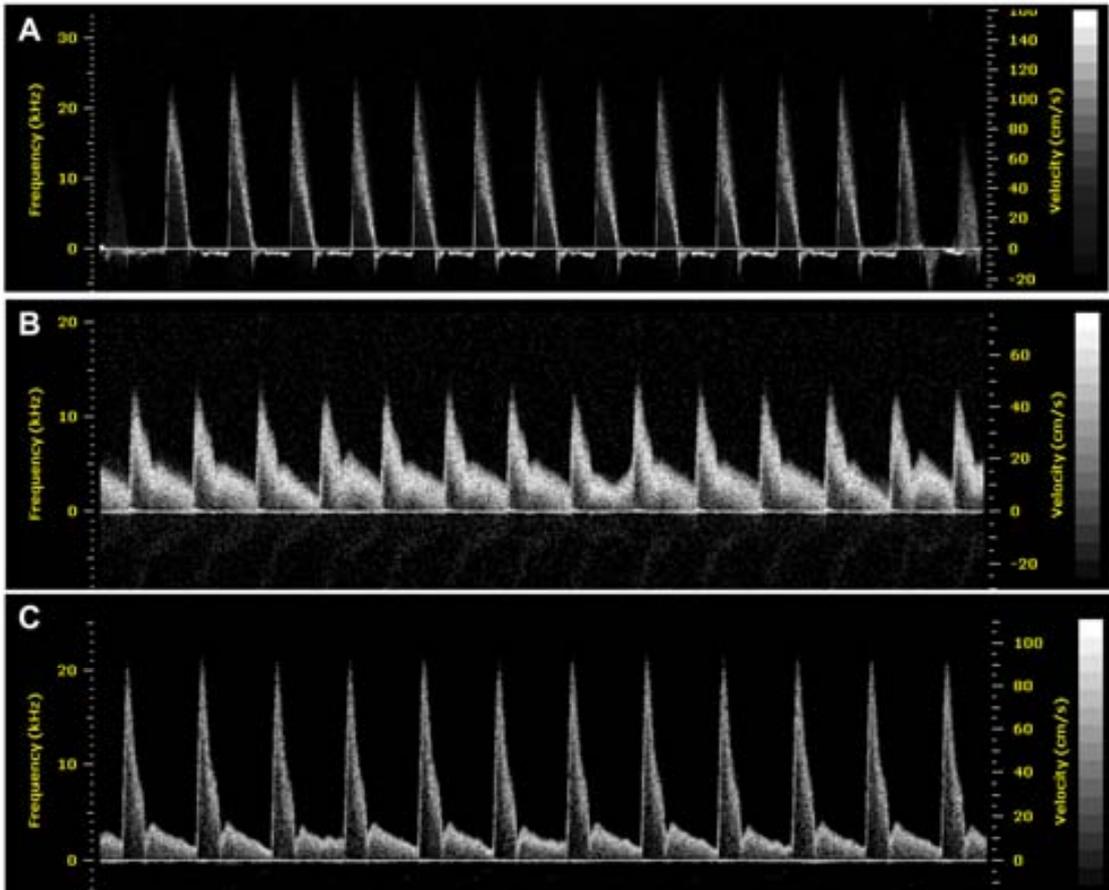


Fig 2. A. Onda Doppler de resistencia alta en la que se observa un pico sistólico estrecho seguido de flujo reverso al inicio de la diástole. B. Onda Doppler de resistencia baja que presenta pico sistólico ancho, velocidad diastólica alta y continua a lo largo de toda la diástole. C. Onda Doppler de resistencia intermedia que muestra un pico sistólico estrecho con flujo anterógrado durante toda la diástole.

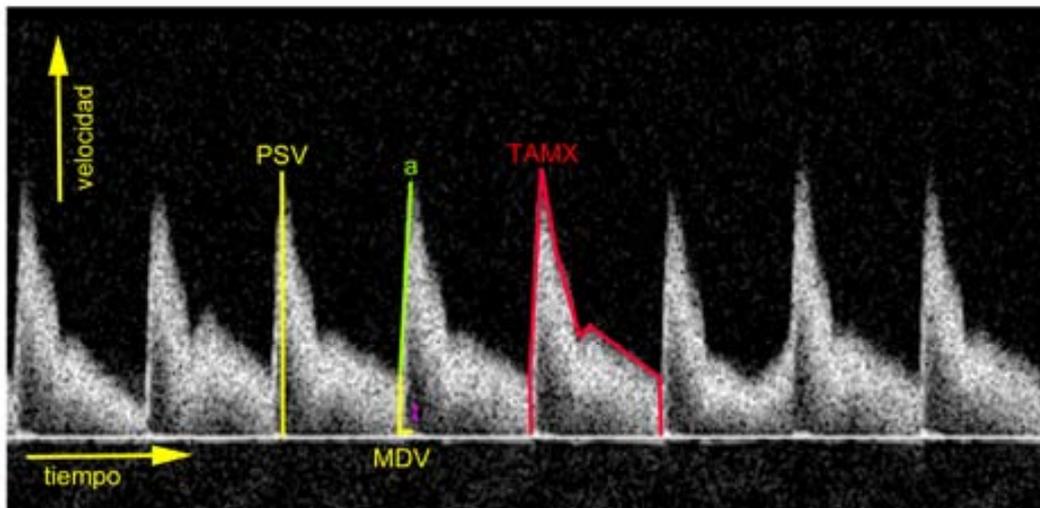


Fig. 3. Representación espectral de la velocidad del flujo sanguíneo respecto al tiempo en la que se muestra la velocidad sistólica máxima (PSV), velocidad diastólica mínima (MDV), la velocidad media (TAMX), la aceleración (a) y el tiempo de aceleración (t).

- Patrón de flujo de resistencia intermedia (Fig. 2C). Presenta picos sistólicos estrechos (aunque más anchos que en arterias de

resistencia alta), con flujo anterógrado en diástole y sin flujo reverso. El pico de velocidad diastólico es menor que en los flujos de resistencia baja, comparado con el pico de velocidad sistólico. Se puede observar en arterias de pulsatilidad intermedia y resistencia intermedia al flujo (Szatmari et al. 2001).

## **A.4 ESTUDIOS CUANTITATIVOS USANDO DATOS DOPPLER**

A partir del espectro Doppler de cada vaso se pueden obtener datos hemodinámicos de gran relevancia, como la velocidad del flujo, la aceleración y el tiempo de aceleración. A partir de estos datos, es posible calcular los índices vasculares y el volumen de flujo de cada vaso. Todos estos parámetros aportan información sobre la fisiología vascular.

### **A.4.1 VELOCIDADES DEL FLUJO SANGUÍNEO**

La **velocidad sistólica máxima (PSV)**, la **velocidad diastólica mínima (MDV)** -y la final- y la **velocidad media (TAMX)** a lo largo del ciclo cardiaco pueden calcularse directamente a partir de la representación espectral de la velocidad del flujo sanguíneo respecto al tiempo (Fig. 3) (Taylor y Holland 1990).

La velocidad instantánea del flujo arterial se ve influida, entre otros factores, por el tamaño y la elasticidad del vaso, la contractilidad miocárdica y el gasto cardiaco. Estos parámetros pueden variar de forma significativa de un paciente a otro. Por esto se han ideado estrategias más constantes para estudiar el flujo sanguíneo, que no se basan únicamente en la medición de la velocidad absoluta, ya que ésta es variable (Taylor y Holland 1990).

### **A.4.2 CUANTIFICACIÓN DE LA IMPEDANCIA**

La impedancia es la resistencia total al flujo de sangre provocada por todos los factores posibles. Si todas las condiciones se mantienen constantes, la impedancia es inversamente proporcional al flujo. A partir de la representación espectral de la onda del flujo sanguíneo que aporta sangre a una determinada región es posible cuantificar la impedancia de la circulación receptora. La mayor parte de la resistencia periférica reside en las arteriolas y se modifica rápidamente con cambios de su tono muscular. Fisiológicamente,

se observa disminución de la impedancia en los miembros inferiores después de hacer ejercicio físico o en las arterias esplácnicas después de las comidas, lo que se traduce en un aumento del flujo sanguíneo a esas regiones. Por el contrario, en situaciones de vasoconstricción puede observarse un aumento fisiológico de la impedancia. En situaciones patológicas, como en casos de retraso del crecimiento intrauterino y rechazo vascular en transplantes renales, también puede aumentar la impedancia vascular (Campbell et al. 1983; Rigsby et al. 1986; Taylor et al. 1985).

Se han utilizado diferentes índices para cuantificar la impedancia. Uno de los más usados es el índice de pulsatilidad o índice Gosling-King (PI) (Taylor et al. 1985; Nelson y Pretorius 1988), que se calcula como:

$$PI = \frac{PSV - MDV}{TAMX}$$

Pourcelot describió el índice de resistencia (RI) (Taylor y Holland 1990) que se calcula como:

$$RI = \frac{PSV - MDV}{MDV}$$

Donde:

- *PSV* es la velocidad sistólica máxima.
- *MDV* es la velocidad diastólica mínima. También puede usarse la velocidad diastólica final (Evans et al. 1980; Bonnin y Fressonnet 2005).
- *TAMX* es la velocidad media.

En una arteria de resistencia hemodinámica baja, el registro Doppler espectral mostrará velocidades sistólicas y diastólicas positivas y anterógradas. En estos casos, el índice de resistencia será menor a uno, lo que informa de una resistencia baja debida a vasodilatación de las arteriolas y a una densidad capilar elevada que permite establecer un régimen de velocidades positivas durante todo el ciclo cardiaco (como sucede, por ejemplo, en las arterias carótidas internas y renales humanas). En arterias de resistencia hemodinámica elevada, las velocidades diastólicas en protodiástole son nulas o negativas. El índice de resistencia será, por tanto, mayor a uno (como sucede,

por ejemplo, en una arteria femoral humana que irriga musculatura en reposo donde las necesidades metabólicas son bajas). Como el índice de resistencia es proporcional a la resistencia hemodinámica verdadera, este índice permite evaluar de forma semicuantitativa el estado de las resistencias hemodinámicas en las regiones a irrigar (Bonnin y Fressonnet 2005).

Otro índice que se ha descrito es la relación:

$$\frac{PSV}{MDV}$$

que se ha usado en numerosos estudios obstétricos. El problema de este índice es que cuando MDV es cero, la relación es infinita (Stuart et al. 1980).

Los índices referidos son útiles para describir cambios patológicos, sobre todo en estudios longitudinales, pero son valores relativamente poco elaborados, ya que, por ejemplo, pueden mantenerse constantes si las velocidades a partir de las que se obtienen aumentan o disminuyen al mismo tiempo.

#### **A.4.3 CUANTIFICACIÓN DE LA ACELERACIÓN Y DEL TIEMPO DE ACELERACIÓN**

La aceleración sistólica (a) y el tiempo de aceleración (t) -tiempo hasta alcanzar la velocidad sistólica máxima- pueden calcularse a partir de la representación espectral del flujo sanguíneo respecto al tiempo, obtenido mediante Doppler pulsado (Fig. 3) (Hartley et al. 2000). Una ventaja del cálculo del tiempo de aceleración es que se trata de un parámetro independiente del ángulo de insonación.

En medicina humana se considera que la aceleración de la aorta ascendente refleja la contractilidad cardiaca, siendo un valor independiente de la precarga ventricular. Así por ejemplo, en fetos que padecen anemia se evalúa la aceleración sistólica de la aorta como indicador de contractilidad cardiaca (Lingman et al. 1991).

En perros, la aceleración de la sangre en la aorta se ha investigado como un índice del estado inotrópico del corazón. Se ha descrito que el descenso de la aceleración máxima del flujo en la aorta es un indicador muy sensible de lesión isquémica de miocardio (Noble et al. 1966).

Estos parámetros también han sido usados en ratones para monitorizar la funcionalidad cardíaca (Hartley et al. 2000; Mai et al. 2004).

#### **A.4.4 CUANTIFICACIÓN DEL FLUJO**

El flujo sanguíneo (F) es el producto de la velocidad media por el área de la luz transversa del vaso.

Esta medida comporta numerosos errores cuyos orígenes se deben a diferentes factores, como la forma del vaso, la medición del área del vaso y su variación a lo largo del ciclo cardíaco (sístole-diástole) y la medición de la velocidad media.

Por lo tanto, la estimación de parámetros semicuantitativos como los índices de pulsatilidad y resistencia, resulta más útil para definir cambios fisiológicos y patológicos (Taylor y Holland 1990). Además, la determinación de la impedancia permite una detección más sensible de cambios patológicos, ya que el aumento de la resistencia al flujo produce un aumento de la contractilidad cardíaca, por lo que el flujo puede mantenerse inalterado hasta el final de un proceso patológico (Taylor y Holland 1990).

### **A.5 ANATOMÍA DEL SISTEMA CIRCULATORIO DEL RATÓN (*Mus musculus*)**

En este apartado se describe la anatomía macroscópica y microscópica del corazón y de las arterias del ratón.

#### **A.5.1 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DEL CORAZÓN**

En el ratón, el eje longitudinal del corazón se orienta oblicuo en el tórax, con el ápex cardíaco dirigido hacia el cuadrante torácico ventral izquierdo (Casteleyn et al. 2010) y la base del corazón, junto a la aorta ascendente, dirigidas hacia el cuadrante torácico dorsal derecho. El eje ventricular del ratón describe un ángulo de 39° respecto a la columna vertebral (Fig. 4).

Al igual que en otros mamíferos, el corazón del ratón se encuentra dentro de la cavidad pericárdica y consta de cuatro cámaras de pared muscular: los atrios derecho e izquierdo y los ventrículos derecho e izquierdo. En el ratón adulto no hay comunicación directa entre el lado derecho e izquierdo del corazón (Green 1968).

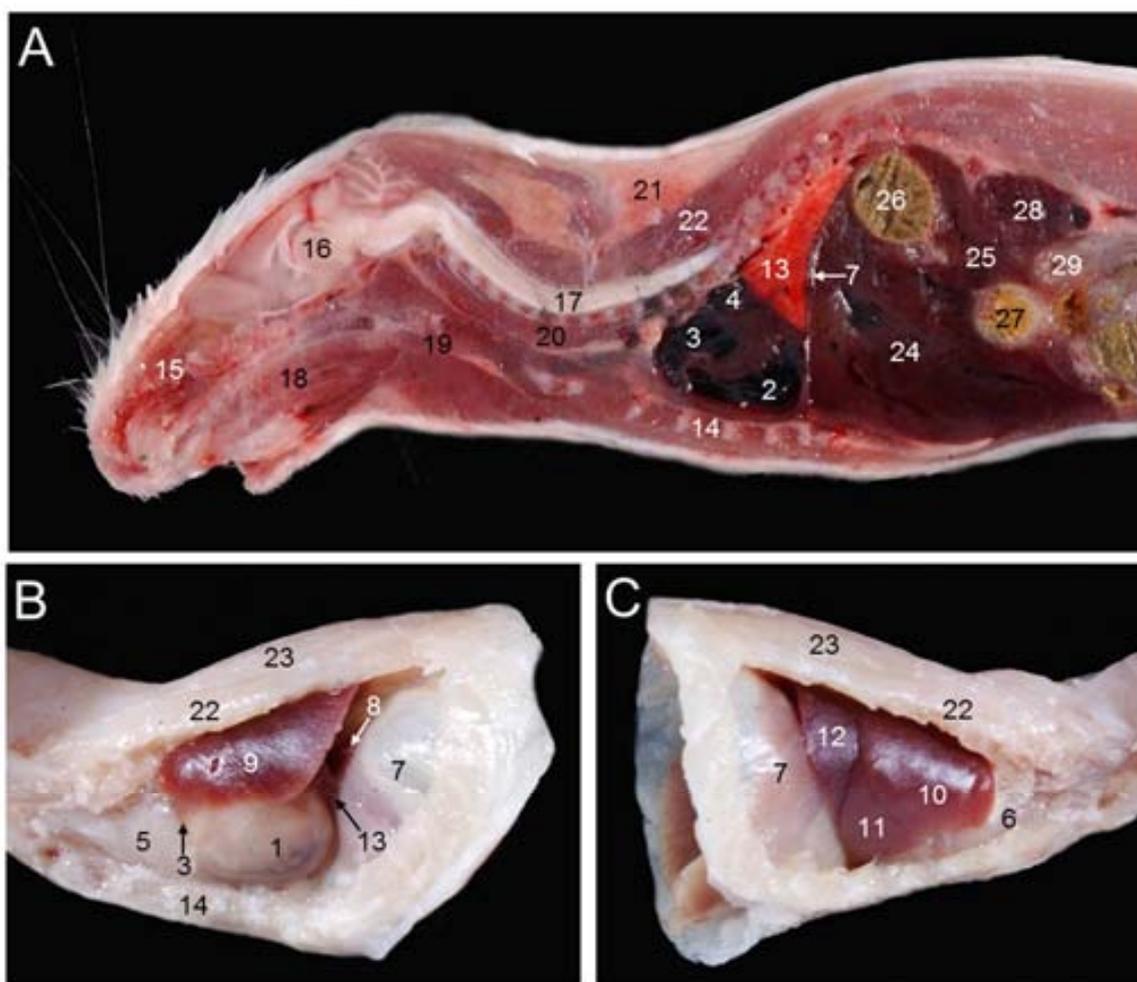


Fig.4. Topografía del corazón. (A) Sección sagital de la mitad craneal del ratón. (B) Visión lateral izquierda de la cavidad torácica fijada y abierta. (C) Visión lateral derecha de la cavidad torácica fijada y abierta. 1: ventrículo izquierdo; 2: ventrículo derecho; 3: atrio izquierdo; 4: atrio derecho; 5: lóbulo izquierdo del timo; 6: lóbulo derecho del timo; 7: diafragma; 8: n. frénico; 9: pulmón izquierdo; 10: lóbulo craneal (pulmón derecho); 11: lóbulo medio (pulmón derecho); 12: lóbulo caudal (pulmón derecho); 13: lóbulo accesorio (pulmón derecho); 14: esternón; 15: cavidad nasal; 16: encéfalo; 17: médula espinal; 18: lengua; 19: m. esternohioideo; 20: m. largo de la cabeza; 21: tejido adiposo interescapular; 22: m. longísimo del tórax; 23: mm. espinal y semiespinal del tórax; 24: hígado (lóbulo izquierdo); 25: hígado (proceso papilar del lóbulo caudado); 26: fondo del estómago; 27: parte pilórica (estómago); 28: riñón izquierdo; 29: colon tansverso.

En el orificio atrioventricular derecho se encuentra la válvula tricúspide, compuesta de tres valvas que se mantienen en su sitio gracias a las cuerdas tendinosas que las unen a los músculos papilares. La válvula bicúspide o mitral, compuesta de dos valvas, se encuentra en el orificio atrioventricular izquierdo. Las aberturas del ventrículo derecho e izquierdo hacia el tronco pulmonar y hacia la aorta, respectivamente, están formadas por tres válvulas semilunares cada una (Green 1968).

### A.5.2 ANATOMÍA MICROSCÓPICA DEL CORAZÓN

En la pared del corazón pueden identificarse tres capas principales: endocardio, miocardio y epicardio (Green 1968).

El endocardio es una capa fina que recubre el interior de las cavidades cardiacas y la superficie de las válvulas. Está compuesto de células endoteliales y tejido conjuntivo laxo que une el endocardio al miocardio. Las válvulas son pliegues de endocardio en los que el tejido conjuntivo es fibroso.

El miocardio es una capa muscular, más fina en los atrios que en los ventrículos, formado por capas de músculo cardiaco con disposición espiral, y por tejido conjuntivo que sirve de soporte a vasos sanguíneos y nervios.

El epicardio es la capa más externa del corazón. Está formado por una capa fina de tejido conjuntivo y una capa mesotelial (o pericardio) que se continúa con la capa de la cavidad pericárdica que rodea al corazón (Green 1968) (Fig. 5).

### A.5.3 ANATOMÍA MACROSCÓPICA DE LAS ARTERIAS

La aorta consta de las siguientes porciones:

- Aorta ascendente (*Aorta ascendens*).
- Arco aórtico (*Arcus aortae*).
- Aorta descendente (*Aorta descendens*), que consta de dos porciones:
  - Aorta descendente torácica (*Aorta thoracica*).
  - Aorta descendente abdominal (*Aorta abdominalis*).

Si se mira el tórax de un ratón desde un punto de vista craneal, puede observarse que la aorta ascendente, arco aórtico y la porción craneal de la aorta descendente realizan una curva sigmoidea. Desde un punto de vista ventral puede verse que el arco aórtico cruza el tórax, transversalmente, de derecha a izquierda (Casteleyn et al. 2010) (Figs. 6 y 7).

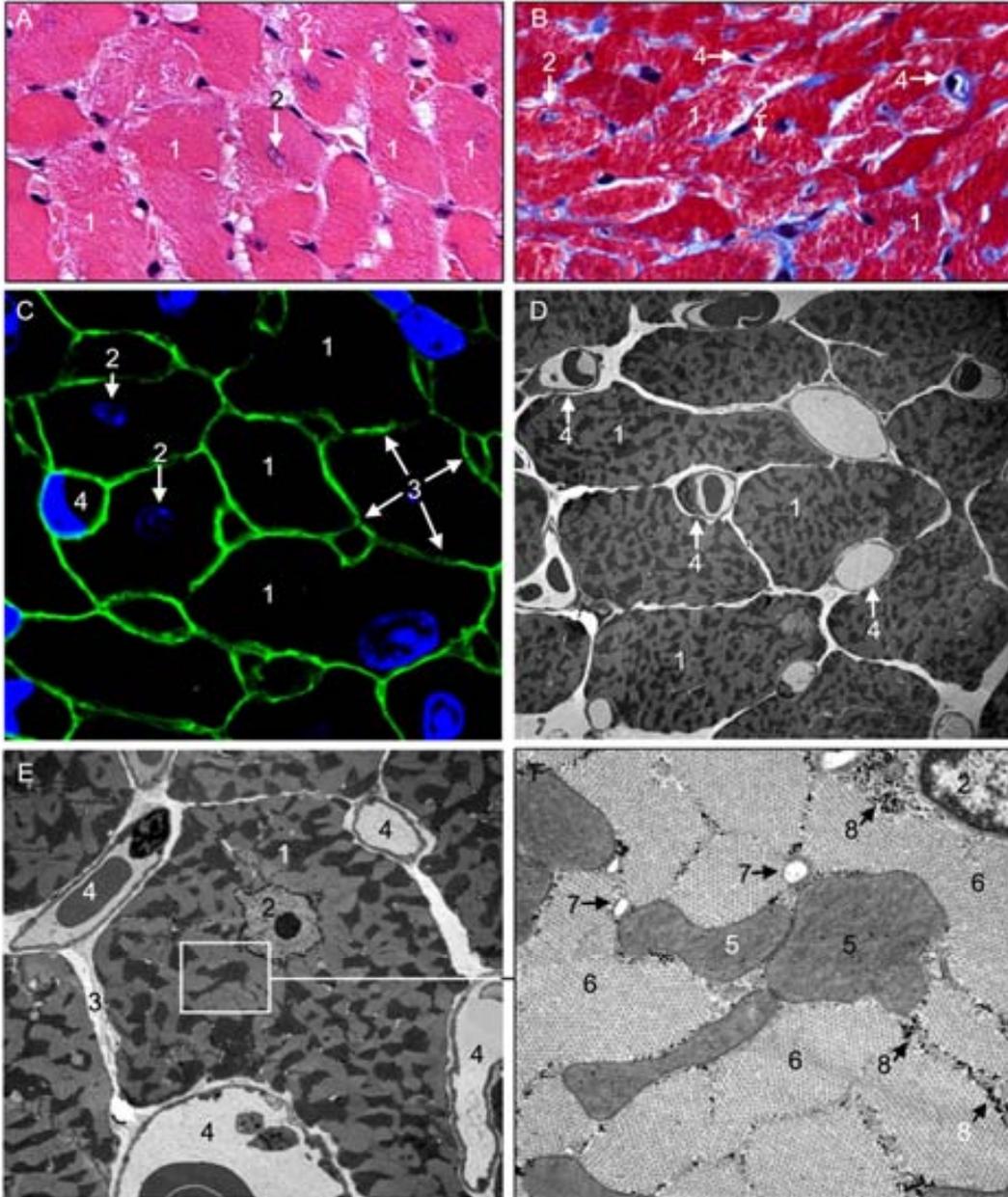
La aorta ascendente se orienta cranealmente y se sitúa ventral a la aorta descendente, a la derecha del plano medio. Ambas porciones de la aorta forman un ángulo de unos 31° entre sí.

El arco aórtico murino tiene morfología semicircular. Desde un punto de vista craneal, presenta una curva de 45° hacia la izquierda desde el plano medio en dirección dorsocaudal (Casteleyn et al. 2010).

## INTRODUCCIÓN



Fig. 5. Estructura del miocardio. Sección transversal. A. Tinción de Hematoxilina/Eosina. B. Tinción Tricrómico de Masson. C. Inmunodetección de laminina (verde). Núcleos teñidos con ToPro 3 (azul). D, E y F. Micrografías electrónicas de transmisión



1: cardiomiocito; 2: núcleo del cardiomiocito; 3: membrana basal del cardiomiocito; 4: capilar; 5: mitocondria; 6: miofibrillas; 7: gránulo de lípido; 8: gránulos de glucógeno.

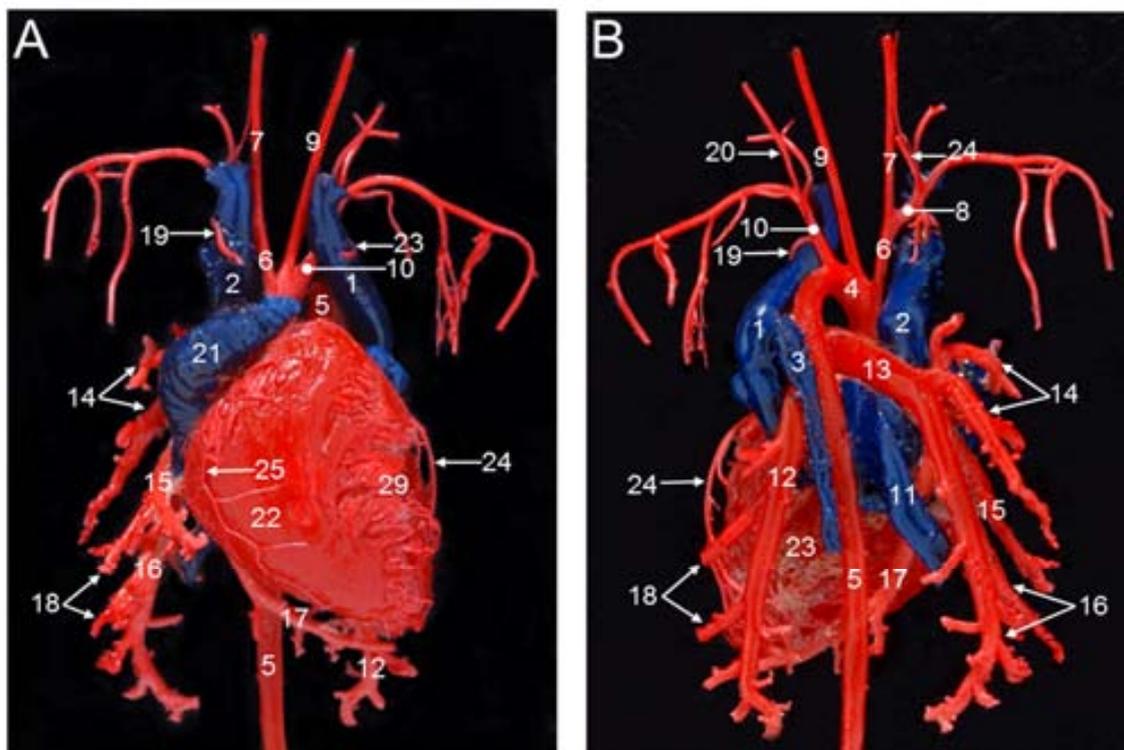


Fig. 6. Arterias y venas del tórax. Inyección con Araldit®. A y B. Visión ventral y dorsal. 1: v. cava craneal izquierda; 2: v. cava craneal derecha; 3: v. azigos izquierda; 4: arco aórtico; 5: aorta descendente torácica; 6: tronco braquiocefálico; 7: a. carótida común derecha; 8: a. subclavia derecha; 9: a. carótida común izquierda; 10: a. subclavia izquierda; 11: vv. pulmonares derechas; 12: a. pulmonar izquierda; 13: a. pulmonar derecha; 14: rama del lóbulo craneal; 15: rama del lóbulo medio; 16: rama del lóbulo caudal; 17: rama del lóbulo accesorio; 18: aa. segmentarias; 19: a. torácica interna; 20: a. vertebral; 21: atrio derecho; 22: ventrículo derecho; 23: ventrículo izquierdo; 24: a. coronaria izquierda; 25: a. coronaria derecha.

Las principales ramas del arco aórtico del ratón son, al igual que sucede en el hombre, el tronco braquiocefálico, la arteria carótida común izquierda y la arteria subclavia izquierda (De Garis et al. 1933; Layton et al. 2006; Natsis et al. 2009).

El tronco braquiocefálico da lugar a la arteria subclavia derecha y a la arteria carótida común derecha. La longitud del tronco braquiocefálico varía de 0,39 a 2,08 mm (media  $\pm$  SD: 1,20  $\pm$  0,17 mm). En la mayor parte de ratones, la arteria torácica interna derecha sale de la arteria subclavia derecha, pero en algunos casos, cuando el tronco braquiocefálico es más largo, esta arteria sale directamente de él (Figs. 6 y 7) (Casteleyn et al. 2010).

La aorta descendente se localiza dorsal y a la izquierda de la línea media y sigue un trayecto hacia caudal hasta alcanzar la línea media a la altura de la décima vértebra torácica (Casteleyn et al. 2010). En el tórax, la aorta descendente da lugar a trece pares de arterias intercostales.

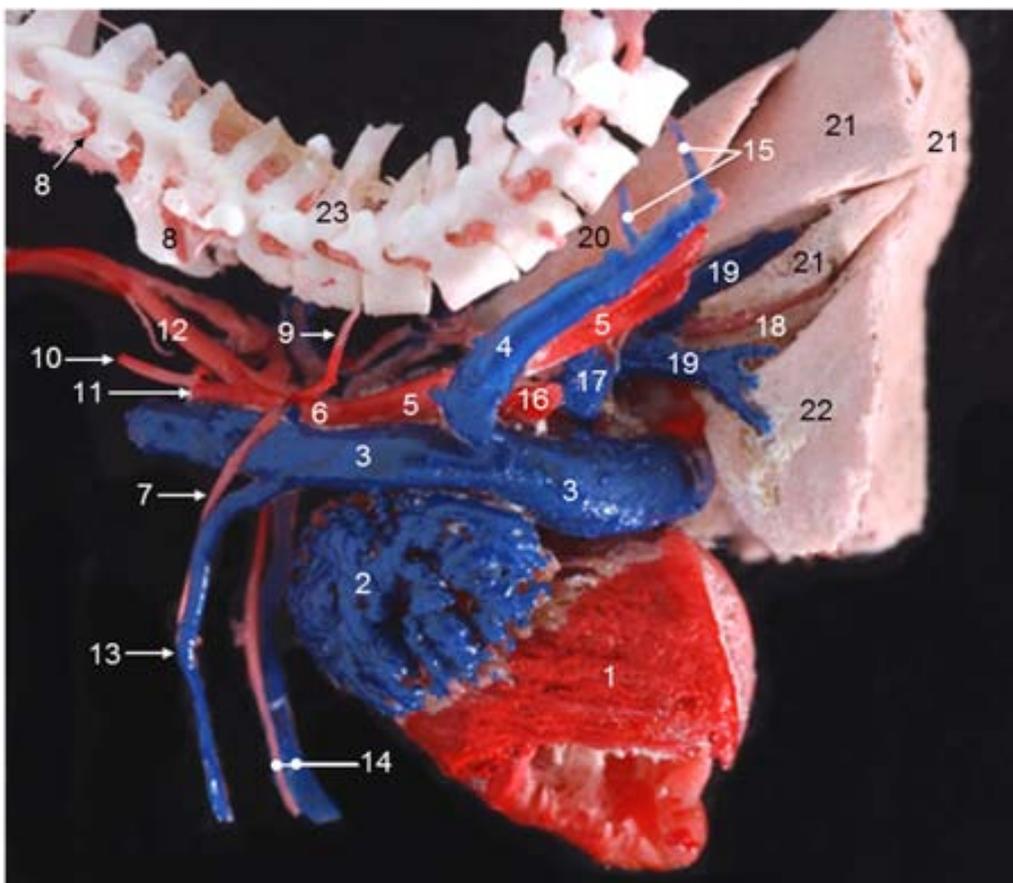


Fig. 7. Venas del tórax. Inyección con Araldit® y maceración de los tejidos con pancreatina. Visión lateral izquierda después de retirar el pulmón izquierdo. 1: ventrículo izquierdo; 2: atrio (aurícula) izquierdo; 3: v. cava craneal izquierda; 4: v. azigos izquierda; 5: aorta torácica; 6: a. subclavia izquierda; 7: a. torácica interna; 8: a. vertebral; 9: tronco costocervical; 10: a. cervical superficial; 11: a. axilar; 12: a. carótida común izquierda; 13: v. torácica interna izquierda; 14: a. y v. torácica interna derechas; 15: vv. intercostales dorsales y aa. intercostales dorsales; 16: a. pulmonar izquierda (cortada); 17: v. pulmonar izquierda (cortada); 18: rama del lóbulo caudal (a. pulmonar derecha); 19: vv. pulmonares derechas; 20: lóbulo craneal (pulmón derecho); 21: lóbulo caudal (pulmón derecho); 22: lóbulo accesorio (pulmón derecho); 23: T2.

Tanto la topografía de la aorta en el tórax como el patrón de ramificación del arco aórtico del ratón, presentan más analogías con los humanos que las existentes entre el hombre y otras especies animales usadas en investigación como el perro (Warwick y Williams 1973; Evans 1993; Rivero et al. 2005; Contreras et al. 2008; Contreras et al. 2010).

La aorta abdominal en el ratón da las mismas ramas viscerales (arteria celíaca, mesentérica craneal, adrenales, renales, ováricas, testiculares, mesentéricas caudales) y parietales (arterias lumbares, frénicoabdominales, circunflejas iliacas profundas) que en el hombre (Warwick y Williams 1973). La aorta abdominal en su parte terminal da lugar a las arterias iliacas comunes y a la arteria caudal media. De las arterias iliacas comunes salen las arterias iliacas internas. Las arterias iliacas externas son la continuación de las iliacas

comunes, que acaban transformándose en arterias femorales. Algunas ramas de las arterias iliacas externas son la arteria circunfleja femoral medial, el tronco pudendoepigástrico y la arteria iliolumbar. La arteria femoral da ramas como la arteria safena, y acaba convirtiéndose en arteria poplítea (Cook 1965; Popesko et al. 1992).

Las arterias renales del ratón son similares a las del perro, situándose la arteria renal derecha más craneal que la izquierda (Cook 1965; Evans 1993).

#### **A.5.4 ANATOMÍA MICROSCÓPICA DE LAS ARTERIAS**

El objetivo general del sistema cardiovascular es proveer sangre a los lechos capilares para lograr la perfusión de todos los órganos. La demanda funcional local es la que determina la naturaleza estructural de la pared vascular (Kierszenbaum 2007). Para conseguir este objetivo, las arterias llevan la sangre desde el corazón a los capilares, almacenando cierta cantidad de la sangre bombeada en cada sístole cardiaca para asegurar un aporte sanguíneo continuo a los capilares durante la diástole (Eurell y Frappier 2006; Kierszenbaum 2007).

Las paredes de las arterias están compuestas por tres capas concéntricas llamadas tunicas: túnica íntima, media y adventicia (Eurell y Frappier 2006; Ross y Pawlina 2006; Young et al. 2006; Kierszenbaum 2007).

La túnica íntima es la capa más interna que contacta con la luz vascular y consta de los siguientes componentes:

- Endotelio. Se trata de un epitelio escamoso simple asociado a una lámina basal. En las arterias, las células endoteliales son alargadas y se distribuyen paralelas al eje longitudinal del vaso. Para formar la lámina epitelial, las células están unidas por uniones estrechas y uniones de hendidura.
- Subendotelio. Está compuesto de tejido conjuntivo laxo y contiene células musculares lisas.
- Lámina elástica interna. Es una capa externa de fibras elásticas fenestradas, que permiten que las sustancias difundan a través de la lámina y alcancen porciones más profundas del vaso.

La túnica media es la capa intermedia, formada principalmente por células musculares lisas y elastina. La elastina se organiza formando láminas

fenestradas concéntricas (fibras elásticas, *lamellae*) entre las que se encuentran fibras de colágeno, capas delgadas de matriz extracelular rica en proteoglicanos y células musculares lisas (zona interlamelar). Las fibras elásticas están conectadas entre sí gracias a fibras elásticas delgadas, formando una red tridimensional continua, Estas fibras delgadas también conectan las fibras elásticas con las células musculares lisas (Wagenseil y Mecham 2009). El área formada por una fibra elástica y el contenido de la zona interlamelar adyacente recibe el nombre de unidad lamelar.

Hay que hacer distinción entre elastina y fibras elásticas. La elastina es una proteína distensible con fuerza de tracción baja, responsable de la elasticidad de los vasos sanguíneos. Funciona principalmente como una reserva elástica y distribuye el estrés por toda la pared arterial uniformemente y sobre las fibras de colágeno. La elastina actúa como polímeros que forman parte de las fibras elásticas. Las fibras elásticas son estructuras complejas que contienen elastina y microfibrillas. La elastina, que es el principal componente de las fibras elásticas maduras, tiene un aspecto amorfo al observarla con microscopio electrónico de transmisión y las microfibrillas son unos filamentos que facilitan el ensamblaje de la elastina (Wagenseil y Mecham 2009).

La túnica media se extiende desde la lámina elástica interna hasta la lámina elástica externa, que es una lámina de fibras elásticas que separa la túnica media de la adventicia.

Todos los componentes extracelulares de la túnica media son producidos por las células musculares lisas. Las fibras de colágeno dan soporte a las células musculares lisas y limitan la distensión de la pared vascular (Eurell y Frappier 2006; Kierszenbaum 2007).

La túnica adventicia es la capa más externa de la pared. Está compuesta principalmente por tejido conjuntivo. Sus elementos fundamentales son fibras de colágeno en disposición longitudinal y algunas fibras elásticas. Estos elementos se mezclan progresivamente con el tejido conjuntivo laxo que rodea los vasos. El espesor de la túnica adventicia es muy variable, siendo en la mayor parte del sistema arterial relativamente delgada.

El contenido de colágeno, relativamente alto, de la túnica adventicia ayuda a prevenir rupturas vasculares cuando aumenta la presión arterial (Wagenseil y Mecham 2009). La túnica adventicia de los grandes vasos

contiene *vasa vasorum* –red de pequeños vasos sanguíneos que aporta nutrientes y oxígeno a las células de la pared vascular-, vasos linfáticos y una red de nervios autónomos, *nervi vasorum*, que controla la contracción del músculo liso de la pared vascular (Eurell y Frappier 2006; Kierszenbaum 2007).

Histológicamente, las arterias se clasifican, según el grosor de la pared y según la composición de las tunicas, en tres grupos: arterias elásticas grandes, arterias musculares de tamaño medio y arterias pequeñas y arteriolas.

Se han realizado diversos estudios morfológicos del árbol arterial del ratón, sobre todo en modelos de enfermedades cardiovasculares, que se centran mayoritariamente en la aorta y en las ramas de la aorta en el tórax. Sin embargo, hasta el momento estos estudios se han enfocado más en la caracterización de lesiones vasculares (aterosclerosis, aneurismas, isquemia de miembros inferiores) que en la morfología normal de las arterias (Nakashima et al. 1994; Chow et al. 1996; Seo et al. 1997; Maeda et al. 2000; Jones et al. 2005; Fernandez et al. 2008; Chalothorn y Faber 2010). A partir de estas publicaciones puede concluirse que, en el ratón, la aorta en el tórax y las ramas que salen del arco aórtico, presentan las características propias de las arterias elásticas grandes (Reddick et al. 1994; Rosenfeld et al. 2000). En cambio, la información disponible sobre la morfología normal de la aorta descendente abdominal y de otras arterias como la femoral en el ratón es muy escasa (Wolinsky y Glagov 1969).

#### **A.5.4.1 Arterias elásticas grandes**

Son arterias conductoras, ya que llevan la sangre del corazón a las arterias de tamaño medio que distribuyen la sangre. Tienen dos características principales: reciben sangre del corazón a presión elevada y mantienen una circulación continua, mientras que el corazón bombea la sangre de forma discontinua. Debido a que se distienden durante la sístole cardiaca y vuelven a la normalidad durante la diástole, pueden mantener un flujo sanguíneo continuo a pesar de la actividad intermitente del corazón. Este fenómeno, conocido como efecto Windkessel, ayuda a disminuir la carga cardiaca, disminuye la presión sistólica y maximiza el flujo diastólico a las arteriolas (Kierszenbaum 2007).

Durante la sístole ventricular la sangre sale de los ventrículos hacia las arterias elásticas, distendiendo sus paredes. Esta distensión se ve limitada por las fibras de colágeno de las tunicas media y adventicia. Durante la diástole ventricular, el corazón no genera presión y la pared arterial distendida se retrae, manteniendo la presión arterial y el flujo sanguíneo dentro de los vasos. El retroceso elástico inicial empuja la sangre en sentido anterógrado (alejándola del corazón) y en sentido retrógrado (retorna al corazón). Este flujo sanguíneo retrógrado hace que se cierren las válvulas aórtica y pulmonar, al tiempo que se mantiene el flujo anterógrado que aleja la sangre del corazón (Ross y Pawlina 2006).

Ejemplos de arterias elásticas en el hombre son la aorta y sus ramas más grandes (tronco braquiocefálico, arterias carótidas comunes, arterias subclavias, arterias iliacas comunes) y las arterias pulmonares. En el ratón, como se ha comentado anteriormente, la aorta y las ramas que salen del arco aórtico también son arterias elásticas.

La túnica íntima de las arterias elásticas es relativamente gruesa (en la aorta humana representa el 25% de la pared arterial). La lámina elástica interna no se distingue claramente porque es una de las muchas fibras elásticas de la pared del vaso.

En la túnica media de la aorta descendente torácica del ratón se observan unas 5 unidades lamelares (Wolinsky y Glagov 1967a). La composición de la túnica media de la aorta es importante ya que la relación existente entre todos sus componentes es la responsable de las propiedades viscoelásticas de su pared (Wolinsky y Glagov 1967a; Ushiki 2002).

La presencia de *vasa vasorum* en la túnica media sólo se ha podido demostrar en especies que presentan más de 29 unidades lamelares, y sólo se observa en la porción de la pared que queda por fuera de estas unidades. La región más interna, que no tiene vasos, por lo que se llama zona avascular, se nutre por difusión a partir de los nutrientes de la luz. En el caso del ratón, se considera que toda la pared de la aorta es avascular, ya que su túnica media contiene menos de 29 unidades lamelares (Wolinsky y Glagov 1967b; Wolinsky y Glagov 1969; Langheinrich et al. 2006; Langheinrich et al. 2007; Kampschulte et al. 2010).

Por lo que respecta a otros componentes de la matriz extracelular vascular, en la aorta del ratón se han identificado 17 tipos diferentes de colágeno, siendo los que se expresan con mayor frecuencia el colágeno I, III, IV, V y VI (Wagenseil y Mecham 2009).

La túnica adventicia de las arterias elásticas suele tener menos de la mitad del grosor de la túnica media (Kierszenbaum 2007).

### **A.5.4.2 Arterias musculares de tamaño medio**

Son los vasos que distribuyen la sangre. Proveen sangre de forma selectiva a los diferentes órganos en respuesta a sus necesidades funcionales. La transición de arterias elásticas grandes a arterias musculares es progresiva. Generalmente, en las regiones de transición la cantidad de material elástico disminuye y las células musculares lisas se convierten en el componente predominante de la túnica media. Además, se hace visible una membrana elástica interna prominente, que sirve para distinguir arterias musculares de elásticas (Ross y Pawlina 2006; Kierszenbaum 2007).

Las arterias musculares miden 0,03–1 cm de diámetro en el hombre. Su pared es relativamente gruesa (aproximadamente un 25% del diámetro del vaso). Algunos ejemplos de arterias musculares de tamaño medio en el hombre son la arteria radial, femoral, tibial, poplítea, axilar, esplénica, mesentérica, las arterias coronarias, las cerebrales y las intercostales (Young et al. 2006). No se ha encontrado información de las arterias musculares en el ratón.

La túnica íntima es más delgada que la de las arterias elásticas y contiene una membrana elástica interna prominente. La túnica media es gruesa y está formada principalmente por células musculares lisas, que se distribuyen en forma de espiral, fibras de colágeno, y una cantidad relativamente pequeña de material elástico. La membrana elástica externa separa la túnica media de la adventicia, pero en arterias musculares pequeñas esta lámina puede estar ausente. La túnica adventicia es relativamente gruesa comparada con la de las arterias elásticas. En el hombre, tiene más o menos el mismo grosor que la túnica media (Kierszenbaum 2007).

#### **A.5.4.3 Arterias pequeñas**

Las arterias pequeñas tienen la misma estructura que las arterias más grandes, con algunas características diferenciadoras. El endotelio puede presentar uniones en hendidura entre las células endoteliales y las células musculares lisas de la túnica media. Por otro lado, la túnica adventicia es una capa conjuntiva laxa, delgada y mal definida, que se confunde con el tejido conjuntivo adyacente al vaso. En el hombre, la túnica media de las arterias pequeñas puede presentar alrededor de ocho capas de células musculares lisas (Kierszenbaum 2007).

#### **A.5.4.4 Arteriolas**

En el hombre tienen un diámetro de entre 20 y 130  $\mu\text{m}$ . Son similares a las arterias pequeñas pero, en este caso, la túnica íntima puede tener o no membrana elástica interna y la túnica media contiene de dos a cinco capas concéntricas de células musculares lisas.

Las arteriolas son las últimas ramas del sistema arterial. Se consideran vasos de resistencia y son las principales responsables de la presión sanguínea sistémica. Regulan la distribución de la sangre a los diferentes lechos capilares mediante vasoconstricción y vasodilatación localizada. Las arteriolas están adaptadas estructuralmente para poder contraerse y dilatarse ya que sus paredes contienen células musculares lisas dispuestas de forma circular. La contracción del músculo liso de la pared de la arteriola aumenta la resistencia vascular y reduce o bloquea la entrada de sangre a los capilares. De esta forma se dirige la sangre hacia los lugares donde más se necesita (Ross y Pawlina 2006; Kierszenbaum 2007).

Que haya un flujo sanguíneo constante depende de un mecanismo miogénico: las células musculares lisas de las arteriolas se contraen en respuesta a un aumento de la presión transmural y se relajan cuando esta presión disminuye (Ross y Pawlina 2006; Kierszenbaum 2007).

## **A.6 ECOGRAFÍA DOPPLER VASCULAR ARTERIAL EN EL RATÓN**

En el ratón, hasta el momento no se han realizado estudios ecográficos vasculares arteriales que describan el espectro Doppler y las características hemodinámicas de cada vaso. La información que se presenta a continuación se basa en datos puntuales presentados en distintas publicaciones y, en función de la técnica empleada, muestran resultados dispares o similares entre sí.

### **A.6.1 AORTA ASCENDENTE**

En ratones jóvenes, el diámetro de la base de la aorta, medido mediante ecocardiografía transtorácica, es de aproximadamente  $1,34 \pm 0,10$  mm (media  $\pm$  SD). No se observan diferencias significativas en estos valores según si las medidas se realizan con un abordaje paraesternal derecho o izquierdo (Zhou et al. 2004).

En la aorta ascendente del ratón se ha descrito una velocidad sistólica máxima de 77,4-95,2 cm/s, velocidad media de 15,1-22,7 cm/s, aceleración de entre 4987 y 8413  $\text{cm/s}^2$  y un tiempo de aceleración entre 11,5 y 16,7 ms (Hartley et al. 2000; Strauch et al. 2003; Reddy et al. 2005; Stoyanova et al. 2007; Huo et al. 2008). Estos datos se han conseguido mediante ecografía convencional, ecografía de alta frecuencia y/o modelos matemáticos basados en la información obtenida a partir de ecografía Doppler en animales conscientes y moldes de corrosión (Huo et al. 2008).

### **A.6.2 ARCO AÓRTICO**

El diámetro del arco aórtico en ratones C57BL/6, medido en moldes de corrosión vascular, es de  $1,02 \pm 0,1$  mm (Maeda et al. 2007).

#### **A.6.2.1 Tronco braquiocefálico**

Medidas realizadas mediante moldes de corrosión, modelos matemáticos y/o microCT post mórtem, describen que la longitud media del tronco braquiocefálico en ratones C57BL/6, desde el arco aórtico hasta la bifurcación en arteria carótida común derecha y arteria subclavia derecha, es

de  $1,3 \pm 0,1$  mm, y el diámetro medio es de unos 0,63-0,85 mm (Maeda et al. 2007; Suo et al. 2007; Huo et al. 2008). La velocidad media en el tronco braquiocefálico es de 5,5 cm/s y el flujo medio de 1,87 ml/min (Feintuch et al. 2007; Huo et al. 2008).

#### **A.6.2.2 Arteria carótida común izquierda**

El diámetro interno de las arterias carótidas en sístole cardiaca, medido mediante ecografía de alta frecuencia en plano longitudinal es de  $0,50 \pm 0,05$  mm (Zhou et al. 2002; Suo et al. 2007).

La velocidad media de esta arteria es 7 cm/s y el flujo sanguíneo medio de 1,35 ml/min aproximadamente (Feintuch et al. 2007; Huo et al. 2008). Se ha descrito una velocidad sistólica máxima de  $66 \pm 9$  cm/s (Ni et al. 2008) y un índice de pulsatilidad, medido cerca de su bifurcación, de  $0,832 \pm 0,007$  (Stoyanova et al. 2007).

#### **A.6.2.3 Arteria subclavia izquierda**

Mediante el uso de microCT, moldes de corrosión y modelos matemáticos, se ha descrito que la arteria subclavia izquierda tiene un diámetro medio de 0,56-0,64 mm, una velocidad media de 5,5 cm/s y un flujo sanguíneo de 1,06 ml/min (Feintuch et al. 2007; Suo et al. 2007; Huo et al. 2008).

### **A.6.3 AORTA DESCENDENTE**

La aorta descendente consta de dos porciones: torácica y abdominal.

La aorta descendente torácica tiene un diámetro de aproximadamente 1,09-1,29 mm (Suo et al. 2007). La velocidad sistólica máxima de esta arteria, medida mediante ecografía transtorácica, es de  $60,1 \pm 7,8$  cm/s (media  $\pm$  SD) (Strauch et al. 2003) En ratones conscientes se ha calculado, mediante modelos matemáticos obtenidos a partir de ecografía Doppler y moldes de corrosión, que la velocidad media de esta arteria es de 9,9 cm/s y el flujo medio de 7,73 ml/min (Huo et al. 2008).

En la aorta descendente abdominal se distinguen tres porciones: aorta prerrenal, postrenal y preiliaca.

- Prerrenal. Mediante MRI vascular se ha observado que presenta un flujo de resistencia intermedia, sin componente reverso (Amirbekian et al.

2009). A partir de modelos matemáticos se ha descrito que el diámetro de este segmento aórtico es de unos 0,85 mm, tiene una velocidad media de 16,6 cm/s y un flujo medio de 5,66 ml/min (Huo et al. 2008). Estudios realizados con resonancia magnética (4,7T) han descrito un diámetro de 1,29 mm (rango: 1,21-1,36 mm), una velocidad sistólica máxima de 56,3 cm/s (rango: 51,3-61,3 cm/s), una velocidad media de 17,2 cm/s (rango: 14,8-19,5 cm/s), un flujo medio de 15,3 ml/min (rango: 13,0-17,6 ml/min) y un flujo máximo de 49,3 ml/min (rango: 44,6-54,1 ml/min) (Amirbekian et al. 2009).

- Postrenal. Con MRI vascular se ha observado un perfil de velocidad de flujo y resistencia intermedios en esta porción de la aorta (Amirbekian et al. 2009). El área total de la aorta postrenal, medida con resonancia magnética de alto campo (9,4T), es de 0,228 mm<sup>2</sup>, el área de la luz de 0,115 mm<sup>2</sup> y el área de la pared de 0,113 mm<sup>2</sup> (Choudhury et al. 2002). Otros estudios realizados mediante MRI (4,7T) han descrito un diámetro de 0,84–0,93 mm, una velocidad sistólica máxima de 43,8-56,0 cm/s, una velocidad media de 15,3–22,5 cm/s, un flujo medio de 5,8-9,2 ml/min y un flujo máximo de entre 17,8 y 25,3 ml/min (Amirbekian et al. 2009).

- Preiliaca. Su diámetro medio, medido en ratones conscientes a partir de modelos matemáticos, es de 0,72 mm, la velocidad media de 5,6 cm/s y el flujo medio de 1,37 ml/min (Huo et al. 2008).

#### **A.6.4 ARTERIA RENAL**

Tiene un diámetro de unos 0,58 mm (Huo et al. 2008). La velocidad sistólica máxima de las arterias renales es de 53,3 ± 12,2 cm/s y la velocidad diastólica final de 15,7 ± 3,8 cm/s (Reddy et al. 2005; Bonnin et al. 2008). El flujo arterial en ratones de 36 ± 0,8 gramos, realizando mediciones invasivas con transductores de flujo colocados alrededor de la arteria renal, es de 6,3-7,6 ml/min por gramo de peso renal (peso de un riñón: 0,33 ± 0,01 g aproximadamente) (Gross et al. 1998). En ratones conscientes se ha descrito, mediante modelos matemáticos, que el flujo medio de la arteria renal es de 1,11 ml/min (Huo et al. 2008).

### A.6.5 ARTERIA FEMORAL

No hay datos hemodinámicos cualitativos ni cuantitativos, obtenidos mediante ecografía de alta frecuencia, disponibles de esta arteria en el ratón.

## A.7 BIOLOGÍA DE LA FAMILIA DE LAS SIRTUINAS

La historia de las sirtuinas se inició con el descubrimiento del gen *Sir2* (Silent Information regulador 2) hace ya más de treinta años en *Saccharomyces cerevisiae* (Klar et al. 1979). A lo largo de estos años, se ha establecido bien su papel, tanto en la desacetilación dependiente de NAD<sup>+</sup> (Imai et al. 2000) como en la regulación de la silenciación de la cromatina delimitando las regiones de cromatina transcripcionalmente activas (eucromatina) e inactivas (heterocromatina) (Gasser 2001; Gasser y Cockell 2001; Cheng et al. 2003; Denu 2003). Uno de los hallazgos de mayor impacto en relación a *Sir2*, consistió en demostrar cómo la sobreexpresión de este gen permitía prolongar la vida de *Saccharomyces cerevisiae* cerca de un 30%, al silenciar ciertas regiones de la cromatina telomérica (Sinclair et al. 1997; Kaeberlein et al. 1999) mediante la desacetilación de sus histonas (Grunstein 1998; Haigis y Sinclair 2010).

Distintos genes similares a *Sir2*, los *Sir2-like genes*, han sido descubiertos en la mayoría de los organismos, incluyendo bacterias, plantas y animales, constituyendo una amplia y antigua familia de genes denominados sirtuinas. También en estos organismos, las sirtuinas han demostrado actuar como promotores de la supervivencia (Sinclair et al. 2006; Michan y Sinclair 2007) permitiendo con su sobreexpresión aumentar de forma importante la esperanza de vida de hongos (Kaeberlein et al. 1999), gusanos (Tissenbaum y Guarente 2001) y moscas (Rogina y Helfand 2004). Además, la restricción calórica, procedimiento eficaz para aumentar la esperanza de vida en muchos organismos (Weindruch y Walford 1982; Lakowski y Hekimi 1998; Mair et al. 2003; Michan y Sinclair 2007), requeriría para prolongar la vida en el caso de los hongos y de las moscas de la activación de *Sir2* (Rogina y Helfand 2004). No obstante, algunos estudios han sugerido que la restricción calórica podría llegar a prolongar la vida de ciertos organismos a través de mecanismos independientes de *Sir2* (Kaeberlein et al. 2004; Fabrizio et al. 2005). En

conjunto, todos estos resultados han llevado a la hipótesis que *Sir2* es un gen de longevidad, evolutivamente conservado y que mediaría los efectos de la restricción calórica.

En los mamíferos, *Sir2* está representado por 7 genes homólogos (*Sirt1-7*). Cada sirtuina estaría caracterizada por un dominio catalítico conservado de 275 aminoácidos (Michan y Sinclair 2007). De los siete *Sirts*, *Sirt1* es probablemente el ortólogo por excelencia de *Sir2*, ya que es el que presenta una mayor similitud de secuencia (Frye 2000). *Sirt1* controlaría distintos procesos biológicos, tales como la diferenciación celular (Fulco et al. 2008), apoptosis (Luo et al. 2001), autofagia (Lee et al. 2008), senescencia (Herranz y Serrano 2010; Li et al. 2011a), desarrollo (Cheng et al. 2003), cáncer (Kim y Um 2008), metabolismo (Picard et al. 2004) y ritmos circadianos (Asher et al. 2008). Además, modularía estas distintas funciones mediante la desacetilación de diversos sustratos, incluyendo histonas, enzimas, factores de transcripción, así como componentes de las cascadas de señales de transducción (Michan y Sinclair 2007).

#### **A.7.1 FUNCIONES ESPECÍFICAS DE SIRT1 SOBRE EL CORAZÓN**

*Sirt1* tiene un papel específico durante el desarrollo embrionario (Cheng et al. 2003). Los embriones de ratones mutantes homocigotos son más pequeños que los ratones silvestres en cualquier fase del desarrollo embrionario, pueden presentar exencefalia y tienen un número reducido de espermatozoides (McBurney et al. 2003). Cheng et al. (2003) describieron la presencia de lesiones cardíacas en los embriones mutantes homocigotos, como defectos en el septo interventricular, defectos en el septo interatrial y lesiones valvulares. Sin embargo, no observaron defectos cardíacos evidentes en los ratones mutantes homocigotos que llegan a la edad adulta. Estos resultados sugieren que *Sirt1* juega un papel importante en la formación de los septos cardíacos y que parte de la elevada letalidad neonatal de los ratones mutantes homocigotos podría explicarse por la presencia de defectos en el corazón.

*Sirt1* protege contra apoptosis y tiene un papel fundamental en la mediación de la supervivencia de cardiomiocitos y neuronas sometidos a estrés *in vitro* (Pillai et al. 2005).

En el corazón de ratones adultos no transgénicos, la expresión de *Sirt1* aumenta en respuesta a sobrecarga de presión o a estrés oxidativo (Alcendor et al. 2007). Para demostrar el efecto que tiene SIRT1 sobre el corazón adulto, se han generado ratones transgénicos que sobreexpresan *Sirt1* de forma específica en el corazón (Tg-Sirt1). En estos individuos, la expresión leve-moderada de *Sirt1* en el corazón atenúa la inducción de hipertrofia cardíaca secundaria a envejecimiento, la apoptosis y fibrosis cardíaca y la expresión de marcadores de senescencia. Es decir, tiene un efecto atenuante en la aparición de disfunción ventricular. Estos resultados sugieren que *Sirt1* puede tener una función reguladora del envejecimiento específica en el corazón (Alcendor et al. 2007; Hsu et al. 2008).

Otros autores han demostrado mediante estudios *in vitro* que la activación de *Sirt1* previene el desarrollo de hipertrofia cardíaca y protege a los cardiomiocitos de alteraciones metabólicas y procesos inflamatorios mediante la activación de PPAR $\alpha$  (*peroxisome proliferator activated receptor- $\alpha$* ) (Planavila et al. 2011).

*Sirt1* aumenta la actividad de PGC-1 $\alpha$  (*peroxisome proliferator-activated receptor y coactivator 1 $\alpha$* ) lo que da lugar al incremento del suministro de mitocondrias nuevas en las células. Además, mediante regulación por autofagia, *Sirt1* tiene un papel importante en la limpieza de mitocondrias viejas o alteradas (Lee et al. 2008; Li et al. 2011b). Por tanto, *Sirt1* tiene un efecto importante en la regulación del flujo de las mitocondrias en las células. La actividad de *Sirt1* en el mantenimiento y rejuvenecimiento de las mitocondrias se relaciona con el control del proceso de envejecimiento. Las mitocondrias son las encargadas de producir energía en la célula dando lugar a la formación secundaria de especies reactivas de oxígeno, que a su vez pueden lesionar a la propia mitocondria, al DNA mitocondrial y a la célula (estrés oxidativo) (Wallace 2005). Por tanto, el papel regulador de *Sirt1* en la renovación mitocondrial es importante para combatir el estrés oxidativo y sus consecuencias en la célula.



## **B. MATERIAL Y MÉTODOS**



Todos los experimentos realizados en este estudio se sometieron a la evaluación de la Comissió Ètica en l'Experimentació Animal i Humana (CEEAH) de la Universitat Autònoma de Barcelona y fueron aceptados bajo licencia CEEAH 724/08 (DMAH 4666) siguiendo la normativa española RD 1201/05 y la Directiva de la Unión Europea 86/609 sobre protección en el uso de animal de experimentación.

## B.1 MATERIAL

Incluye los animales estudiados y el instrumental y los equipos empleados.



Fig. 8. Ratón adulto de cepa endogámica C57BL/6.

### B.1.1 ANIMALES

Se utilizaron dos tipos de animales diferentes para cada uno de los estudios:

- 27 ratones sanos (*Mus musculus*, 10 machos y 17 hembras), adultos (8 semanas de edad), de la cepa endogámica C57BL/6, con un peso de entre 17 y 25 gramos (Fig. 8), que fueron suministrados por el Servicio de Estabulación de Ratones del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (SER-CBATEG) de la Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). En estas instalaciones el fotoperiodo es artificial, con 12 horas de luz (8:00-20:00) y 12 horas de oscuridad (20:00-8:00). Las condiciones de temperatura y humedad se mantienen constantes gracias a mecanismos informatizados (20-21°C, 50-60% de humedad ambiental). Los animales se alimentan *ad libitum* con una dieta

comercial estándar (Teklad 2018S Harlan Teklad, Blackthorn, UK) y tienen acceso libre a la bebida.

- 30 ratones cedidos por el Dr. Francesc Villarroya, catedrático del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de Barcelona. Los ratones *Sirt1*<sup>Δex4/Δex4</sup> presentan una proteína SIRT1 mutada que afecta parte de su dominio catalítico (Cheng et al. 2003). Como puede observarse en el Western Blot de la Figura 9, el mutante *Sirt1*<sup>Δex4/Δex4</sup> no presenta la banda característica de la proteína SIRT1 funcional observada en los ratones silvestres.

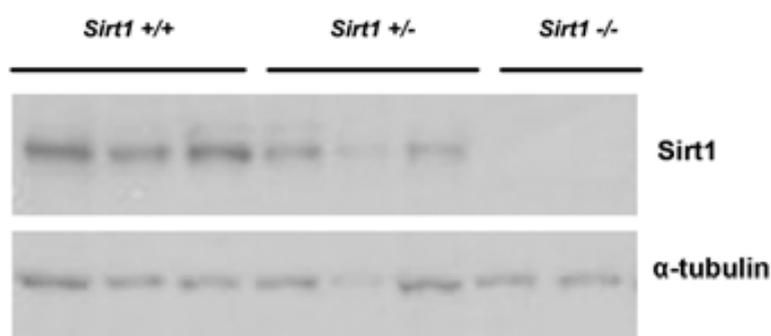


Fig. 9. Análisis de la expresión de *Sirt1* por Western Blot. *Sirt1* +/+ : ratón silvestre; *Sirt1* +/- : mutante heterocigoto; *Sirt1* -/- : mutante homocigoto.

Para este estudio se generó una colonia de la cual se utilizaron 8 grupos de animales de 4 meses de edad y cuatro grupos de animales recién nacidos (P0) (Tabla 1):

- Ratones silvestres o *Sirt1* +/+ (n=8 adultos y 4 P0).
- Ratones mutantes heterocigotos o *Sirt1* +/- (n=8 adultos y 4 P0).
- Ratones mutantes homocigotos o *Sirt1*<sup>Δex4/Δex4</sup> -/- (n=8 adultos y 4 P0).

### B.1.2 INSTRUMENTAL Y EQUIPOS

El material que se ha utilizado pertenece a la Unidad de Morfología del Centro de Biotecnología Animal y Terapia Génica (CBATEG), a la Unidad de Anatomía y Embriología de la Facultad de Veterinaria, al Servicio de Resonancia Magnética Nuclear y al Servicio de Microscopía, todos ellos pertenecientes a la Universitat Autònoma de Barcelona.

	n	Edad	PV (media, rango)
<b><i>Sirt1</i> +/- adulto</b>	8	4 m	27,9 g (22,8-33,6)
<b><i>Sirt1</i> +/- P0</b>	4	1 d	1,9 g (1,8-2,0)
<b><i>Sirt1</i> +/- adulto</b>	8	4 m	29,8 g (21,8-39,9)
<b><i>Sirt1</i> +/- P0</b>	4	1 d	1,9 g (1,8-2,0)
<b><i>Sirt1</i> -/- adulto</b>	8	4 m	27,9 g (14,3-27,7)
<b><i>Sirt1</i> -/- P0</b>	4	1 d	1,2 g (1,0-1.4)

Tabla 1. Edad (m: meses, d: días) y peso vivo (PV) de los ratones silvestres, heterocigotos y homocigotos para *Sirt1*.

Se han utilizado los siguientes equipos e instrumentos:

### B.1.2.1 Equipo de ultrasonografía

El estudio ultrasonográfico se realizó con un ecógrafo de alta frecuencia (Vevo<sup>®</sup> 770, VisualSonics, Toronto, Canadá) equipado con dos sondas mecánicas RMV<sup>™</sup> (Real-Time Micro Visualization): una de 30 MHz (RMV-707B) y otra de 40 MHz (RMV-704) (Fig. 10).

#### Especificaciones de las sondas ecográficas:

- RMV-707B:
  - Frecuencia central: 30 MHz.
  - Distancia focal: 12,7 mm.
  - Ecografía bidimensional:
    - Campo de visión máximo: 16,5 mm X 16,5 mm.
    - Resolución espacial: 115  $\mu$ m (lateral) x 55  $\mu$ m (axial) en la zona focal.
  - Ecografía Doppler pulsado:
    - Frecuencia de repetición de pulso máxima: 96 kHz.
- RMV-704:
  - Frecuencia central: 40 MHz.
  - Distancia focal: 6 mm.
  - Ecografía bidimensional:
    - Campo de visión máximo: 14,5 mm X 14,5 mm.
    - Resolución espacial: 80  $\mu$ m (lateral) x 40  $\mu$ m (axial) en la zona focal.
  - Ecografía Doppler pulsado:
    - Frecuencia de repetición de pulso máxima: 40 kHz.

Se usó el protocolo *Vascular* del paquete de mediciones *VisualSonics Cardiac Measurements*, disponible en el software del equipo, tanto para la localización anatómica de los vasos como para la recogida de datos.

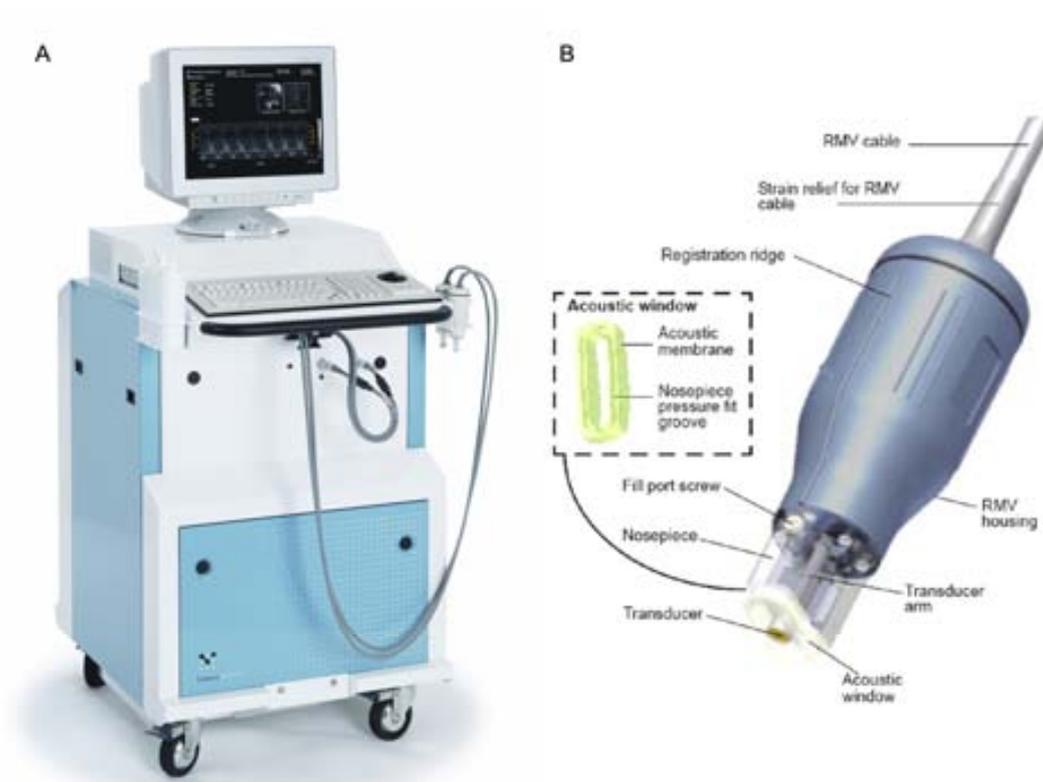


Fig. 10. A. Ecógrafo de alta frecuencia Vevo® 770. B. Sonda mecánica RMVTM (Real-Time Micro Visualization).

### B.1.2.2 Resonancia magnética de alto campo/espectroscopía (MRI)

El estudio se llevó a cabo con un sistema Bruker Biospec de 7T, equipado con una bobina de volumen de 7,2 cm de diámetro interno.

### B.1.2.3 Material general para los estudios *in vivo*

- Anestesia: Isoflurano (Isoflo® Abbot Laboratories. Veterinaria Esteve, Barcelona, España).
- Plataforma caliente: SA-11093 Mouse Platform (VisualSonics).
- Monitor de anestesia: Physiological Controller Unit, THM100 (VisualSonics).
- Termómetro rectal: Indus Instruments (Huston, USA).
- Lágrima artificial: Viscotears® (Novartis Farmacéutica, S.A. Barcelona, España).

- Crema depilatoria: Nair<sup>®</sup> Hair removal cream (Church & Dwight Canada Corp. Mississauga, ON, Canada).
- Gel de ecografía: Transonic-Gel<sup>®</sup> (Telic. S.A. Barcelona, España).

#### **B.1.2.4 Material para la eutanasia y procesamiento post mórtem**

- Heparina sódica 5% (Laboratorios Farmacéuticos Rovi, S.A. Madrid, España).
- Isoflurano: Isoflo<sup>®</sup> (Abbot Laboratories. Veterinaria Esteve).
- Catéter de 25G (Valu-Set<sup>™</sup>. Becton Dickinson Infusion Therapy Systems INC, Utah, USA).
- Tampón fosfato salino (PBS, *phosphate buffered saline*): 7.79 g NaCl + 1.54 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2H<sub>2</sub>O + 0.27 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O + 1000 ml H<sub>2</sub>O destilada, pH=7,4.
- Formol tamponado al 10% (NBF 10%, *neutral buffered formalin*): 100 ml formaldehído al 37% + 4 g NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> H<sub>2</sub>O + 6.5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> + 900 ml H<sub>2</sub>O destilada, pH=7.

#### **B.1.2.5 Microscopios y lupas**

- **Microscopios estereoscópicos (lupas):**
  - Nikon SMZ-800 (Nikon Corp., Tokio, Japón).
  - Nikon SMZ-1000 (Nikon Corp.).
- **Microscopio óptico con sistema de epifluorescencia:** Nikon Eclipse E-800 (Nikon Corp.).
- **Microscopio de láser confocal:** Leica TCS-SP2 AOBS (Leica Micro systems GmbH., Heidelberg, Alemania).
- **Microscopio electrónico de Transmisión (MET):** Hitachi H-7000 (Hitachi, Tokio, Japón).

#### **B.1.2.6 Cámaras digitales**

- Nikon digital camera DXM 1200 F (Nikon Corp., Tokio, Japón).
- Soft Imaging System CC-12 (Olympus Soft Imaging Solutions GmbH., Münster, Alemania).

### **B.1.2.7 Material general de laboratorio**

- Centrífuga 5702R (Eppendorf, Hamburg, Alemania).
- Sistema agitador UNIMAX-1010, incubador INKUBATOR-1000 y vórtex REAX-top (Heidolph instruments, Schwabach, Alemania).
- Microtomo Shandon Retraction AS325 (Rankin Biomedical Corporation, Holly, MI).
- Ultramicrotomo Leica EM UC6 (Leica Microsystems GmbH, Heidelberg, Alemania).
- Centro de inclusión modular AP280: cryo consola AP280-1 y consola dispensadora AP280-2 (Especialidades médicas Myr SL, Tarragona).
- PHmetro PHM210 Standard (Radiometer analytical SAS, Villeurbanne Cedex, Francia).

## **B.2 MÉTODOS**

Se incluyen los estudios de imagen *in vivo*, mediante ecografía de alta frecuencia y MRI, y los estudios morfológicos y morfométricos post mórtem.

### **B.2.1 ANESTESIA Y PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES**

Los animales fueron anestesiados para su estudio *in vivo* mediante ecografía o MRI.

#### **B.2.1.1 Estudio ecográfico**

Los estudios ecográficos se realizaron entre las 9 y las 11 AM, en 27 ratones C57BL/6 adultos. Los animales no fueron sometidos a ayuno previo.

#### **Protocolo anestésico**

Los ratones fueron ecografiados bajo anestesia general durante un periodo máximo de una hora.

- Inducción anestésica:  
Se realizó mediante cámara de inducción anestésica utilizando una mezcla de isoflurano al 3% en oxígeno al 100%.
- Mantenimiento anestésico:

Se realizó mediante mascarilla anestésica utilizando una mezcla de isoflurano al 1-1,5% en oxígeno al 100%.

### Monitorización anestésica y preparación del animal

Los ratones se colocaron en posición supina sobre una plataforma caliente para mantener su temperatura corporal (Fig.11).

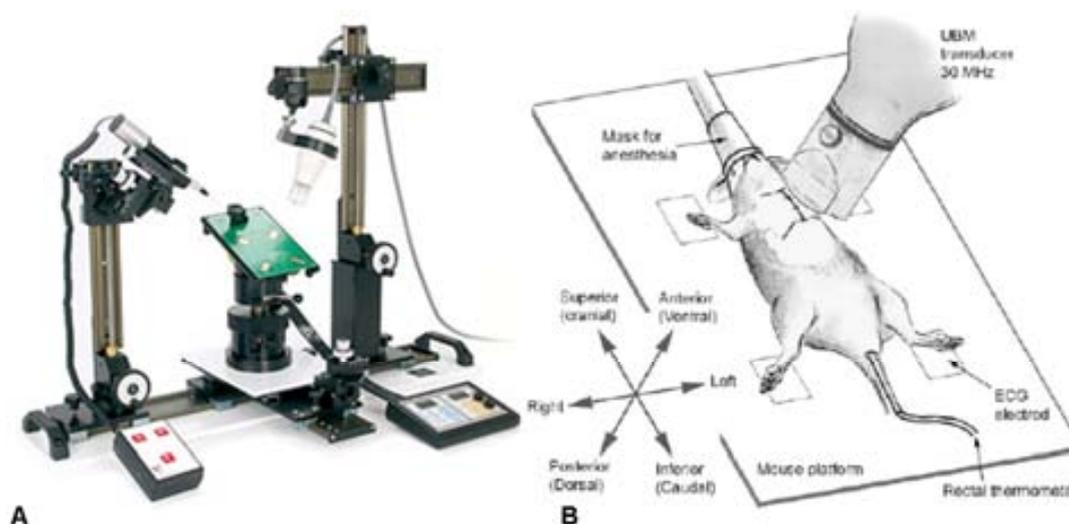


Fig. 11. A. Sistema SA-11093 Mouse Platform (VisualSonics), que consta de una plataforma caliente donde se coloca al ratón para mantener su temperatura corporal y monitorizar sus constantes vitales; de una grúa para manipular de forma semiautomática el transductor, realizando movimientos micrométricos; y, de forma opcional, de un sistema de microinyección. B. Esquema en el que se muestra el posicionamiento de un ratón anestesiado con mascarilla sobre la plataforma caliente, con las cuatro extremidades en contacto con los electrodos y una sonda rectal para monitorizar la temperatura corporal. Modificado a partir de Zhou et al. (2004).

Las cuatro extremidades estaban en contacto con electrodos para monitorizar la frecuencia respiratoria, cardíaca y el electrocardiograma. La temperatura corporal se controló a través de un termómetro rectal manteniéndola entre 36°-38°C gracias a la plataforma caliente (Fig.11). Se aplicó lágrima artificial sobre las córneas de los ratones para evitar su desecación.

Se depiló el pelo de la región torácica, abdominal y de la cara medial de la extremidad posterior izquierda con crema depilatoria. Como medio de contacto se aplicó gel de ecografía atemperado sobre la piel del ratón.

El estudio ecográfico se inició una vez estabilizadas las constantes del animal. Las mediciones vasculares se realizaban controlando que la frecuencia cardíaca fuera superior a 400 latidos por minuto y que el gasto cardíaco tuviese valores fisiológicamente normales (mayor a 20 ml/min. Datos no incluidos en los resultados de esta memoria) (Fentzke et al. 1997; Doevendans et al. 1998;

Yang et al. 1999; Janssen et al. 2002; Wong et al. 2002; Zhou et al. 2002; Strauch et al. 2003; Janssen et al. 2004; Stypmann et al. 2006; Stoyanova et al. 2007; Baumann et al. 2008).

### **B.2.1.2 MRI**

Los estudios de MRI se realizaron en 15 ratones adultos (*Sirt1* +/+, n= 5; *Sirt1* +/-, n=5; *Sirt1* -/-, n=5) durante la mañana. Los animales no fueron sometidos a ayuno previo. El protocolo anestésico empleado fue igual al del estudio ecográfico. La frecuencia respiratoria se monitorizó mediante una almohadilla sensora colocada bajo la caja torácica. La temperatura corporal se controló con un termómetro rectal de fibra óptica, y se mantuvo a 37° gracias a un sistema de baño caliente en circulación.

### **B.2.2 ESTUDIO MORFOLÓGICO Y FUNCIONAL MEDIANTE ECOGRAFÍA DE ALTA FRECUENCIA**

La realización del estudio ecográfico se llevó a cabo entre dos operarios cuyas funciones fueron las siguientes:

- Operario 1: manipulación del ratón y de la sonda ecográfica y postproceso de los datos obtenidos durante el estudio.
- Operario 2: manejo del teclado del ecógrafo para la toma de muestras del Doppler ajustando la localización y las ventanas, realización de las medidas de diámetro vascular en modo B y etiquetado de las imágenes almacenadas, así como de los vídeos.

En el tórax se utilizó la sonda ecográfica RMV-707B, de 30 MHz de frecuencia central; y en el abdomen la sonda ecográfica RMV-704, de 40 MHz de frecuencia central.

#### **B.2.2.1 Vasos estudiados**

Se realizó el estudio de la aorta, de las ramas del arco aórtico, arteria renal derecha y arteria femoral izquierda (Fig. 12):

- Aorta ascendente. Se realizaron medidas en los 27 animales del estudio en un punto intermedio entre la válvula aórtica y el orificio del tronco braquiocefálico.

- Arco aórtico. Se realizaron medidas en 14 de los 27 animales totales (5 hembras y 9 machos). Se estudiaron tres localizaciones en el arco:
  - Cerca del orificio del tronco braquiocefálico.
  - Cerca del orificio de la arteria carótida común izquierda.
  - Cerca del orificio de la arteria subclavia izquierda.
- Aorta descendente torácica. Se realizaron las medidas en 23 de los 27 animales totales (14 hembras y 9 machos), en una localización inmediatamente caudal al orificio de la arteria subclavia izquierda.
- Aorta descendente abdominal. Se realizaron las medidas en tres puntos diferentes de su recorrido en el abomen.
  - Aorta prerenal. Medidas realizadas en un punto craneal al polo craneal del riñón derecho.
  - Aorta postrenal. Medidas realizadas caudal a la salida de la arteria renal izquierda.
  - Aorta preiliaca. Medidas realizadas en un punto craneal a la bifurcación de las arterias iliacas comunes.
- Tronco braquiocefálico. Se realizaron las medidas en todos los animales del estudio, cerca del punto de salida del arco aórtico.
- Arteria carótida común izquierda. Se realizaron las medidas en todos los animales del estudio, cerca del punto de salida del arco aórtico.
- Arteria subclavia izquierda. Se realizaron las medidas en todos los animales del estudio, cerca del punto de salida del arco aórtico.
- Arteria renal derecha. Medidas realizadas cerca de la unión con la aorta.
- Arteria femoral izquierda. Medidas realizadas en la región inguinal.

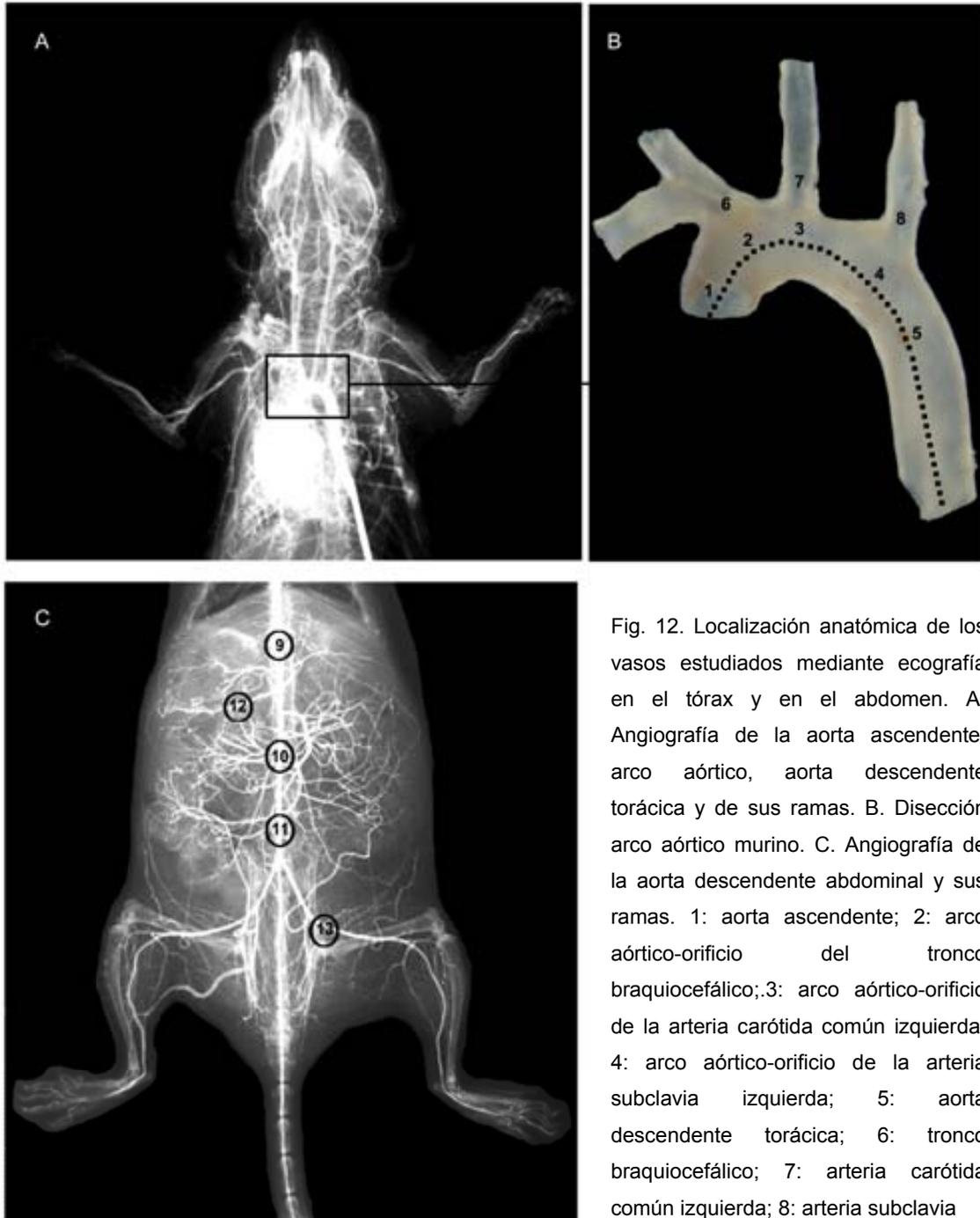


Fig. 12. Localización anatómica de los vasos estudiados mediante ecografía en el tórax y en el abdomen. A. Angiografía de la aorta ascendente, arco aórtico, aorta descendente torácica y de sus ramas. B. Disección arco aórtico murino. C. Angiografía de la aorta descendente abdominal y sus ramas. 1: aorta ascendente; 2: arco aórtico-orificio del tronco braquiocefálico; 3: arco aórtico-orificio de la arteria carótida común izquierda; 4: arco aórtico-orificio de la arteria subclavia izquierda; 5: aorta descendente torácica; 6: tronco braquiocefálico; 7: arteria carótida común izquierda; 8: arteria subclavia

izquierda; 9: aorta descendente abdominal prerrenal; 10: aorta descendente abdominal postrenal; 11: aorta descendente abdominal preiliaca; 12: arteria renal derecha; 13: arteria femoral izquierda.

### B.2.2.2 Ecografía en modo bidimensional

Los vasos a estudiar se localizaron con ecografía bidimensional. En cada uno de ellos se evaluó la normalidad del vaso y de su entorno anatómico y se calculó el diámetro luminal (Fig. 13A).

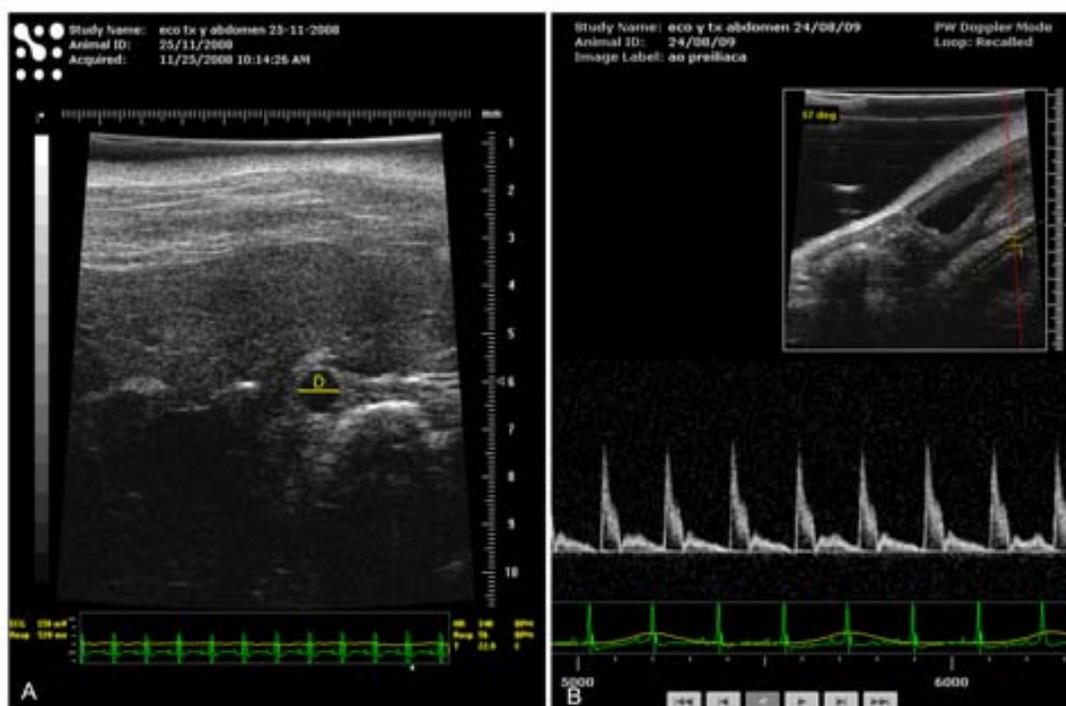


Fig. 13. A. Cálculo del diámetro transverso (D) de la luz vascular en una imagen estática de la aorta abdominal. La medición se efectúa en el momento de máxima distensión vascular. B. Imagen de ecografía dúplex vascular. En la parte superior se muestra una imagen en modo bidimensional, con el volumen de muestra dentro de la luz vascular. En la parte inferior, el espectro Doppler pulsado correspondiente.

### B.2.2.3 Ecografía Doppler pulsado

Una vez localizado el vaso de interés en modo B se rotaba la sonda ecográfica  $90^\circ$  con el objetivo de obtener un plano longitudinal del vaso. La sonda ecográfica y la plataforma donde se encontraba el ratón se orientaban hasta obtener un ángulo Doppler menor a  $60^\circ$ . Mediante examen Doppler dúplex (ecografía bidimensional + Doppler pulsado) se colocaba el volumen de muestra en la luz entera del vaso (método de insonación uniforme) y se obtenía el espectro Doppler correspondiente (Fig. 13B) (Szatmari et al. 2001).

Las imágenes obtenidas en modo B y mediante ecografía Doppler pulsado (imágenes estáticas y dinámicas) fueron archivadas en el disco duro del ecógrafo para el procesamiento posterior de los datos.

### B.2.3 ESTUDIO MORFOLÓGICO MEDIANTE MRI

Se realizó un estudio de la morfología del corazón *in vivo* mediante MRI de alto campo.

Se obtuvieron imágenes de referencia en plano transversal, sagital y

dorsal, usando una secuencia de gradiente eco con *gating* respiratorio (FLASH: Fast Low Angle Shot) con el objetivo de escoger una sección de dos cámaras (plano transversal) y otra de cuatro cámaras (plano dorsal) del corazón.

Los parámetros utilizados en estas secuencias fueron los siguientes:

- Tiempo de repetición (TR): 70ms.
- Tiempo de eco (TE): 2,8 ms.
- *Flip angle* ( $\alpha$ ):  $10^\circ$ .
- Tamaño de la matriz: 128 x 128.
- Campo de visión (FOV): 3 x 3 cm<sup>2</sup>.
- Grosor del corte (ST): 1mm.
- Número de cortes: 9.
- Tiempo de adquisición por imagen: 2 minutos 30 segundos.

Después de esto, se obtuvieron imágenes de dos y de cuatro cámaras del corazón, con una secuencia IntraGate FLASH con los siguientes parámetros:

- TR: 6 ms.
- TE: 3,15 ms.
- *Flip angle* ( $\alpha$ ):  $10^\circ$ .
- Número de repeticiones: 420.
- Tamaño de la matriz: 128 x 128.
- FOV: 2,56 x 2,56 cm<sup>2</sup>.
- ST: 1mm.
- Tiempo de adquisición: 5 minutos 38 segundos.

La reconstrucción retrospectiva de las imágenes se llevó a cabo utilizando una herramienta de reconstrucción IntraGate (ParaVision 4.0 Software) que determina los ciclos respiratorios y cardiacos y construye las reconstrucciones a partir de 7 imágenes.

En cada una de las secuencias se estudió la morfología cardíaca, prestando especial atención a las válvulas cardíacas.

#### **B.2.4 EUTANASIA Y PROCESAMIENTO POST MÓRTEM**

Una vez finalizados los estudios *in vivo* y con el animal bajo anestesia general, se inyectó por vía intraperitoneal 0,1 ml de heparina sódica al 5%. Diez

minutos más tarde se procedió a la eutanasia del animal, por sobredosis de anestésico inhalatorio (isoflurano).

#### **B.2.4.1 Disección**

Se realizó la disección del animal para acceder a la cavidad torácica y abdominal utilizando microscopios estereoscópicos. Se canuló la aorta en sentido craneal y caudal con un catéter de 25G. Posteriormente se inyectó 1 ml de PBS en cada sentido para lavar el sistema circulatorio y después se inyectó NBF al 10% para fijar el ratón.

Los ratones se conservaron en NBF al 10% hasta la toma de muestras.

En los ratones *Sirt1* +/+ (n=4 adultos y 2 P0), *Sirt1* +/- (n=4 adultos y 2 P0) y *Sirt1* -/- (n=4 adultos y 2 P0) en los que se realizó el estudio del miocardio mediante microscopía electrónica de transmisión, las muestras se obtuvieron antes de la fijación con NBF al 10%.

Los ratones neonatos se fijaron enteros.

#### **B.2.5 ESTUDIO MORFOLÓGICO**

Dentro de los estudios morfológicos se agrupan dos técnicas diferentes:

- Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas realizadas sobre muestras incluidas en parafina.
- Análisis mediante microscopio electrónico de transmisión de la pared del ventrículo izquierdo.

Los dos estudios anteriores (ecografía vascular y MRI cardiaca) también forman parte de los estudios morfológicos, pero se han separado por tratarse de técnicas *in vivo*. Además, en el caso de la ecografía vascular, el estudio era funcional además de morfológico.

##### **B.2.5.1 Técnicas histológicas e inmunohistoquímicas**

Se realizaron técnicas de histología convencional, examinadas mediante microscopía óptica, y técnicas de inmunohistoquímica, examinadas mediante microscopía láser confocal, de las muestras siguientes incluidas en parafina:

- Arterias: se obtuvieron muestras de menos de 1 cm<sup>3</sup> de las arterias siguientes en seis ratones C57BL/6:
  - Aorta descendente abdominal prerrenal.

- Aorta descendente abdominal postrenal.
- Aorta descendente abdominal preliaca.
- Arteria femoral.

Se hicieron cortes transversales de entre 3 y 5  $\mu\text{m}$  de estas muestras para realizar tinciones histológicas (Hematoxilina/Eosina, Tricrómico de Masson, tinción de PAS, tinción de Verhoeff) e inmunohistoquímicas (Anti- $\alpha$ -SMA y Anti-Colágeno IV).

- Corazón. En el corazón de los ratones adultos *Sirt1* +/+ (n=8), *Sirt1* +/- (n=8) y *Sirt1* -/- (n=8) se realizaron cortes dorsales de un grosor de 3-4  $\mu\text{m}$  para realizar tinciones histológicas (Hematoxilina/Eosina) e inmunohistoquímicas (Anti-Laminina, Anti-MAC-2, Anti-ANP y Anti-BNP).
- Pulmón. Se obtuvieron cortes transversales de un grosor de 3-4  $\mu\text{m}$  de los pulmones de los ratones *Sirt1* +/+ (n=8), *Sirt1* +/- (n=8) y *Sirt1* -/- (n=8) adultos, para realizar una técnica inmunohistoquímica (Anti- $\alpha$ -SMA).
- Tórax de ratones P0 (*Sirt1* +/+, n=4; *Sirt1* +/-, n=4; *Sirt1* -/-, n=4). Se realizaron cortes transversales de 3-4  $\mu\text{m}$  pasando los dos ventrículos cardiacos para realizar la tinción Hematoxilina/Eosina.

En todas estas muestras se siguió el proceso descrito a continuación:

- Fijación: las muestras se fijaron en NBF al 10% durante al menos 24 horas a temperatura ambiente.
- Lavados: se eliminó el fijador con 3-4 lavados en PBS durante 1-2 horas. Los lavados se realizaron en un sistema que mantenía las muestras en agitación.
- Deshidratación y transparentación: las muestras se pasaron por una batería de alcoholes de gradación creciente, desde el alcohol 70° hasta el alcohol absoluto (Panreac Química S.A. Castellar del Vallès, España). Se realizaron dos pasos en cada alcohol, y el tiempo de duración en cada paso fue de 3-4 horas. Finalmente, las muestras se transparentaron en xilol (Panreac) durante 1 hora aproximadamente.

- Inclusión en parafina: para conseguir una buena penetración, las muestras se embebieron en parafina (Vogel. Giessen, Alemania) a 57°C durante 24 horas, realizando un cambio de la parafina durante este tiempo. Seguidamente se confeccionaron los bloques de parafina.
- Cortes: las muestras se cortaron con el microtomo y se montaron en portaobjetos previamente tratados con xilol (Sigma).

Para realizar las técnicas de histología convencional e inmunohistoquímicas, los portaobjetos se desparafinaron pasando por dos soluciones de xilol y una de alcohol absoluto, durante cinco minutos cada una.

Después se sometieron a un proceso de rehidratación pasando por una batería de alcoholes de gradación decreciente, desde alcohol absoluto hasta alcohol 70°. Los pases por cada uno de los alcoholes tuvieron una duración de cinco minutos. Finalmente, las muestras se lavaron con agua destilada y se sometieron a diferentes procesos.

#### **B.2.5.1.1 Tinciones histológicas**

Se realizaron las tinciones siguientes:

- Tinción de Hematoxilina/Eosina (H/E).
- Tinción Tricrómico de Masson-Biebrich Escarlata (TM).
- Tinción de PAS (Ácido periódico-reactivo de Schiff).
- Tinción de Elastina Verhoeff (VH).

#### **Tinción de Hematoxilina-Eosina**

Es la técnica más usada en histología animal y patología convencional. La hematoxilina, que es una sustancia básica, tiñe las estructuras ácidas de color azul violáceo. Los núcleos, ribosomas y el retículo endoplásmico tienen gran afinidad por esta sustancia debido a su elevado contenido en DNA y RNA respectivamente. Por el contrario, la eosina es una sustancia ácida que tiñe de rojo o rosa las estructuras básicas. Muchas proteínas citoplasmáticas son básicas, por lo que generalmente el citoplasma celular se tiñe de rosa o rojo rosáceo (Young et al. 2006). Se siguió el siguiente protocolo para la tinción:

- Hematoxilina de Harris (Sigma-Aldrich Chemie GmbH. Steinheim, Alemania): 5-10 minutos.
- Viraje en agua corriente: 5 minutos.

- Diferenciación con ácido clorhídrico 0,25% (Panreac): 15 segundos.
- Agua corriente: 5 minutos.
- Eosina A (Merck KGaA. Darmstadt, Alemania): 30 segundos-1minuto.
- Deshidratación rápida. Se realizan 2 pases de 15 segundos cada uno por alcohol de 96° y otro pase de 15 segundos por alcohol de 100°.
- Transparentación. Se realizan 2 pases de 5 minutos cada uno por xilol.
- Montaje con Entellan (Merck).

### **Tinción Tricrómico de Masson-Biebrich Escarlata**

Esta tinción se utiliza para demostrar la presencia de tejido conjuntivo, principalmente colágeno. Como indica su nombre, da lugar a tres colores diferentes: los núcleos y otras estructuras basófilas se tiñen de azul; el colágeno se tiñe de azul o de verde según la técnica que se emplee; y el citoplasma, el músculo, los eritrocitos y la queratina se tiñen de rojo brillante (Young et al. 2006). Se siguió el siguiente protocolo para la tinción:

- Las muestras se deben *bouinizar* antes de realizar la tinción.  
Los portaobjetos con los cortes histológicos desparafinados y rehidratados se colocan en *Solución de Bouin* durante toda la noche a temperatura ambiente. Después se limpian con agua destilada hasta que el agua salga clara y se continúa con el proceso.  
La *Solución de Bouin* (pH = 2,2) se prepara a partir de:
  - Solución acuosa saturada de ácido pícrico (Panreac): 750 ml.
  - Formalina concentrada (Panreac) : 250 ml.
  - Ácido acético glacial (Panreac): 50 ml.
- Tinción con Hematoxilina Férrica de Weigert (10 minutos). La solución de trabajo se obtiene a partir de dos soluciones:
  - a. *Solución I*. Contiene:
    - Hematoxilina cristalizada (Merck): 1 g.
    - Etanol 96% (Panreac): 100 ml.
  - b. *Solución II*. Contiene:
    - Cloruro férrico anhidro-FeCl<sub>3</sub>. (Merck): 1,5 g.
    - Agua destilada: 100 ml.

*Solución de trabajo:*

Se mezclan a partes iguales las soluciones I y II. En ese momento la solución se vuelve negra-azulada, y rápidamente vira a negra.

Se prepara en fresco y se le añade 1 ml de ácido clorhídrico concentrado (Panreac).

- Viraje: lavado con agua corriente durante 10 minutos.
- Tinción con Escarlata-Fucsina ácida: 5 minutos. La *Solución Escarlata Fucsina ácida* contiene:
  - Biebrich Escarlata al 1% solución acuosa (Panreac): 90 ml.
  - Fucsina ácida al 1% solución acuosa (Merck): 9 ml.
  - Ácido acético glacial (Panreac): 1 ml.
- Lavado con agua destilada.
- Tratamiento con ácido fosfomolibdico-fosfotúngstico al 2,5% solución acuosa (Sigma): 15 minutos.
- Lavado con agua destilada.
- Tinción con Azul de Anilina durante 15 minutos. La *Solución Azul de Anilina* contiene:
  - Azul de Anilina (Panreac): 2,5 g.
  - Ácido acético glacial (Panreac): 2 ml.
  - Agua destilada: 98 ml.
- Lavado con agua destilada: 15 segundos.
- Diferenciación con ácido acético al 1% solución acuosa (Panreac): 3-5 minutos.
- Deshidratación rápida y montaje.

### **Tinción de PAS**

La tinción de PAS tiñe de color rojo profundo (magenta) los carbohidratos complejos que se encuentran en el interior de las células (Young et al. 2006). Se siguió el siguiente protocolo para la tinción:

- Ácido periódico al 5% (Sigma): 10 minutos.
- Lavado en agua corriente: 10 minutos.
- Reactivo de Schiff (Merck): toda la noche a 4°C.
- Lavado en agua corriente: 10 minutos.
- Contratinción con Hematoxilina Harris (Sigma): 5-10 segundos.
- Lavado en agua corriente: 5 minutos.
- Deshidratación y montaje.

### Tinción de Elastina Verhoeff

Es un método que utiliza como colorantes cloruro férrico, hematoxilina y yodo. Las fibras elásticas se tiñen de negro y los núcleos de color azul o negro (Young et al. 2006). Se siguió el siguiente protocolo para la tinción:

- Tinción con solución Verhoeff: 10-15 minutos.
- Aclarar con agua destilada.
- Diferenciación en Cloruro Férrico 2%: pocos segundos.
- Tiosulfato de sodio 5% (Panreac) en solución acuosa: 1 minuto.
- Lavado en agua corriente: 5-10 minutos.
- Contraste con solución de Van Gieson: 1 minuto.
- Diferenciación con alcohol de 96% (Panreac): pocos segundos.
- Deshidratación rápida, transparentación y montaje.

#### *Soluciones utilizadas:*

a. *Solución Verhoeff.* Se obtiene a partir de:

- Hematoxilina cristalizada (Merck): 1,5 g.
- Alcohol absoluto (Panreac): 33 ml.

Al momento filtrar y añadir:

- Cloruro Férrico 10% (Panreac) en agua: 12 ml.
- Solución yoduro Verhoeff: 12 ml. Esta solución se prepara a partir de:
  - Yoduro potásico (KI) (Sigma): 0,48 g.
  - Agua destilada: 12 ml.
  - Disolver y añadir Yodo (Sigma): 0,24 g.

b. *Solución de Van Gieson.* Se obtiene a partir de:

- Fucsina acida 1% (Merck) en agua: 5 ml.
- Ácido pícrico (Panreac), solución acuosa saturada: 43 ml.
- Ácido acético 1% (Panreac) en agua: 2 ml.

#### **B.2.5.1.2 Técnicas inmunohistoquímicas (IHQ)**

Las técnicas inmunohistoquímicas tienen como fundamento la utilización de anticuerpos, que se unen específicamente a determinados epítopos, permitiendo, de este modo, identificar diferentes tipos celulares o diferentes constituyentes celulares que contengan el epítipo específico. Para la visualización de la unión antígeno-anticuerpo se utiliza como recurso un anticuerpo secundario biotinilado específico para el anticuerpo primario. A la

biotina que presenta este anticuerpo secundario, se le unirá la estreptavidina conjugada a un cromógeno determinado. En todos los casos se incluyeron controles negativos (en los que no se coloca anticuerpo primario) y controles positivos (de muestras en los que se ha demostrado anteriormente la presencia del anticuerpo) para validar la técnica.

En la Tabla 2 aparece el listado de los anticuerpos utilizados, junto con la especificidad y con la casa comercial suministradora.

Anticuerpo	Especificidad	Suministrador
<b>Anti-<math>\alpha</math>-SMA</b>	Células musculares lisas de las paredes vasculares.	Abcam, Cambridge, (UK)
<b>Anti-Colágeno tipo IV</b>	Membrana basal de los vasos sanguíneos.	Millipore, California, (USA).
<b>Anti-Laminina</b>	Membrana basal de los cardiomiocitos y de los vasos sanguíneos.	Dako Cytomation (Dinamarca).
<b>Anti-MAC-2</b>	Macrófagos.	Cedarlane (USA).
<b>Anti-ANP</b>	Péptido natriurético atrial.	Peninsula laboratories, LLC. (USA).
<b>Anti-BNP</b>	Péptido natriurético cerebral.	Phoenix Pharmaceuticals, Inc. (USA).

Tabla 2. Anticuerpos primarios empleados en las técnicas inmunohistoquímicas.

Las muestras se sometieron al proceso siguiente:

- Desparafinación, rehidratación y lavado de las muestras.
  - Dos lavados en xilol (Panreac) de 5 minutos cada uno.
  - Dos lavados en alcohol de 100° y dos lavados en alcohol de 96°, de cinco minutos cada uno (Panreac).
  - Un lavado en alcohol (Panreac) de 80° y otro en alcohol de 70°, de cinco minutos cada uno.
  - Un lavado en agua destilada: 5 minutos.
  - Un lavado en tampón de lavado *Wash buffer* (WB) de cinco minutos. WB: 1000 ml PBS + 1 ml Igepal (Sigma) + 3 g BSA (Albúmina sérica bovina, Sigma).
  - Tres lavados de cinco minutos cada uno en PBI (*phosphate buffered Igepal*, 500 ml PBS+ 500  $\mu$ l Igepal).

- Pretratamiento de las muestras en olla a presión con una mezcla de las soluciones siguientes:
  - 0,283 g ácido cítrico (Panreac) en 13,5 ml de agua destilada.
  - 1,808 g de citrato de sodio (Panreac) en 61,5 ml de agua destilada.

Las muestras permanecieron en ebullición en una mezcla de estas dos soluciones durante 4 minutos. Después de esto se realizaron tres lavados en PBI de cinco minutos cada uno.

- Pretratamiento de las muestras con solución de pronasa (Panreac) al 0,10% (dilución de pronasa al 10% en PBS a concentración 1: 100, durante 10 minutos a 37°C). Sólo en la IHQ Anti-Laminina.
- Incubación de los anticuerpos primarios a 4°C durante toda la noche. Las concentraciones empleadas se muestran en la Tabla 3.

Anticuerpo Primario	Concentración	Solución de incubación
Anti- $\alpha$ -SMA	1:100	WB + 10% de suero de cabra
Anti-Colágeno tipo IV	1:200	WB + 10% de suero de cabra
Anti-Laminina	1:200	WB + 10% de suero de caballo
Anti-MAC-2	1:50	WB + 10% de suero de cabra
Anti-ANP	1:200	WB + 10% de suero de cabra
Anti-BNP	1:200	WB + 10% de suero de cabra

Tabla 3. Anticuerpos primarios, concentración y solución de incubación empleados.

Posteriormente se realizaron tres lavados en PBI de cinco minutos cada uno.

- Incubación de los anticuerpos secundarios a temperatura ambiente durante tres horas. Las concentraciones empleadas se muestran en la Tabla 4.

Después de esto se realizaron tres lavados en PBI de cinco minutos cada uno.

Anticuerpo secundario	Concentración	Solución de incubación
Anti-goat biotina	1:100	WB
Anti-rat biotina	1:100	WB
Anti-rabbit Alexa 568	1:100	WB
Anti-rabbit 488	1:100	WB

Tabla 4. Anticuerpos secundarios utilizados, concentración y solución de incubación. AC2 suministrado por Vector Laboratories, Bermingame, USA.

- Incubación con el fluorocromo (Alexa Fluor<sup>®</sup> 488, Molecular Probes INC, Eugene, USA) a concentración 1:100 en PBS, toda la noche a temperatura ambiente. Este paso se realizó en todas las IHQ excepto en las muestras de pulmón, que se procesaron para el revelado mediante diaminobencidina (DAB) para su análisis con microscopio óptico. En este caso, después de colocar el anticuerpo secundario se sigue el proceso siguiente:
  - Tres lavados con PBI de cinco minutos cada uno.
  - Incubación con Avidina-biotina (Vector Laboratories, LTD. Peterborough, UK), una hora a temperatura ambiente (dilución 1:50).
  - Tres lavados con PBI de 5 minutos cada uno.
  - Un lavado en PO<sub>4</sub> de 5 minutos.
  - Revelado:
    - 5 ml DAB (50 mg) + 95 ml PO<sub>4</sub> + 2μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
    - Técnica de Adams: 5 ml DAB + 2,5 ml 1% CoCl<sub>2</sub> + 2 ml 1% Ni(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 90,5 ml PO<sub>4</sub> + 2μl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.
  - Un lavado en PO<sub>4</sub> de 5 minutos.
  - Un lavado en agua destilada de 5 minutos.
  - Contratinción con eosina.
  - Deshidratación y montaje con Entellan.

En el resto de IHQ, después de la incubación con el fluorocromo, el proceso sigue así:

- Se realizaron tres lavados con PBI de cinco minutos cada uno.

- Contratación de los núcleos con To-pro-3 (TO-PRO<sup>®</sup> iodide, Molecular Probes, Eugene, USA) diluido a concentración 1:100 en PBS, durante cinco minutos a temperatura ambiente.
- Tres lavados con PBI (cinco minutos cada una). Después, se realizó un *jet washed*, lavando el portaobjetos a presión con PBS estéril usando una micropipeta. Se montaron las muestras en Gel/Mount<sup>™</sup> (medio acuoso para fluorescencia. Sigma). Finalmente, los portaobjetos se sellaron con laca de uñas.

#### **B.2.5.1.3 Observación de las muestras**

Para la observación de las muestras se utilizaron los siguientes instrumentos:

- Microscopio óptico con sistema de epifluorescencia.
- Microscopio de láser confocal.
- Cámaras digitales.

#### **B.2.5.2 Análisis mediante microscopio electrónico de transmisión (MET) de la pared del ventrículo izquierdo**

Se obtuvieron muestras de 1 mm<sup>2</sup> de la pared del ventrículo izquierdo de ratones *Sirt1* +/+ (n=4 adultos y 2 P0), *Sirt1* +/- (n=4 adultos y 2 P0) y *Sirt1* -/- (n=4 adultos y 2 P0) para ser procesadas. Estas muestras se sometieron al proceso siguiente:

- Fijación:

Las muestras se fijaron con una solución compuesta por glutaraldehído (Sigma) al 2,5% y paraformaldehído (Sigma) al 2% en H<sub>2</sub>O miliQ, durante 2 horas.

Se lavaron con PBI y se post-fijaron con tetraóxido de osmio (Sigma) al 1% durante 2 horas.

Seguidamente se lavaron con agua destilada.

- Deshidratación e infiltración:

Las muestras se sumergieron en una serie de acetonas (Panreac) en concentración creciente y se añadió gradualmente la resina (Sigma), siguiendo los pasos siguientes:

- Acetona 70%, toda la noche.

- Acetona 80%, 2 pases de 10 minutos cada uno.
- Acetona 90%, 2 pases de 10 minutos cada uno.
- Acetona 96%, 3 pases de 10 minutos cada uno.
- Acetona 100%, 3 pases de 10 minutos cada uno.
- Acetona: resina Spurr 3:1, durante 5 horas.
- Acetona: resina Spurr 2:2, durante toda la noche.
- Acetona: resina Spurr 1:3, durante 5 horas.
- Resina Spurr 100%, durante 2 días.
- Polimerización:

Se realizaron los bloques de resina Spurr y se endurecieron a 60°C durante un mínimo de 48 horas. A partir de estos bloques se cortaron secciones semifinas (1 µm) y después ultrafinas (60-80 nm).

- Los cortes semifinos se tiñeron con azul de toluidina al 0,5% (Panreac). Estos cortes sirvieron para elegir la zona de corte ultrafino.
- Los cortes ultrafinos se contrastaron con citrato de plomo (1,33 g  $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$  + 1,76 g  $\text{Na}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  + 30 ml  $\text{H}_2\text{O}$  hervida. Mezclar durante 30 minutos y añadir 8 ml NaOH 1N. Enrasar a 50 ml con  $\text{H}_2\text{O}$  hervida. Sigma) y 2% de acetato de uranilo acuoso (Sigma), y se examinaron en el microscopio electrónico de transmisión.

### B.2.6 ESTUDIO MORFOMÉTRICO

Se realizaron estudios morfométricos para caracterizar el área de los cardiomiocitos en las preparaciones inmunohistoquímicas Anti-Laminina de los ratones adultos *Sirt1* +/+ (n=8), *Sirt1* +/- (n=8) y *Sirt1* -/- (n=8), utilizando el software *analySIS*® (*Image-Analytical Software*).

Se seleccionaron 9 localizaciones cardíacas diferentes para realizar las medidas de las áreas de los cardiomiocitos presentes por campo (Fig. 39):

- Pared del ventrículo izquierdo: cerca de la base, en un punto intermedio y cerca del vértice cardíaco.
- Septo interventricular: cerca de la base, en un punto intermedio y cerca del vértice cardíaco.
- Pared del ventrículo derecho: cerca de la base, en un punto intermedio y cerca del vértice cardíaco.

El área de los cardiomiocitos se delimitaba por el borde interno de los mismos.

## **B.2.7 RECOGIDA DE DATOS Y ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Se recogieron y analizaron estadísticamente los datos obtenidos mediante ecografía, MRI y análisis morfométrico.

### **B.2.7.1 Recogida de datos ecográficos y análisis estadístico**

Se describe la técnica utilizada para recoger los datos ecográficos en modo-B y Doppler y el estudio estadístico aplicado.

#### **B.2.7.1.1 Ecografía bidimensional**

El cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm) se realizó sobre una imagen estática, obtenida a partir de un vídeo, de la sección transversa del vaso en el momento de sístole cardíaca, ya que es cuando se produce la eyección cardíaca y se distiende la pared de las arterias (Fig. 13A).

A partir de los valores del diámetro se calculó el área de la luz vascular (A, mm<sup>2</sup>) aplicando la fórmula siguiente (Riesen et al. 2002):

$$A \text{ (mm}^2\text{)} = \frac{\pi \times D^2}{4}$$

#### **B.2.7.1.2 Ecografía Doppler pulsado**

A partir de los registros de Doppler espectral de cada vaso se obtuvo la información siguiente (Fig. 14):

- Descripción de la onda Doppler pulsado de cada vaso (Szatmari et al. 2001):
  - El perfil de velocidad de flujo se clasificó como romo, intermedio o parabólico.
  - El patrón de resistencia de flujo se clasificó como de resistencia alta, intermedia o baja.
- Mediciones con Doppler pulsado:

A partir del espectro Doppler pulsado se realizaron las medidas en cuatro ciclos cardíacos consecutivos excluyendo los que coincidían con la

respiración, con el fin de evitar artefactos. En cada uno de los ciclos se recogieron y promediaron los datos siguientes:

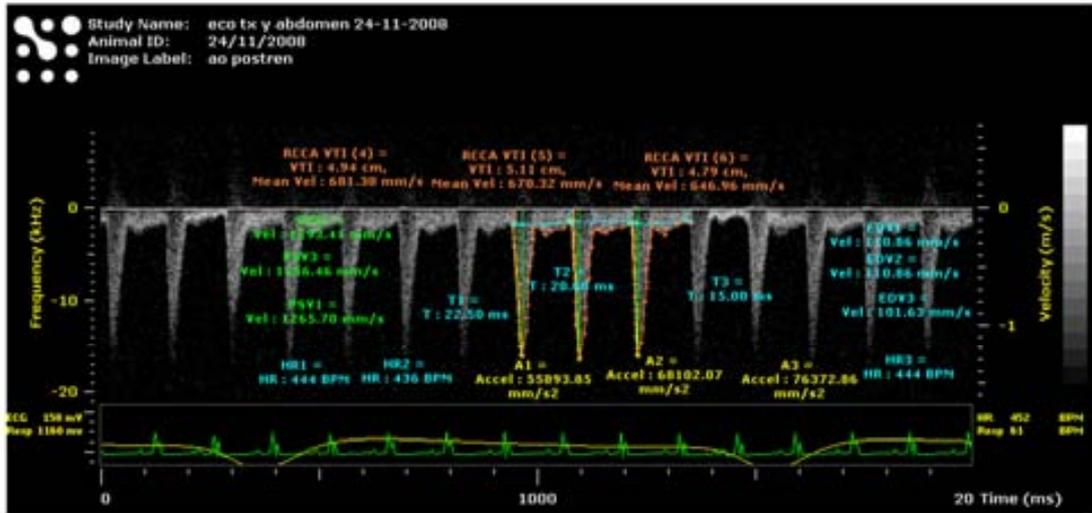


Fig. 14. Ejemplo de espectro Doppler obtenido durante el estudio, a partir del cual se describió la onda Doppler y sus características hemodinámicas.

- Frecuencia cardiaca (HR, latidos por minuto-bpm).
- Velocidades:
  - a. Velocidad sistólica máxima (PSV, mm/s).
  - b. Velocidad diastólica mínima (MDV, mm/s).
  - c. Velocidad media (TAMX, mm/s).
- Aceleración (a, mm/s<sup>2</sup>).
- Tiempo de aceleración (t, ms).

A partir de estos valores se obtuvieron los índices vasculares y el flujo sanguíneo medio (Bonnin y Fressonnet 2005):

- Índices vasculares:
  - a. Índice de pulsatilidad (PI):

$$PI = \frac{PSV-MDV}{TAMX}$$

- b. Índice de resistencia (RI):

$$RI = \frac{PSV-MDV}{PSV}$$

- Flujo sanguíneo medio (F, mm<sup>3</sup>/s o µl/s):

$$F = A \times TAMX$$

### **B.2.7.1.3 Análisis estadístico de los datos ecográficos**

Se realizaron análisis descriptivos e inferenciales de los datos obtenidos ecográficamente.

Los resultados descriptivos de las variables cuantitativas se han expresado como media  $\pm$  desviación estándar. Los resultados descriptivos de las variables cualitativas se han expresado como frecuencia absoluta y porcentaje.

En los análisis inferenciales se han tenido en cuenta los dos tipos generales de vaso a analizar: por un lado la aorta (aorta ascendente, descendente torácica y descendente abdominal) y por el otro sus ramas (vasos periféricos: tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda, arteria subclavia izquierda, arteria renal derecha, arteria femoral izquierda).

En la aorta se han empleado modelos denominados *General Estimation Equations* (GEE) (Zeger y Liang 1986). Estos modelos pueden usarse en el análisis longitudinal de datos que, por sus características, es deseable modelarlos de forma que se pueda considerar la variabilidad intraindividual en el modelo. El análisis de los diversos segmentos de la aorta cumple esta característica, por lo que se ha modelado esta relación considerándola como un modelo autorregresivo de primer orden, AR (1), que indica que la valoración de un punto concreto puede estar relacionada con la obtenida en el punto precedente.

Se han realizado dos modelos diferentes:

- Un modelo de efectos principales, considerando 2 factores (localización y sexo) que valoran diferencias globales en el perfil definido por las diversas secciones de la aorta estudiadas ecográficamente. Las 2 variables (localización y sexo) se consideran independientes. Con este modelo veremos el efecto de la localización en cada variable y el efecto del sexo en cada variable, de forma independiente.

- Otro modelo en el que se añade y se evalúa la interacción sexo\*localización. Este modelo permite valorar en qué localizaciones concretas puede haber un efecto diferencial atribuible al sexo del animal.

Se han realizado también modelos análogos a los descritos, incluyendo el peso del animal como covariable con el fin de ajustar estos resultados según el peso del animal.

Las ramas de la aorta (vasos periféricos) se han estudiado de forma independiente, sin aplicar un modelo longitudinal. En ellas se ha empleado un modelo de Análisis de la Covarianza (ANCOVA), que permite valorar diferencias según el género en cada vaso periférico estudiado, ajustado por el peso del animal, que actúa como covariable.

Los análisis se han efectuado con el programa estadístico SPSS versión 18 para Windows. Se ha considerado un Error de Tipo I bilateral del 5%. Debido al carácter exploratorio del estudio no se ha realizado ningún ajuste por multiplicidad. Se ha considerado estadísticamente significativo un P-valor <0,05.

#### **B.2.7.2 Recogida de datos de MRI y análisis estadístico**

De las imágenes obtenidas en sección transversa del corazón (dos cámaras) se seleccionaron las correspondientes a la máxima dilatación ventricular (diástole cardiaca).

Mediante la utilización del software ParaVision 4.0, se dibujó una línea que pasara por entre los músculos papilares mayores de los ventrículos, en el punto de diámetro ventricular máximo. A partir de esta línea, se calculó (Fig 37):

- Grosor de la pared del ventrículo izquierdo (PVI, mm).
- Grosor de la pared del ventrículo derecho (PVD, mm).
- Grosor del septo interventricular (S, mm).
- Diámetro de la cavidad del ventrículo izquierdo (CVI, mm).
- Diámetro de la cavidad del ventrículo derecho (CVD, mm).

Todas estas dimensiones se han expresado en función del peso vivo de los animales para evitar las posibles diferencias debido al peso no uniforme entre grupos.

Además, a partir de estos datos, se calculó la relación  $h/R$ , que se ha usado para distinguir dilatación de hipertrofia cardiaca concéntrica y excéntrica (Grossman et al. 1975; Douglas et al. 1987; Borgarelli et al. 2007) en la que:

- $h$  es el grosor de la pared del ventrículo izquierdo en diástole (PVI, mm).
- $R$  es el radio de la cavidad del ventrículo izquierdo en diástole, que se calcula dividiendo por dos el diámetro de la cavidad del ventrículo izquierdo al final de la diástole ( $CVI/2$ ).

Las medias y desviaciones estándar de los datos recogidos en cada uno de los tres grupos (ratones *Sirt1*<sup>+/+</sup>, *Sirt1*<sup>+/-</sup> y *Sirt1*<sup>-/-</sup>) se analizaron estadísticamente con Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, USA) aplicando los procedimientos GLM and LS MEANS. Se realizó un análisis de la varianza entre los tres grupos para cada medida y posteriormente una comparación múltiple de Tukey entre los datos que presentaban diferencias estadísticamente significativas.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de valores  $P$  menores de 0,05.

### **B.2.7.3 Recogida de datos de morfometría y análisis estadístico**

Las medias y desviaciones estándar de los datos recogidos en cada uno de los tres grupos de animales (ratones *Sirt1*<sup>+/+</sup>, *Sirt1*<sup>+/-</sup> y *Sirt1*<sup>-/-</sup>) en cada una de las localizaciones se analizaron estadísticamente con Statistical Analysis System (SAS Institute, Cary, USA) aplicando los procedimientos GLM and LS MEANS.

En los ratones silvestres se realizó un análisis de la varianza para valorar las diferencias en las áreas según la localización estudiada. Posteriormente, se realizó una comparación múltiple de Tukey entre los datos que presentaban diferencias estadísticamente significativas.

Después de esto, se realizó un análisis de la varianza para valorar las diferencias entre los tres grupos de animales para cada localización concreta. En este caso, también se hizo una comparación múltiple de Tukey entre los datos que presentaban diferencias estadísticamente significativas.

Las diferencias fueron consideradas estadísticamente significativas a partir de valores  $P$  menores de 0,05.

## **C. RESULTADOS**



## C.1 ESTUDIO ECOGRÁFICO DE LA AORTA

Se realizó el estudio en un total de 27 ratones C57BL/6 (10 machos y 17 hembras) de dos meses de edad. En la Tabla 5 se describen sus características de peso.

Peso (g)						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
<b>Todos</b>	21,19	4,17	19,38	17,90	25,63	27
<b>Macho</b>	26,12	2,33	26,14	25,61	27,74	10
<b>Hembra</b>	18,29	1,07	18,02	17,43	19,01	17

Tabla 5. Peso de los animales usados en el estudio según su género.

Los estudios ecográficos se iniciaron una vez estabilizadas las constantes cardíacas y respiratorias del ratón. Cada examen duró entre 40 y 50 minutos, empezando por el estudio del tórax, siguiendo con el estudio de la cavidad abdominal y acabando con el estudio de la arteria femoral izquierda. El protocolo anestésico fue adecuado, permitiendo mantener las constantes de los ratones dentro de parámetros fisiológicos hasta el momento de la eutanasia.

### C.1.1 AORTA ASCENDENTE

#### C.1.1.1 Abordaje ecográfico

En los ratones, la aorta ascendente se sitúa a la derecha de la línea media. Para localizar ecográficamente este vaso se busca el tracto de salida del flujo del ventrículo izquierdo (Fig. 15). Se realizan diferentes abordajes y se escoge en cada animal el más adecuado para obtener imágenes con la mínima cantidad de artefactos debidos a la presencia del esternón y de las costillas.

En la aorta ascendente se utilizan los abordajes siguientes:

- Abordaje paraesternal derecho. Secciones longitudinales:

Se coloca el transductor en el tercio superior del tórax, en un plano casi paralelo al eje central del cuerpo del ratón.

## RESULTADOS

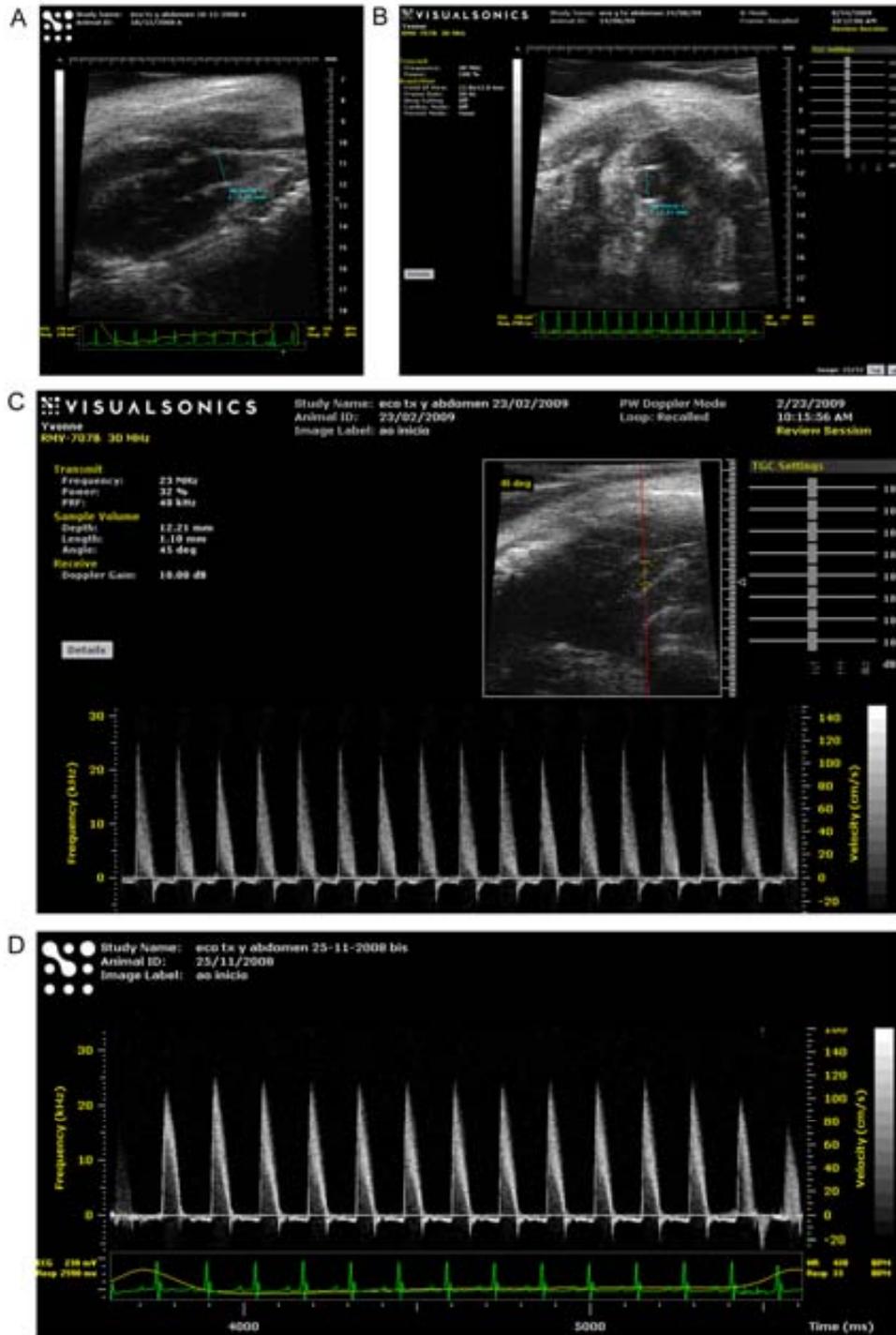


Fig. 15. A. Imagen ecográfica en modo bidimensional del tracto de salida del ventrículo izquierdo, en la que se observa la aorta ascendente en plano longitudinal. B. Imagen ecográfica en plano transverso de la aorta ascendente de otro animal. C y D. Espectro Doppler pulsado obtenido en la aorta ascendente de un ratón con frecuencia cardíaca superior a 400 latidos por minuto. El flujo, de tipo romo con resistencia alta se dirige hacia el transductor.

Este abordaje permite localizar en modo-B el vaso, evaluar su normalidad y la de su entorno y calcular el diámetro de su luz en sección longitudinal. Para calcular el diámetro de la luz en sección transversa sólo es necesario rotar el transductor 90° (Fig. 15).

Es el mejor abordaje para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado en la aorta ascendente ya que el ángulo de incidencia del ultrasonido es pequeño.

Otra opción es colocar el transductor en el tercio inferior del tórax, paralelo al eje central del cuerpo del ratón. Este abordaje es correcto para localizar el vaso en modo bidimensional, evaluar su normalidad y calcular el diámetro de su luz en sección longitudinal y transversa (rotando el transductor). Sin embargo, el ángulo de incidencia del haz de ultrasonidos es peor que en el abordaje anterior.

- Abordaje paraesternal izquierdo. Sección longitudinal:

Se coloca el transductor en el tercio medio del tórax, en un plano paralelo al eje central del cuerpo del ratón. Este abordaje es útil para localizar el vaso en modo bidimensional, evaluar su normalidad y calcular el diámetro de su luz en sección longitudinal y transversa (rotando el transductor). Sin embargo, el ángulo de incidencia del haz de ultrasonidos es peor que en el primer abordaje descrito.

### **C.1.1.2 Descripción de los resultados obtenidos**

#### **C.1.1.2.1 Ecografía bidimensional**

Se estudió la aorta ascendente en modo bidimensional en todos los machos del estudio y en todas las hembras excepto una (16/17). En esta hembra no fue posible obtener imágenes de calidad de las arterias en el tórax. No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los ratones estudiados.

#### **Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)**

El diámetro de la luz de la aorta ascendente pudo medirse en todos los animales siendo de  $1,56 \pm 0,12$  mm en su conjunto (media  $\pm$  SD). El área de la aorta ascendente en el total de los animales, sin tener en cuenta el género, es

## RESULTADOS

de  $1,91 \pm 0,29 \text{ mm}^2$ . En las Tablas 6, 7 y 8 se recogen los datos de diámetro y área para todos los animales en conjunto y separados según su género.

<b>Aorta ascendente</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,56	0,12	1,57	1,46	1,64	26
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,91	0,29	1,94	1,67	2,10	26

Tabla 6. Diámetro y área en la aorta ascendente en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

<b>Aorta ascendente. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,54	0,13	1,57	1,51	1,64	10
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,88	0,29	1,92	1,79	2,10	10

Tabla 7. Diámetro y área de la aorta ascendente de los machos.

<b>Aorta ascendente. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,56	0,12	1,58	1,46	1,62	16
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,93	0,29	1,95	1,67	2,05	16

Tabla 8. Diámetro y área de la aorta ascendente de las hembras.

### C.1.1.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Los registros Doppler se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a  $60^\circ$  en la totalidad de los estudios.

#### **Descripción de la onda Doppler pulsado de la aorta ascendente**

Se obtuvieron registros con Doppler pulsado en todos los machos y en todas las hembras excepto en una (mencionada anteriormente).

Todos los animales presentaron un flujo sanguíneo de tipo romo con resistencia alta (flujo reverso al inicio de la diástole) en esta localización (Fig. 15). En la aorta ascendente, debido al posicionamiento del transductor y a la dirección del flujo sanguíneo, el espectro Doppler queda por encima de la línea base ya que la sangre se dirige hacia el transductor.

#### **Mediciones con Doppler pulsado**

El registro Doppler en la aorta ascendente se realizó teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $446,82 \pm 55,34$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

## RESULTADOS

La velocidad sistólica máxima de la aorta ascendente en el ratón es cercana a 1 m/s. La presencia de flujo reverso queda de manifiesto por una velocidad diastólica mínima negativa y por un índice de resistencia superior a uno.

Los valores numéricos de cada uno de los datos se representan en las Tablas 9, 10 y 11.

<b>Aorta ascendente</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	446,82	55,34	451,50	389,00	497,00	26
PSV (mm/s)	1153,62	196,61	1139,25	988,83	1251,62	26
MDV (mm/s)	-187,02	53,36	-192,85	-226,86	-150,53	26
TAMX (mm/s)	635,47	115,30	625,45	538,01	719,26	26
a (mm/s <sup>2</sup> )	144495,52	50980,42	155905,89	97175,94	193820,27	26
t (ms)	9,84	3,00	9,17	8,33	10,83	26
PI	2,12	0,16	2,09	1,99	2,22	26
RI	1,16	0,04	1,17	1,14	1,20	26
F (mm <sup>3</sup> /s)	1215,77	287,48	1261,92	996,28	1393,76	26

Tabla 9. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta ascendente de todos los ratones, sin considerar el sexo del animal.

<b>Aorta ascendente. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	448,07	56,67	440,33	395,67	497,00	10
PSV (mm/s)	1262,30	158,03	1241,32	1224,84	1296,70	10
MDV (mm/s)	-193,69	59,07	-183,88	-254,57	-133,87	10
TAMX (mm/s)	677,21	112,77	697,13	600,05	730,65	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	160611,21	41442,09	163661,11	147786,74	178125,57	10
t (ms)	9,58	1,89	9,58	8,33	10,83	10
PI	2,16	0,19	2,09	2,03	2,23	10
RI	1,15	0,04	1,15	1,12	1,20	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	1286,01	311,66	1278,46	1003,97	1356,00	10

Tabla 10. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta ascendente de los ratones macho.

<b>Aorta ascendente. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	446,04	56,36	460,50	389,00	490,50	16
PSV (mm/s)	1085,69	191,42	1077,62	976,33	1139,25	16
MDV (mm/s)	-182,85	51,04	-200,09	-211,85	-162,71	16
TAMX (mm/s)	609,38	112,43	593,90	533,24	659,96	16
a (mm/s <sup>2</sup> )	134423,22	54953,12	116761,16	85485,93	195132,54	16
t (ms)	10,00	3,57	9,17	7,92	11,67	16
PI	2,10	0,14	2,10	1,98	2,21	16
RI	1,17	0,04	1,18	1,14	1,20	16
F (mm <sup>3</sup> /s)	1171,87	272,25	1153,70	971,36	1397,86	16

Tabla 11. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta ascendente de los ratones hembra.

## C.1.2 ARCO AÓRTICO

### C.1.2.1 Abordaje ecográfico

El arco aórtico puede valorarse completamente a partir de un abordaje paraesternal derecho en sección longitudinal, con el transductor en el tercio medio del tórax, paralelo al eje central del ratón, levemente rotado hacia la izquierda y hacia dorsal.

Este abordaje permite valorar en modo bidimensional el arco aórtico en los tres puntos descritos (orificio del tronco braquiocefálico, orificio de la arteria carótida común izquierda y orificio de la arteria subclavia izquierda), el origen de estas tres ramas y la aorta descendente torácica (Fig. 16). También permite calcular el diámetro de la luz de cada una de estas localizaciones en sección longitudinal y transversa (rotando el transductor 90°).

El ángulo de incidencia que se obtiene es adecuado para obtener el registro Doppler pulsado del arco aórtico y de la aorta descendente torácica.

### C.1.2.2 Descripción de los resultados obtenidos

#### C.1.2.2.1 Ecografía bidimensional

El estudio ecográfico del arco aórtico se realizó en 14 de los 27 animales del estudio (5 hembras y 9 machos).

En la Tabla 12 se muestran los pesos de los animales estudiados en esta localización.

Peso (g)						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
<b>Todos</b>	23,91	4,09	25,63	19,71	27,08	14
<b>Macho</b>	26,62	1,82	26,50	25,65	27,90	9
<b>Hembra</b>	19,03	1,15	19,38	18,70	15,98	5

Tabla 12. Peso de los animales en los que se estudió el arco aórtico, según el género.

No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los ratones estudiados.

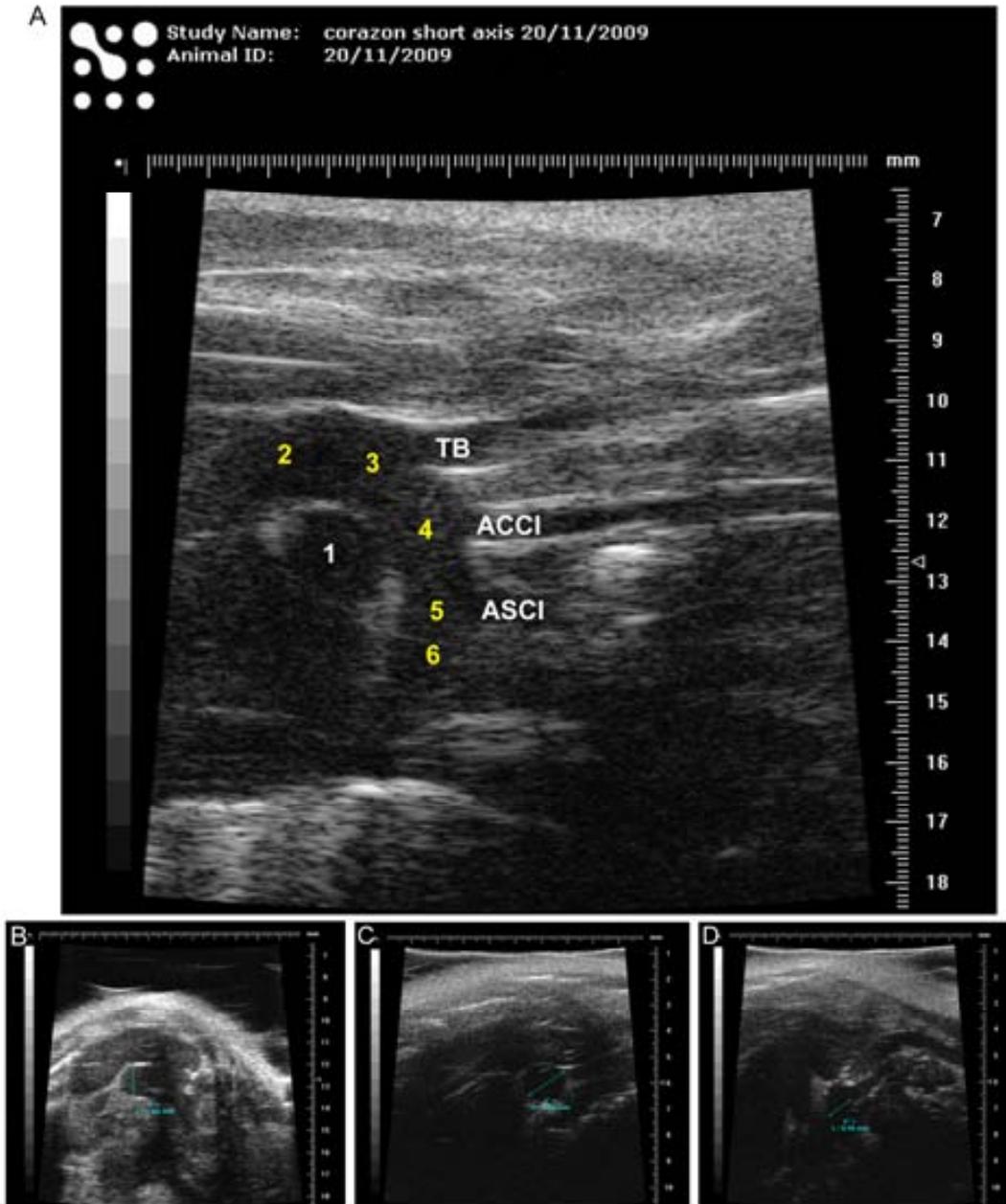


Fig. 16. A. Imagen ecográfica bidimensional de la entrada del tórax en sección parasagital derecha en la que se observa el arco aórtico y sus ramas. 1: arteria pulmonar derecha; 2: aorta ascendente; 3: orificio del tronco braquiocefálico; 4: orificio de la arteria carótida común izquierda; 5: orificio de la arteria subclavia izquierda; 6: aorta descendente torácica; TB: tronco braquiocefálico; ACCI: arteria carótida común izquierda; ASCI: arteria subclavia izquierda. B. Imagen ecográfica en plano transverso del diámetro del arco aórtico en el orificio del tronco braquiocefálico. C. Imagen ecográfica en plano transverso del diámetro del arco aórtico en el orificio de la arteria carótida común izquierda. D. Imagen ecográfica en plano transverso del diámetro del arco aórtico en el orificio de la arteria subclavia izquierda.

### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

#### Orificio del tronco braquiocefálico

El diámetro del orificio del tronco braquiocefálico sólo pudo medirse en 6 de los ratones estudiados (6/14), siendo la mitad de cada sexo (Fig. 16). Esto

## RESULTADOS

se debe a que la curvatura del arco aórtico en este punto dificulta la realización de mediciones fiables tanto en modo B como con Doppler pulsado.

El diámetro del arco aórtico en el orificio del tronco braquiocefálico es de  $1,60 \pm 0,17$  mm y el área de  $2,03 \pm 0,40$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD) (Tablas 13, 14 y 15).

Arco aórtico. Orificio del tronco braquiocefálico						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,60	0,17	1,67	1,50	1,70	6
Área (mm <sup>2</sup> )	2,03	0,40	2,18	1,77	2,27	6

Tabla 13. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio del tronco braquiocefálico en el conjunto de los animales, sin considerar diferencias de género.

Arco aórtico. Orificio del tronco braquiocefálico. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,59	0,24	1,70	1,31	1,76	3
Área (mm <sup>2</sup> )	2,02	0,59	2,27	1,35	2,43	3

Tabla 14. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio del tronco braquiocefálico de los machos.

Arco aórtico. Orificio del tronco braquiocefálico. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,61	0,10	1,66	1,50	1,67	3
Área (mm <sup>2</sup> )	2,04	0,24	2,16	1,77	2,19	3

Tabla 15. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio del tronco braquiocefálico de las hembras.

### Orificio de la arteria carótida común izquierda

El diámetro del orificio de la arteria carótida común izquierda pudo medirse en 11 de los ratones estudiados (11/14, 3 hembras y 8 machos). En los otros casos no fue posible realizar medidas debido a la curvatura del vaso (Fig. 16).

En este punto, el arco aórtico tiene un diámetro luminal de  $1,30 \pm 0,15$  mm y un área de  $1,33 \pm 0,30$  mm<sup>2</sup>. Los valores de diámetro y área para esta localización se muestran en las Tablas 16, 17 y 18.

Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,30	0,15	1,31	1,16	1,43	11
Área (mm <sup>2</sup> )	1,33	0,30	1,35	1,06	1,61	11

Tabla 16. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria carótida común izquierda en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

## RESULTADOS

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,30	0,15	1,29	1,17	1,42	8
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,34	0,31	1,30	1,07	1,59	8

Tabla 17. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria carótida común izquierda de los machos.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,28	0,17	1,32	1,09	1,43	3
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,30	0,34	1,37	0,93	1,61	3

Tabla 18. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria carótida común izquierda de las hembras.

### Orificio de la arteria subclavia izquierda

El diámetro de la arteria subclavia izquierda pudo medirse en 13 casos (13/14, 4 hembras y 9 machos) (Fig. 16).

En este punto, el arco aórtico tiene un diámetro luminal de  $1,11 \pm 0,13$  mm y un área de  $0,98 \pm 0,23$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD) (Tablas 19, 20 y 21).

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,11	0,13	1,10	1,03	1,19	13
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,98	0,23	0,95	0,83	1,10	13

Tabla 19. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria subclavia izquierda en el conjunto de los animales, sin considerar diferencias de género.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,12	0,14	1,10	1,04	1,19	9
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,00	0,25	0,95	0,85	1,10	9

Tabla 20. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria subclavia izquierda de los machos.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,09	0,10	1,08	1,01	1,17	4
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,94	0,18	0,92	0,79	1,08	4

Tabla 21. Diámetro y área del arco aórtico en el orificio de la arteria subclavia izquierda de las hembras.

### C.1.2.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Los registros Doppler se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a 60° en la totalidad de los estudios. En el orificio del tronco braquiocefálico sólo fue posible obtener datos de Doppler pulsado en dos hembras debido a la curvatura del vaso.

#### Descripción de la onda Doppler pulsado del arco aórtico

En el orificio del tronco braquiocefálico, el 50,00% de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo romo y el otro 50,00% presentó un perfil de velocidad de tipo intermedio. En el orificio de la arteria carótida común izquierda, un 83,30% de los ratones presentó un perfil de velocidad de flujo romo y un 16,70% de tipo intermedio. En el orificio de la arteria subclavia izquierda todos los animales presentaron un perfil de velocidad de flujo sanguíneo de tipo romo. En estos tres puntos del arco aórtico, los animales presentaron ondas Doppler de resistencia alta (Fig. 17). En la Tabla 22 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

Orificio del tronco braquiocefálico		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
Flujo	Romo	1	50,00%	0	0,00%	1	50,00%
	Intermedio	1	50,00%	0	0,00%	1	50,00%
Ondas	Resistencia alta	2	100,00%	0	0,00%	2	100,00%
Orificio de la arteria carótida común izquierda		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
Flujo	Romo	10	83,30%	7	87,50%	3	75,00%
	Intermedio	2	16,70%	1	12,50%	1	25,00%
Ondas	Resistencia alta	12	100,00%	8	100,00%	4	100,00%
Orificio de la arteria subclavia izquierda		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
Flujo	Romo	14	100,00%	9	100,00%	5	100,00%
Ondas	Resistencia alta	14	100,00%	9	100,00%	5	100,00%

Tabla 22. Características del espectro Doppler del arco aórtico murino en cada uno de los orificios estudiados.

En el orificio del tronco braquiocefálico sólo fue posible obtener dos registros de Doppler pulsado (Fig. 17).

## RESULTADOS

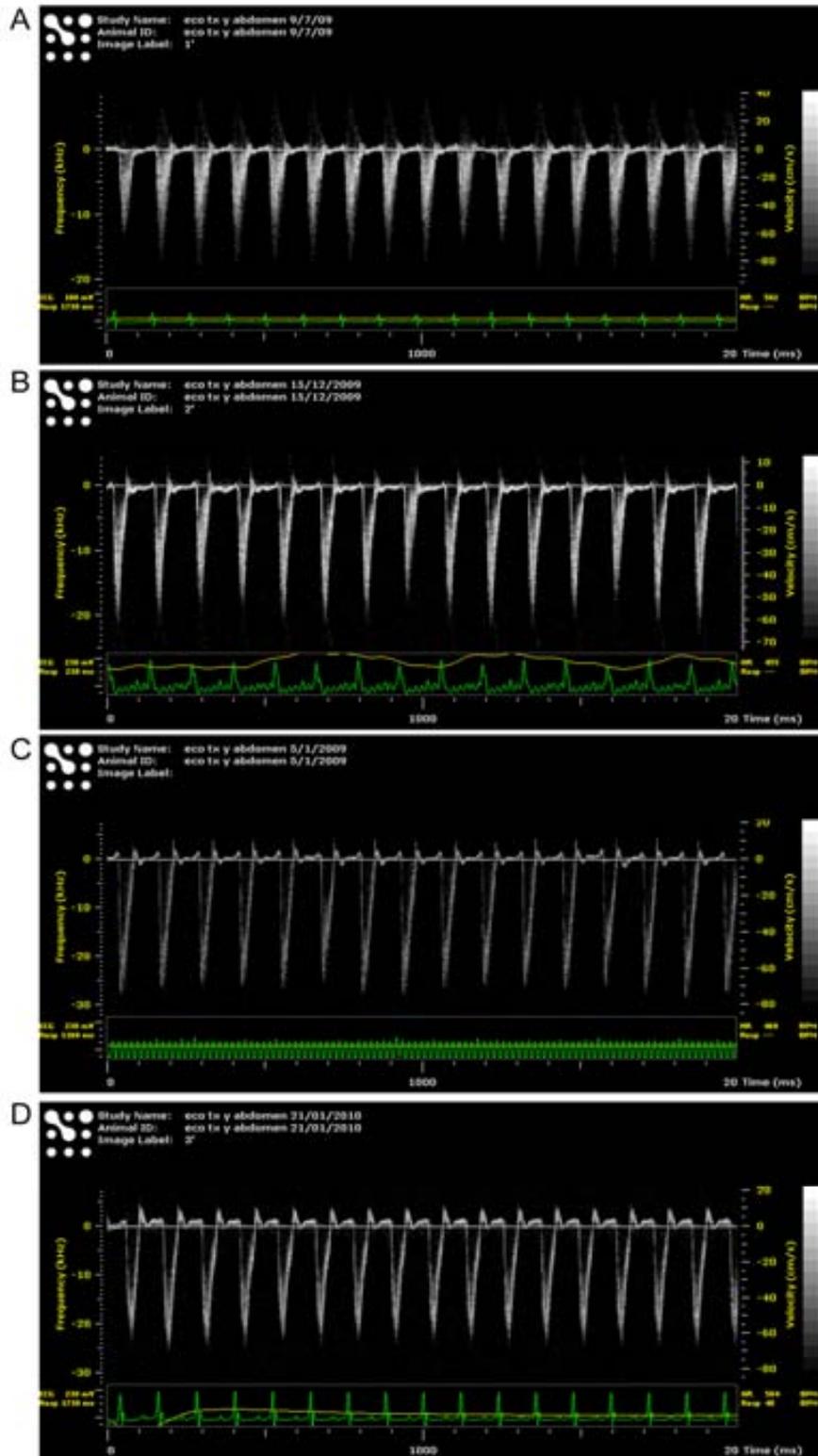


Fig. 17. A. Espectro Doppler pulsado del arco aórtico-orificio del TB. El flujo, de tipo intermedio con resistencia alta, se aleja del transductor, por lo que queda representado por debajo de la línea base. B. Espectro Doppler pulsado del arco aórtico-orificio de la ACCI. El flujo, intermedio y con resistencia alta, también se aleja del transductor. C. Espectro Doppler pulsado del arco aórtico-orificio de la ACCI. El flujo, de tipo romo -ventana sistólica clara- con resistencia alta se aleja del transductor. D. Espectro Doppler pulsado del arco aórtico-orificio de la ASCI. El perfil de velocidad de flujo es romo con resistencia alta.

## RESULTADOS

En este punto, debido a la curvatura del vaso, el flujo se acerca y se aleja del transductor al mismo tiempo, por lo que el espectro puede quedar tanto por encima como por debajo de la línea base.

En el orificio de la arteria carótida común izquierda y en el de la arteria subclavia izquierda, debido al posicionamiento del transductor y a la dirección del flujo sanguíneo, el espectro Doppler queda por debajo de la línea base, ya que la sangre se aleja del transductor (Fig. 17).

### Mediciones con Doppler pulsado

#### Arco aórtico. Orificio del tronco braquiocefálico

La velocidad sistólica máxima en el orificio del tronco braquiocefálico es cercana a 1 m/s al igual que en la aorta ascendente, aunque inferior a ésta. La presencia de flujo reverso queda de manifiesto por una velocidad diastólica mínima negativa y por un índice de resistencia mayor a uno.

Los valores numéricos de los datos obtenidos en las dos hembras estudiadas se representan en la Tabla 23.

Arco aórtico. Orificio del tronco braquiocefálico			
Ratón	1	2	N
HR (bpm)	502,00	500,00	2
PSV (mm/s)	1041,06	850,45	2
MDV (mm/s)	-61,45	-69,87	2
TAMX (mm/s)	491,26	427,63	2
a (mm/s <sup>2</sup> )	86305,56	51002,43	2
t (ms)	13,75	10,83	2
PI	2,18	2,14	2
RI	1,06	1,04	2
F (mm <sup>3</sup> /s)	1118,17	969,56	2

Tabla 23. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en el arco aórtico-orificio del tronco braquiocefálico en dos hembras (1 y 2).

#### Arco aórtico. Orificio arteria carótida común izquierda

El registro Doppler en el orificio de la arteria carótida común izquierda se realizó teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $450,03 \pm 46,80$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

Las velocidades del flujo sanguíneo disminuyen al alejarse del corazón. La presencia de flujo reverso se manifiesta por la existencia de una velocidad diastólica mínima negativa y por un índice de resistencia mayor a uno.

## RESULTADOS

Los valores numéricos de cada uno de estos datos quedan representados en las Tablas 24, 25 y 26.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	450,03	46,79	442,00	408,17	490,17	12
PSV (mm/s)	742,25	183,01	736,65	622,92	792,38	12
MDV (mm/s)	-76,48	47,61	-74,79	-99,06	-47,95	12
TAMX (mm/s)	399,49	100,44	401,55	313,06	431,55	12
a (mm/s <sup>2</sup> )	63236,24	32361,58	49838,46	45106,20	70200,09	12
t (ms)	15,00	2,71	15,42	12,92	15,83	12
PI	2,07	0,16	2,06	1,93	2,18	12
RI	1,10	0,05	1,11	1,09	1,14	12
F (mm <sup>3</sup> /s)	540,72	205,88	496,79	444,59	538,96	11

Tabla 24. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en el arco aórtico-orificio de la arteria carótida común izquierda de todos los ratones, sin diferenciar según el sexo del animal.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	442,71	48,00	430,33	405,83	475,17	8
PSV (mm/s)	746,00	222,56	731,46	595,33	807,34	8
MDV (mm/s)	-71,74	58,24	-62,91	-108,58	-26,74	8
TAMX (mm/s)	406,15	118,59	401,60	313,06	456,21	8
a (mm/s <sup>2</sup> )	65807,28	39167,90	49157,44	42960,73	87038,68	8
t (ms)	15,83	2,78	15,83	15,00	16,67	8
PI	2,04	0,18	1,98	1,90	2,16	8
RI	1,09	0,06	1,09	1,05	1,15	8
F (mm <sup>3</sup> /s)	540,30	231,08	494,82	446,32	509,06	8

Tabla 25. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en el arco aórtico-orificio de la arteria carótida común izquierda de los ratones macho.

<b>Arco aórtico. Orificio de la arteria carótida común izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	464,67	47,17	465,17	428,17	501,17	4
PSV (mm/s)	734,77	84,38	765,22	677,15	792,38	4
MDV (mm/s)	-85,94	14,79	-86,56	-98,30	-73,58	4
TAMX (mm/s)	386,18	61,81	400,03	342,66	429,70	4
a (mm/s <sup>2</sup> )	58094,14	14404,54	57324,02	45988,19	70200,09	4
t (ms)	13,33	1,80	12,92	12,08	14,58	4
PI	2,15	0,11	2,12	2,06	2,23	4
RI	1,12	0,01	1,12	1,11	1,12	4
F (mm <sup>3</sup> /s)	541,81	158,21	538,96	385,05	701,44	3

Tabla 26. Datos obtenidos mediante ecografía Doppler en el arco aórtico-orificio de la arteria carótida común izquierda de los ratones hembra.

## RESULTADOS

### Arcos aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda

El espectro Doppler en el orificio de la arteria subclavia izquierda se obtuvo con una frecuencia cardíaca de  $466,71 \pm 58,89$  latidos por minuto. Los valores numéricos de cada uno de los datos estudiados quedan representados en las Tablas 27, 28 y 29.

Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	466,71	58,89	477,33	412,67	493,67	14
PSV (mm/s)	807,55	140,18	766,30	703,14	867,42	14
MDV (mm/s)	-125,56	47,08	-111,97	-151,24	-100,88	14
TAMX (mm/s)	446,30	77,04	410,43	383,44	498,55	14
a (mm/s <sup>2</sup> )	58209,89	19180,49	52145,28	46204,31	69737,16	14
t (ms)	13,69	3,01	14,58	12,50	15,83	14
PI	2,11	0,10	2,11	2,05	2,18	14
RI	1,16	0,05	1,15	1,12	1,17	14
F (mm <sup>3</sup> /s)	463,26	204,25	401,89	327,79	433,71	13

Tabla 27. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en el arco aórtico-orificio de la arteria subclavia izquierda de todos los ratones, sin tener en cuenta el sexo del animal.

Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	465,81	61,04	465,00	412,67	493,67	9
PSV (mm/s)	816,20	155,60	770,18	703,14	867,42	9
MDV (mm/s)	-139,97	53,66	-122,00	-156,34	-110,43	9
TAMX (mm/s)	447,71	81,14	402,86	383,44	498,55	9
a (mm/s <sup>2</sup> )	60839,46	23025,86	54978,14	46204,31	78019,73	9
t (ms)	12,87	3,46	13,33	10,83	15,00	9
PI	2,14	0,09	2,16	2,05	2,22	9
RI	1,17	0,05	1,16	1,15	1,18	9
F (mm <sup>3</sup> /s)	460,41	196,61	415,63	331,54	433,71	9

Tabla 28. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en el arco aórtico-orificio de la arteria subclavia izquierda de los ratones macho.

Arco aórtico. Orificio de la arteria subclavia izquierda. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	468,33	61,77	493,33	483,67	493,67	5
PSV (mm/s)	791,99	122,34	762,42	738,33	791,83	5
MDV (mm/s)	-99,61	11,68	-101,73	-107,11	-90,60	5
TAMX (mm/s)	443,74	78,17	412,97	407,90	436,74	5
a (mm/s <sup>2</sup> )	53476,67	9576,24	51122,90	48149,13	53167,65	5
t (ms)	15,17	1,09	15,00	14,17	15,83	5
PI	2,05	0,10	2,09	1,97	2,10	5
RI	1,13	0,03	1,12	1,11	1,14	5
F (mm <sup>3</sup> /s)	469,68	252,43	364,84	316,78	622,58	4

Tabla 29. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en el arco aórtico-orificio de la arteria subclavia izquierda de los ratones hembra.

### C.1.3 AORTA DESCENDENTE TORÁCICA

#### C.1.3.1 Abordaje ecográfico

Al igual que en el caso del arco aórtico, la aorta descendente torácica puede valorarse completamente a partir de un abordaje paraesternal derecho en sección longitudinal, con el transductor en el tercio medio del tórax, paralelo al eje central del ratón, levemente rotado hacia la izquierda y hacia dorsal.

Este abordaje permite valorar en modo B la aorta descendente torácica, calcular el diámetro de su luz en sección longitudinal y transversa (rotando el transductor 90°) y realizar mediciones con Doppler pulsado (Fig. 18).

#### C.1.3.2 Descripción de los resultados obtenidos

##### C.1.3.2.1 Ecografía bidimensional

La aorta descendente torácica se examinó en 23 de los 27 animales del estudio (9 machos y 14 hembras). No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los ratones estudiados.

En la Tabla 30 se muestran las características de peso de estos animales.

Peso (g)						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
<b>Todos</b>	21,51	4,27	19,44	17,99	25,68	23
<b>Macho</b>	26,62	1,82	26,50	25,65	28,13	9
<b>Hembra</b>	18,44	1,06	18,56	17,80	19,20	14

Tabla 30. Peso de los animales en los que se estudió la aorta descendente torácica.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la aorta descendente torácica pudo medirse en todos los animales estudiados en esta localización (n=23) (Fig. 18). Este vaso tiene un diámetro de  $1,14 \pm 0,17$  mm y un área de  $1,04 \pm 0,31$  mm<sup>2</sup>. En las Tablas 31, 32 y 33 se muestran los valores de diámetro y área en el conjunto de los animales y divididos según el género.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente torácica</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,14	0,17	1,14	1,05	1,22	23
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,04	0,31	1,02	0,87	1,17	23

Tabla 31. Diámetro y área de la aorta descendente torácica en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

<b>Aorta descendente torácica. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,10	0,15	1,13	1,05	1,15	9
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,97	0,27	1,00	0,87	1,04	9

Tabla 32. Diámetro y área de la aorta descendente torácica de los machos.

<b>Aorta descendente torácica. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,16	0,18	1,14	1,07	1,26	14
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	1,08	0,33	1,02	0,89	1,25	14

Tabla 33. Diámetro y área de la aorta descendente torácica de las hembras.

### **C.1.3.2.2 Ecografía Doppler pulsado**

Los registros Doppler se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a 60° en la totalidad de los estudios (23 animales).

#### **Descripción de la onda Doppler pulsado de la aorta descendente torácica**

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los animales examinados.

Todos los machos presentaron un perfil de velocidad de flujo sanguíneo como con resistencia alta en esta localización. La mayor parte de hembras (13/14) presentó el mismo patrón y en la restante se observó un flujo sanguíneo de tipo intermedio, con ventana sistólica menos evidente y resistencia alta (Fig. 18).

En la aorta descendente torácica el espectro Doppler queda por debajo de la línea base ya que la sangre se aleja del transductor dirigiéndose hacia el abdomen.

## RESULTADOS

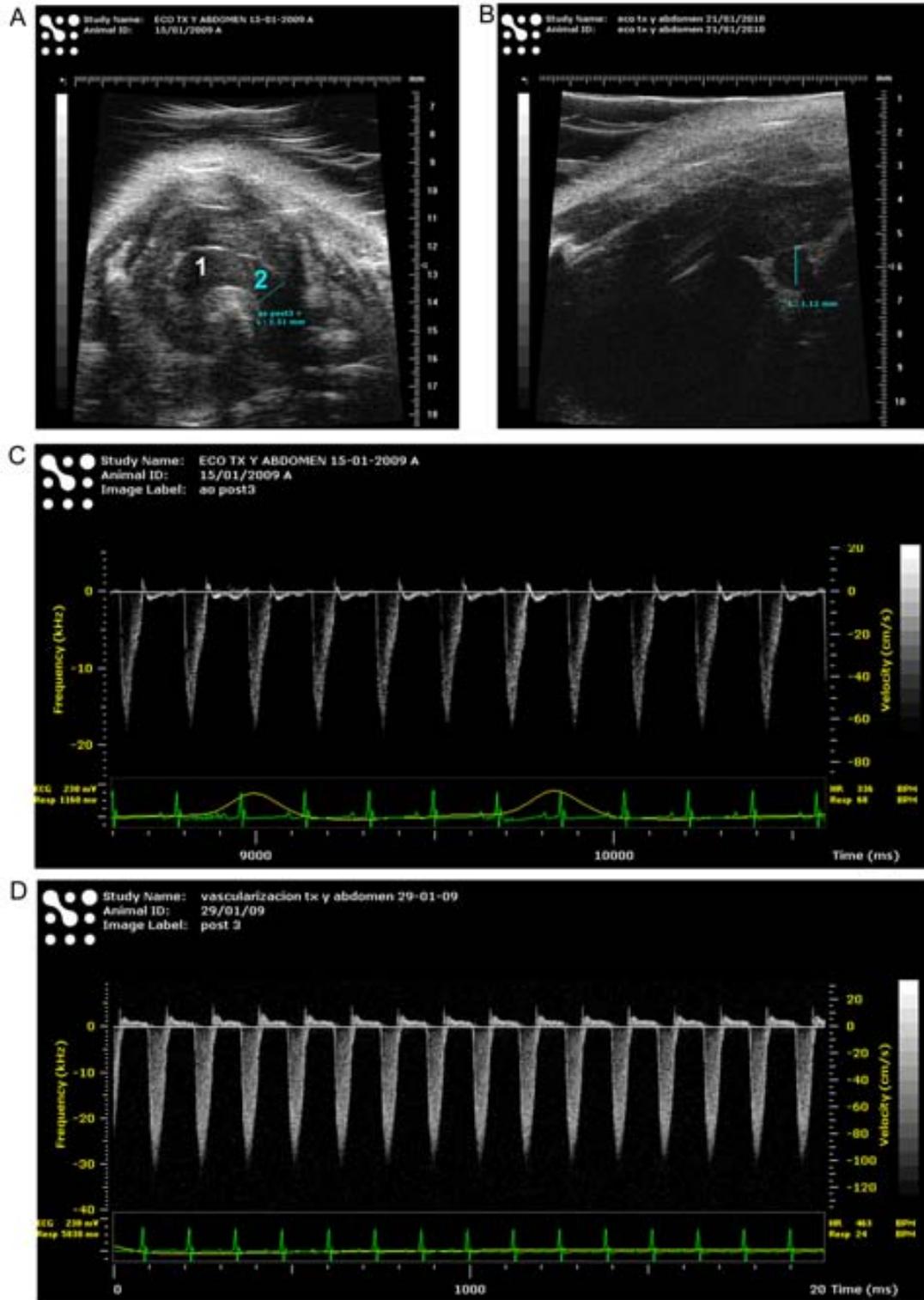


Fig. 18. A. Imagen ecográfica en modo bidimensional del arco aórtico (1) y la aorta descendente torácica (2) en plano longitudinal. B. Imagen ecográfica en plano transverso del diámetro de la aorta descendente torácica. C. Espectro Doppler de la aorta descendente torácica de un ratón en el que se observa un flujo sanguíneo como con resistencia alta. D. Espectro Doppler pulsado obtenido en la aorta descendente torácica de otro individuo. El flujo, de tipo intermedio con resistencia alta, se aleja del transductor.

## RESULTADOS

### Mediciones con Doppler pulsado

El espectro Doppler de la aorta descendente torácica se obtuvo con una frecuencia cardíaca de  $449,67 \pm 62,65$  latidos por minuto.

Las velocidades y el flujo sanguíneo fueron menores que en la aorta ascendente. Los valores numéricos de cada uno de los datos quedan representados en las Tablas 34, 35 y 36.

Aorta descendente torácica						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	449,67	62,65	456,00	386,67	503,67	23
PSV (mm/s)	791,23	108,67	793,01	720,19	841,60	23
MDV (mm/s)	-112,17	47,92	-117,87	-126,10	-76,16	23
TAMX (mm/s)	432,47	63,17	439,20	382,12	462,81	23
a (mm/s <sup>2</sup> )	55699,09	21580,54	48234,95	41564,48	63280,02	23
t (ms)	15,40	4,81	15,83	13,33	18,33	23
PI	2,09	0,12	2,05	2,02	2,15	23
RI	1,14	0,06	1,15	1,10	1,18	23
F (mm <sup>3</sup> /s)	453,40	158,70	438,45	341,92	492,87	23

Tabla 34. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta descendente torácica de todos los ratones, sin tener en cuenta el sexo del animal.

Aorta descendente torácica. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	458,70	50,97	456,00	421,33	493,67	9
PSV (mm/s)	760,48	100,27	741,08	720,19	809,03	9
MDV (mm/s)	-111,72	63,01	-121,11	-126,10	-117,36	9
TAMX (mm/s)	407,80	53,52	405,04	378,33	439,20	9
a (mm/s <sup>2</sup> )	55691,37	19050,46	52231,29	41564,48	67099,24	9
t (ms)	14,26	4,30	14,17	13,33	16,67	9
PI	2,14	0,16	2,11	2,05	2,26	9
RI	1,14	0,07	1,16	1,15	1,17	9
F (mm <sup>3</sup> /s)	395,00	120,58	404,12	324,34	448,11	9

Tabla 35. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta descendente torácica de los ratones macho.

Aorta descendente torácica. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	443,86	70,36	461,50	375,00	503,67	14
PSV (mm/s)	810,99	112,78	806,77	757,71	897,12	14
MDV (mm/s)	-112,46	37,98	-113,80	-121,98	-76,16	14
TAMX (mm/s)	448,32	65,56	450,84	411,13	470,41	14
a (mm/s <sup>2</sup> )	55704,05	23765,64	48060,43	43608,13	53828,91	14
t (ms)	16,13	5,12	16,67	14,17	18,33	14
PI	2,06	0,07	2,04	2,01	2,12	14
RI	1,14	0,05	1,13	1,10	1,18	14
F (mm <sup>3</sup> /s)	490,95	172,61	463,52	386,55	682,53	14

Tabla 36. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta descendente torácica de los ratones hembra.

## **C.1.4 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PRERRENAL**

### **C.1.4.1 Abordaje ecográfico**

La aorta descendente torácica se convierte en aorta descendente abdominal al penetrar en la porción dorsocraneal del abdomen a través del hiato aórtico, en el plano sagital medio del espacio retroperitoneal. En esta localización la aorta se sitúa a la izquierda de la vena cava caudal, que es ventral.

Para estudiar la aorta descendente prerrenal, se coloca el transductor en plano transversal sobre el abdomen craneal del animal. El parénquima hepático actúa como ventana acústica permitiendo obtener una imagen bidimensional de la aorta y de la vena cava caudal. Ambas estructuras pueden diferenciarse gracias a la pulsatilidad de la aorta y al hecho de que la vena cava caudal tiene un diámetro ligeramente superior al de la arteria en el mismo punto y se sitúa más ventral y a la derecha de la línea media (Fig. 19).

Con este abordaje se evitan los artefactos debidos a la presencia de gas en el fundus del estómago, es posible examinar el vaso en modo bidimensional y calcular el diámetro de su luz.

Una vez obtenida la imagen en plano transversal, puede rotarse el transductor 90° para examinar el vaso en sección longitudinal, donde se observa como una estructura con luz anecogénica y paredes hiperecogénicas. Para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado, el transductor y la plataforma donde descansa el ratón deben rotarse y orientarse hasta obtener un ángulo de incidencia menor a 60°, evitando al mismo tiempo ejercer presión excesiva sobre el animal.

## RESULTADOS

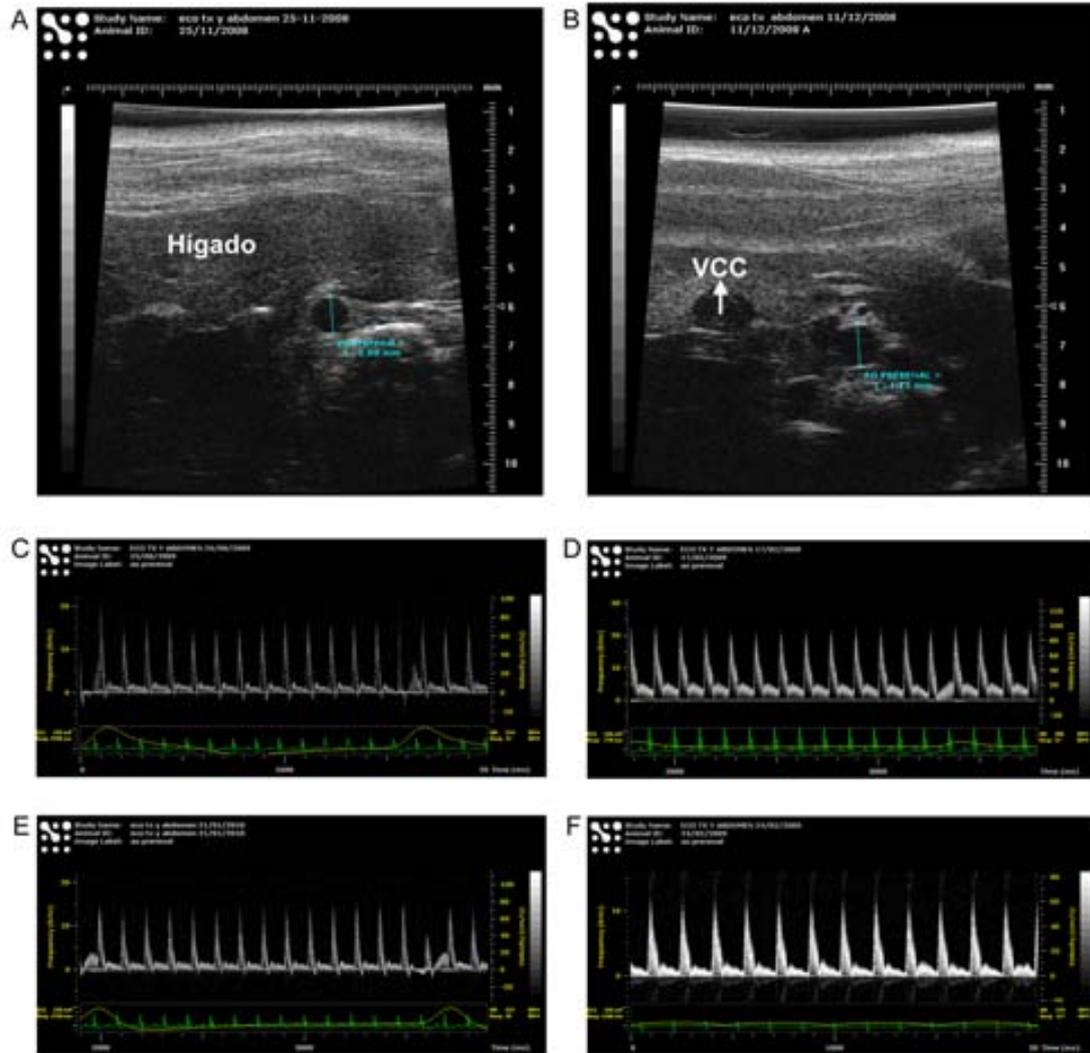


Fig. 19. A. Ecografía bidimensional del abdomen craneal de un ratón en el que se observa el parénquima hepático. La aorta aparece en plano transverso como una estructura redondeada con luz anecogénica. B. Imagen ecográfica en plano transverso de la aorta prerrenal -centrada en la imagen- y de la vena cava caudal (VCC), que tiene un diámetro ligeramente superior al de la aorta y se sitúa ventral y a la derecha de ésta. C. Espectro Doppler pulsado de la aorta prerrenal de un ratón que presenta un flujo arterial de tipo romo con resistencia alta. D. Espectro Doppler de la aorta prerrenal de otro ratón en el que se observa flujo romo con resistencia intermedia. E. Espectro Doppler de otra aorta prerrenal murina que presenta perfil de velocidad de flujo intermedio con resistencia alta. F. Espectro Doppler de la aorta prerrenal de otro ratón. El flujo que se observa es intermedio con resistencia intermedia.

### C.1.4.2 Descripción de los resultados obtenidos

#### C.1.4.2.1 Ecografía bidimensional

La aorta descendente abdominal prerrenal se examinó en todos los animales del estudio. No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de ellos.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

## RESULTADOS

El diámetro de la aorta descendente abdominal prerrenal pudo medirse en todos los machos (10/10) y en todas las hembras estudiados (17/17).

En esta localización la aorta tiene un diámetro de  $1,03 \pm 0,15$  mm y un área de  $0,85 \pm 0,24$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 37, 38 y 39 se muestran los valores de diámetro y área según el género del animal.

Aorta descendente abdominal prerrenal						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,03	0,15	1,04	0,92	1,15	27
Área (mm <sup>2</sup> )	0,85	0,24	0,85	0,67	1,04	27

Tabla 37. Diámetro y área de la aorta prerrenal en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta su sexo.

Aorta descendente abdominal prerrenal. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	1,10	0,15	1,12	0,94	1,17	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,96	0,26	0,98	0,69	1,08	10

Tabla 38. Diámetro y área de la aorta prerrenal de los machos.

Aorta descendente abdominal prerrenal. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,99	0,14	1,02	0,88	1,09	17
Área (mm <sup>2</sup> )	0,78	0,22	0,82	0,61	0,93	17

Tabla 39. Diámetro y área de la aorta prerrenal de las hembras.

### C.1.4.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los machos y en 15 hembras (15/17). El ángulo de incidencia fue menor a 60° en un 70% (7/10) de los machos y en un 80% (12/15) de las hembras.

#### Descripción de la onda Doppler pulsado de la aorta descendente abdominal prerrenal

El 32,00% de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo de tipo romo mientras que el 68,00% restante tenía un flujo de tipo intermedio. En este vaso, el 76,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia intermedia, sin flujo reverso al inicio de la diástole, y el 24,00% restante tenía resistencia alta con flujo reverso. En la Tabla 40 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

## RESULTADOS

Aorta descendente abdominal prerrenal		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Romo	8	32,00%	3	30,00%	5	33,30%
	Intermedio	17	68,00%	7	70,00%	10	66,70%
<b>Ondas</b>	Resistencia alta	6	24,00%	4	40,00%	2	13,30%
	Resistencia intermedia	19	76,00%	6	60,00%	13	86,70%

Tabla 40. Características del espectro Doppler pulsado de la aorta prerrenal.

Según cómo se posicionara el transductor y la plataforma del ratón, el espectro Doppler quedaba por encima o por debajo de la línea base, dependiendo de si la sangre se acercaba o alejaba de la sonda (Fig. 19).

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler en la aorta descendente abdominal prerrenal se realizó teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $473,11 \pm 60,60$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

Los datos que se muestran en las Tablas 41, 42 y 43 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia alta o intermedia. Por este motivo, la desviación estándar de la velocidad diastólica mínima es elevada, ya que contiene valores tanto positivos como negativos. Lo mismo ocurre con la velocidad media.

Aorta descendente abdominal prerrenal						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	473,11	60,60	496,67	433,67	522,00	25
PSV (mm/s)	635,31	186,03	617,90	510,99	724,63	25
MDV (mm/s)	35,36	61,66	52,88	2,64	83,82	25
TAMX (mm/s)	345,70	100,88	335,24	274,51	388,30	25
a (mm/s <sup>2</sup> )	46831,74	15200,32	45804,59	37974,64	55043,27	25
t (ms)	12,53	3,61	12,50	10,83	14,17	25
PI	1,75	0,21	1,72	1,63	1,84	25
RI	0,95	0,10	0,92	0,88	0,99	25
F (mm <sup>3</sup> /s)	291,98	123,46	281,66	203,63	350,65	25

Tabla 41. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta prerrenal de todos los ratones, sin considerar el sexo del animal.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente abdominal prerenal. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	473,27	63,81	489,50	433,67	529,67	10
PSV (mm/s)	553,25	122,40	529,11	434,29	663,91	10
MDV (mm/s)	8,77	70,57	36,09	-63,35	60,75	10
TAMX (mm/s)	297,03	55,57	277,05	258,78	348,15	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	40086,07	13002,00	40985,60	28550,57	47921,73	10
t (ms)	13,07	5,05	12,50	10,00	14,17	10
PI	1,84	0,26	1,81	1,72	2,13	10
RI	0,98	0,13	0,94	0,89	1,12	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	290,02	104,24	275,02	210,87	350,65	10

Tabla 42. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta prerenal de los ratones macho.

<b>Aorta descendente abdominal prerenal. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	473,00	60,64	496,67	411,67	511,00	15
PSV (mm/s)	690,01	204,16	639,80	574,35	847,90	15
MDV (mm/s)	53,09	49,75	58,51	26,20	92,82	15
TAMX (mm/s)	378,14	112,43	357,41	319,79	462,20	15
a (mm/s <sup>2</sup> )	51328,85	15272,12	49526,08	42474,77	58603,57	15
t (ms)	12,17	2,37	12,50	10,83	14,17	15
PI	1,70	0,16	1,69	1,58	1,82	15
RI	0,92	0,07	0,92	0,88	0,96	15
F (mm <sup>3</sup> /s)	293,28	138,34	281,66	168,28	361,04	15

Tabla 43. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta prerenal de los ratones hembra.

Si se dividen los datos según si el espectro Doppler es de resistencia alta o intermedia se obtienen los datos de las Tablas 44 y 45.

<b>Aorta descendente abdominal prerenal. Ondas de resistencia alta</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
Diámetro (mm)	1,01	0,11	1,00	0,93	1,10	6
Área (mm <sup>2</sup> )	0,81	0,18	0,79	0,67	0,95	6
HR (bpm)	513,83	42,63	522,00	500,00	533,00	6
PSV (mm/s)	654,42	208,74	638,99	444,75	757,07	6
MDV (mm/s)	-57,59	25,51	-51,46	-84,52	-34,12	6
TAMX (mm/s)	352,29	107,80	338,58	254,55	397,83	6
a (mm/s <sup>2</sup> )	44699,48	31375,35	29476,31	27754,91	55940,00	6
t (ms)	14,86	5,73	14,17	12,29	15,00	6
PI	2,03	0,14	2,03	1,93	2,13	6
RI	1,09	0,04	1,10	1,06	1,14	6
F (mm <sup>3</sup> /s)	288,66	123,66	254,97	213,80	354,88	6

Tabla 44. Resultados de los datos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en los 6 ratones que presentaron ondas con patrón de flujo de resistencia alta en la aorta prerenal.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente abdominal prerrenal. Ondas de resistencia intermedia</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	1,03	0,17	1,04	0,92	1,02	19
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,86	0,28	0,85	0,66	0,85	19
<b>HR (bpm)</b>	460,25	60,13	471,00	419,25	511,00	19
<b>PSV (mm/s)</b>	629,27	176,26	605,80	525,04	721,80	19
<b>MDV (mm/s)</b>	64,71	32,77	58,64	41,04	90,32	19
<b>TAMX (mm/s)</b>	343,39	97,99	333,32	276,53	381,87	19
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	47505,09	13802,09	47894,95	38936,61	53984,75	19
<b>t (ms)</b>	11,79	2,77	12,50	10,00	14,38	19
<b>PI</b>	1,67	0,16	1,67	1,56	1,78	19
<b>RI</b>	0,90	0,05	0,90	0,86	0,94	19
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	293,03	126,76	284,41	200,21	345,69	19

Tabla 45. Resultados de los datos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en los 19 ratones que presentaron ondas con patrón de flujo de resistencia intermedia en la aorta prerrenal.

### **C.1.5 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL POSTRENAL**

#### **C.1.5.1 Abordaje ecográfico**

Para estudiar la aorta descendente abdominal postrenal puede seguirse el mismo abordaje que en la aorta prerrenal.

Una vez localizada la aorta en sección transversa gracias a la ventana acústica creada por el hígado, se desplaza el transductor caudalmente. Se siguen las ramas de la aorta de craneal a caudal hasta unos micrómetros por detrás del origen de la arteria renal izquierda. La vena renal izquierda discurre paralela a la arteria pero es más larga que ésta ya que debe cruzar la superficie ventral de la aorta y pasa a la derecha de la línea media para desembocar en la vena cava caudal (Fig. 20).

Una vez obtenida la imagen de la aorta en sección transversa, puede rotarse el transductor 90° para examinar el vaso en sección longitudinal.

Para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado, el transductor y la plataforma donde descansa el ratón deben ajustarse y orientarse hasta obtener un ángulo de incidencia menor a 60°, evitando al mismo tiempo ejercer presión excesiva sobre el animal.

## RESULTADOS

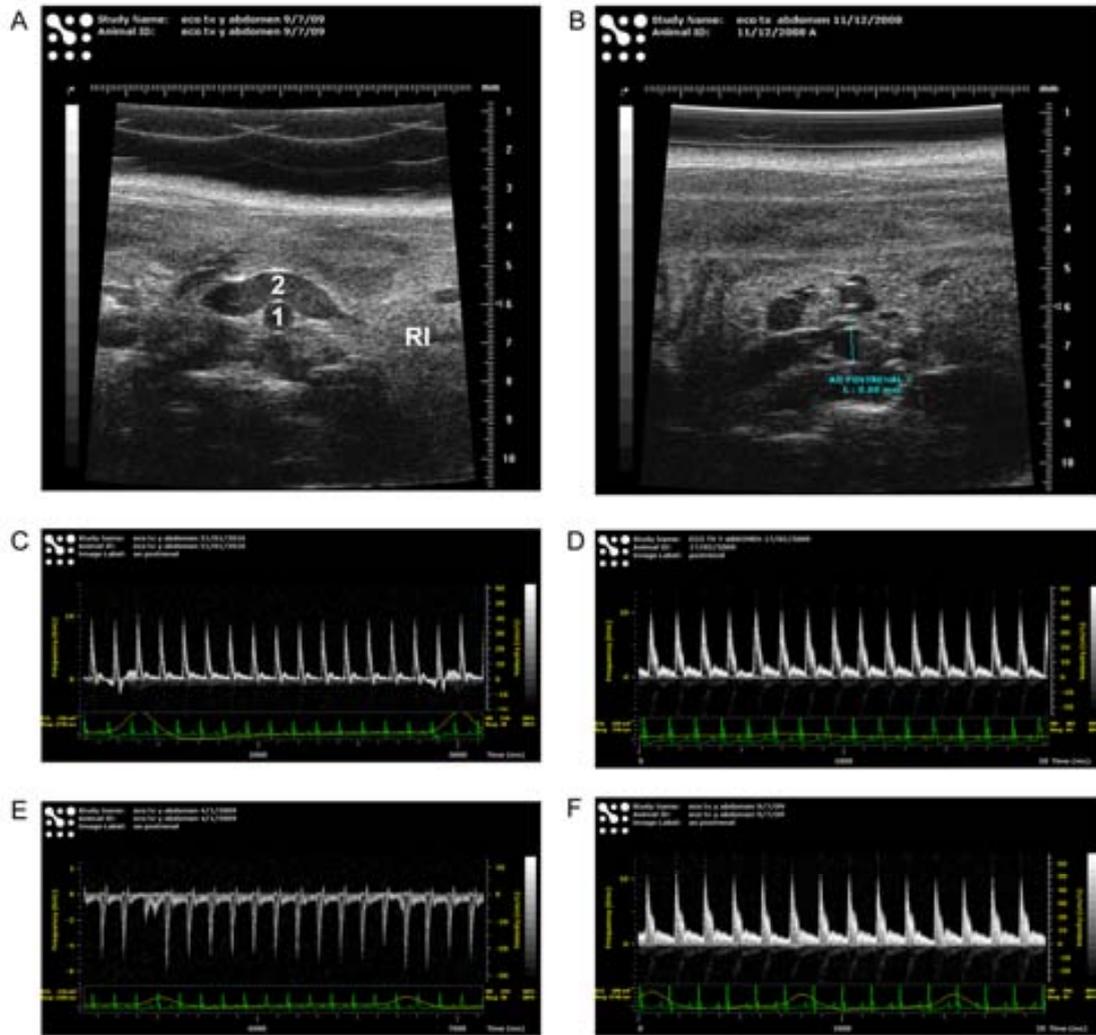


Fig. 20. A. Imagen ecográfica en modo bidimensional del abdomen de un ratón en el que se observa: (1) la aorta en plano transversal, el riñón izquierdo (RI) y la vena renal izquierda (2) que pasa por la superficie ventral de la aorta dirigiéndose hacia la vena cava caudal. B. Imagen ecográfica en plano transversal del diámetro de la aorta postrenal de otro ratón. C. Espectro Doppler pulsado obtenido de la aorta postrenal de un ratón que presenta flujo como de resistencia alta. D. Espectro Doppler de la aorta postrenal en la que se observa un perfil de velocidad de flujo como con resistencia intermedia. E. Espectro Doppler pulsado de la aorta postrenal de otro ratón con perfil de velocidad de flujo intermedio y resistencia alta. F. Espectro Doppler pulsado obtenido de la aorta postrenal de un ratón con flujo y resistencia intermedios.

Otro abordaje posible consiste en localizar la arteria renal izquierda en el hilio renal y seguirla hasta su origen en la aorta. Una vez en este punto, se desplaza el transductor hacia caudal y se procede como en el caso anterior.

### C.1.5.2 Descripción de los resultados obtenidos

#### C.1.5.2.1 Ecografía bidimensional

No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los ratones estudiados.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la aorta descendente abdominal postrenal pudo medirse en todos los machos estudiados (10/10) y en todas las hembras excepto una (16/17) (Fig. 20). El valor medio de este diámetro es de  $0,77 \pm 0,11$  mm y el del área de  $0,47 \pm 0,13$  mm<sup>2</sup>. En las Tablas 46, 47 y 48 se muestran los valores de diámetro y área para este vaso para el conjunto de los animales y según el género.

Aorta descendente abdominal postrenal						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,77	0,11	0,77	0,71	0,88	26
Área (mm <sup>2</sup> )	0,47	0,13	0,47	0,40	0,61	26

Tabla 46. Diámetro y área de la aorta postrenal en el conjunto de los animales, sin considerar su sexo.

Aorta descendente abdominal postrenal. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,77	0,15	0,85	0,66	0,88	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,48	0,17	0,57	0,34	0,61	10

Tabla 47. Diámetro y área de la aorta postrenal de los machos.

Aorta descendente abdominal postrenal. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,76	0,08	0,76	0,72	0,81	16
Área (mm <sup>2</sup> )	0,46	0,10	0,45	0,40	0,52	16

Tabla 48. Diámetro y área de la aorta postrenal de las hembras.

#### C.1.5.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Los registros Doppler pulsado se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a 60° en el 72,00% de los casos (60,00% en machos y 80,00% en hembras).

#### Descripción de la onda Doppler pulsado de la aorta descendente abdominal postrenal

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los machos y en 15/17 hembras.

## RESULTADOS

El 8,00% de los animales presentó un flujo de tipo romo mientras que el 92,00% restante tenía un flujo de tipo intermedio. En esta localización, el 72,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia intermedia y un 28,00% tuvo resistencia alta con flujo reverso. En la Tabla 49 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

Aorta descendente abdominal postrenal		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Romo	2	8,00%	2	20,00%	0	0,00%
	Intermedio	23	92,00%	8	80,00%	15	100,00%
<b>Ondas</b>	Resistencia alta	7	28,00%	5	50,00%	2	13,30%
	Resistencia intermedia	18	72,00%	5	50,00%	13	86,70%

Tabla 49. Características del espectro Doppler pulsado de la aorta postrenal.

Según cómo se posicionan el transductor y la plataforma donde se encuentra el ratón, el espectro Doppler queda por encima o por debajo de la línea base dependiendo de si la sangre se dirige o no hacia el transductor respectivamente (Fig. 20).

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler en la aorta descendente abdominal postrenal se realizó teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $460,85 \pm 59,28$  latidos por minuto.

Los datos que se muestran en las Tablas 50, 51 y 52 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia alta o intermedia. Por este motivo la desviación estándar de la velocidad diastólica mínima es elevada, ya que contiene valores tanto positivos como negativos. Lo mismo ocurre con la velocidad media.

Aorta descendente abdominal postrenal						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	460,85	59,28	459,00	426,00	518,33	25
PSV (mm/s)	574,06	227,55	488,98	410,83	762,93	25
MDV (mm/s)	36,85	62,02	29,58	-16,74	70,08	25
TAMX (mm/s)	303,47	127,14	278,55	189,36	404,09	25
a (mm/s <sup>2</sup> )	45179,81	16920,48	41951,82	35035,81	50262,24	25
t (ms)	12,03	2,31	12,50	10,83	13,33	25
PI	1,87	0,31	1,86	1,64	2,07	25
RI	0,96	0,10	0,97	0,91	1,04	25
F (mm <sup>3</sup> /s)	142,07	64,70	135,12	107,78	183,30	25

Tabla 50. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta postrenal de todos los ratones, sin considerar su sexo.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente abdominal postrenal. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	474,60	63,74	493,17	428,67	518,33	10
PSV (mm/s)	595,48	256,35	478,15	410,83	884,89	10
MDV (mm/s)	20,46	72,03	-7,79	-33,75	57,52	10
TAMX (mm/s)	300,74	138,41	255,84	189,36	440,86	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	45117,87	18848,07	39833,88	35035,81	54724,85	10
t (ms)	11,92	1,62	12,50	10,83	13,33	10
PI	2,02	0,29	2,05	1,83	2,22	10
RI	1,00	0,10	1,02	0,93	1,09	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	150,17	81,02	151,08	112,68	189,11	10

Tabla 51. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta postrenal de los ratones macho.

<b>Aorta descendente abdominal postrenal. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	451,69	56,46	459,00	402,33	504,00	15
PSV (mm/s)	559,77	214,41	533,61	341,07	762,93	15
MDV (mm/s)	47,78	54,21	35,55	7,28	84,87	15
TAMX (mm/s)	305,30	124,04	298,04	175,72	404,09	15
a (mm/s <sup>2</sup> )	45221,11	16199,54	43285,14	33709,19	50262,24	15
t (ms)	12,11	2,73	11,67	10,00	14,17	15
PI	1,76	0,29	1,82	1,50	1,89	15
RI	0,93	0,09	0,92	0,85	0,98	15
F (mm <sup>3</sup> /s)	136,66	53,65	130,71	99,55	183,30	15

Tabla 52. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta postrenal de los ratones hembra.

Si dividimos estos datos según si las ondas Doppler son de resistencia alta o intermedia, obtenemos las Tablas 53 y 54 respectivamente.

<b>Aorta descendente abdominal postrenal. Ondas de resistencia alta</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
Diámetro (mm)	0,73	0,16	0,74	0,65	0,85	7
Área (mm <sup>2</sup> )	0,43	0,17	0,43	0,33	0,57	7
HR (bpm)	479,90	58,22	505,50	434,25	522,00	7
PSV (mm/s)	360,14	87,06	392,47	257,24	436,88	7
MDV (mm/s)	-28,46	10,36	-31,93	-34,98	-18,59	7
TAMX (mm/s)	180,97	54,55	182,05	123,24	213,77	7
a (mm/s <sup>2</sup> )	32497,93	10933,16	31787,03	26444,04	37790,53	7
t (ms)	11,43	2,62	12,50	10,00	12,50	7
PI	2,20	0,23	2,25	2,10	2,32	7
RI	1,09	0,04	1,08	1,05	1,11	7
F (mm <sup>3</sup> /s)	84,18	53,33	64,31	49,24	115,73	7

Tabla 53. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta abdominal postrenal de los ratones con ondas Doppler de resistencia alta.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente abdominal postrenal. Ondas de resistencia intermedia</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,78	0,09	0,79	0,72	0,88	18
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,49	0,11	0,49	0,41	0,61	18
<b>HR (bpm)</b>	453,44	57,98	450,67	413,42	504,92	18,
<b>PSV (mm/s)</b>	657,25	205,96	639,34	486,14	838,57	18
<b>MDV (mm/s)</b>	62,25	53,75	47,30	24,46	24,46	18
<b>TAMX (mm/s)</b>	349,67	114,07	345,55	262,03	447,63	18
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	50111,66	17763,12	45834,12	37293,33	58347,16	18
<b>t (ms)</b>	12,27	2,96	12,50	10,00	15,00	18
<b>PI</b>	1,78	0,33	1,78	1,52	1,95	18
<b>RI</b>	0,91	0,07	0,93	0,87	0,97	18
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	164,58	54,68	151,08	125,37	188,02	18

Tabla 54. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la aorta abdominal postrenal de los ratones con ondas Doppler de resistencia intermedia.

### **C.1.6 AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PREILIACA**

#### **C.1.6.1 Abordaje ecográfico**

Para estudiar la aorta descendente abdominal preiliaca puede seguirse el mismo abordaje que en la aorta postrenal. Una vez localizada la aorta en plano transversal en el abdomen medio se dirige caudalmente el transductor hasta visualizar la bifurcación de la aorta en arterias ilíacas comunes. Se realizan las mediciones unos micrómetros craneal a esta bifurcación (Fig. 21). A medida que nos desplazamos caudalmente por la cavidad abdominal debe disminuirse la presión del transductor sobre el abdomen del animal ya que los vasos son más superficiales.

Otro abordaje posible consiste en explorar en sección transversal la cavidad pélvica utilizando la vejiga de la orina como ventana acústica. La aorta se sitúa dorsal a la vejiga. Este abordaje puede verse afectado por artefactos debidos a la presencia de gas o de heces en el colon descendente.

Una vez obtenida la imagen de la aorta en sección transversal puede rotarse el transductor 90° para examinarla en sección longitudinal. Para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado, el transductor y la plataforma donde descansa el ratón deben ajustarse y orientarse hasta obtener un ángulo de incidencia menor a 60°, evitando al mismo tiempo ejercer presión excesiva sobre el animal.

### C.1.6.2. Descripción de los resultados obtenidos

#### C.1.6.2.1 Ecografía bidimensional

No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los ratones estudiados.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la aorta descendente abdominal preiliaca pudo medirse en todos los machos estudiados (10/10) y en todas las hembras excepto una (16/17) (Fig. 21).

En esta localización, la aorta tiene un diámetro de  $0,67 \pm 0,12$  mm y un área de  $0,36 \pm 0,12$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 55, 56 y 57 se muestran los valores del diámetro y el área de esta localización según el género del animal.

Aorta descendente abdominal preiliaca						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,67	0,12	0,68	0,57	0,74	26
Área (mm <sup>2</sup> )	0,36	0,12	0,36	0,26	0,43	26

Tabla 55. Diámetro y área de la aorta preiliaca en el conjunto de los animales, sin considerar su sexo.

Aorta descendente abdominal preiliaca. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,69	0,15	0,74	0,53	0,79	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,39	0,15	0,42	0,22	0,49	10

Tabla 56. Diámetro y área de la aorta preiliaca en los machos.

Aorta descendente abdominal preiliaca. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,66	0,09	0,66	0,59	0,70	16
Área (mm <sup>2</sup> )	0,34	0,10	0,32	0,27	0,38	16

Tabla 57. Diámetro y área en la aorta preiliaca de las hembras.

## RESULTADOS

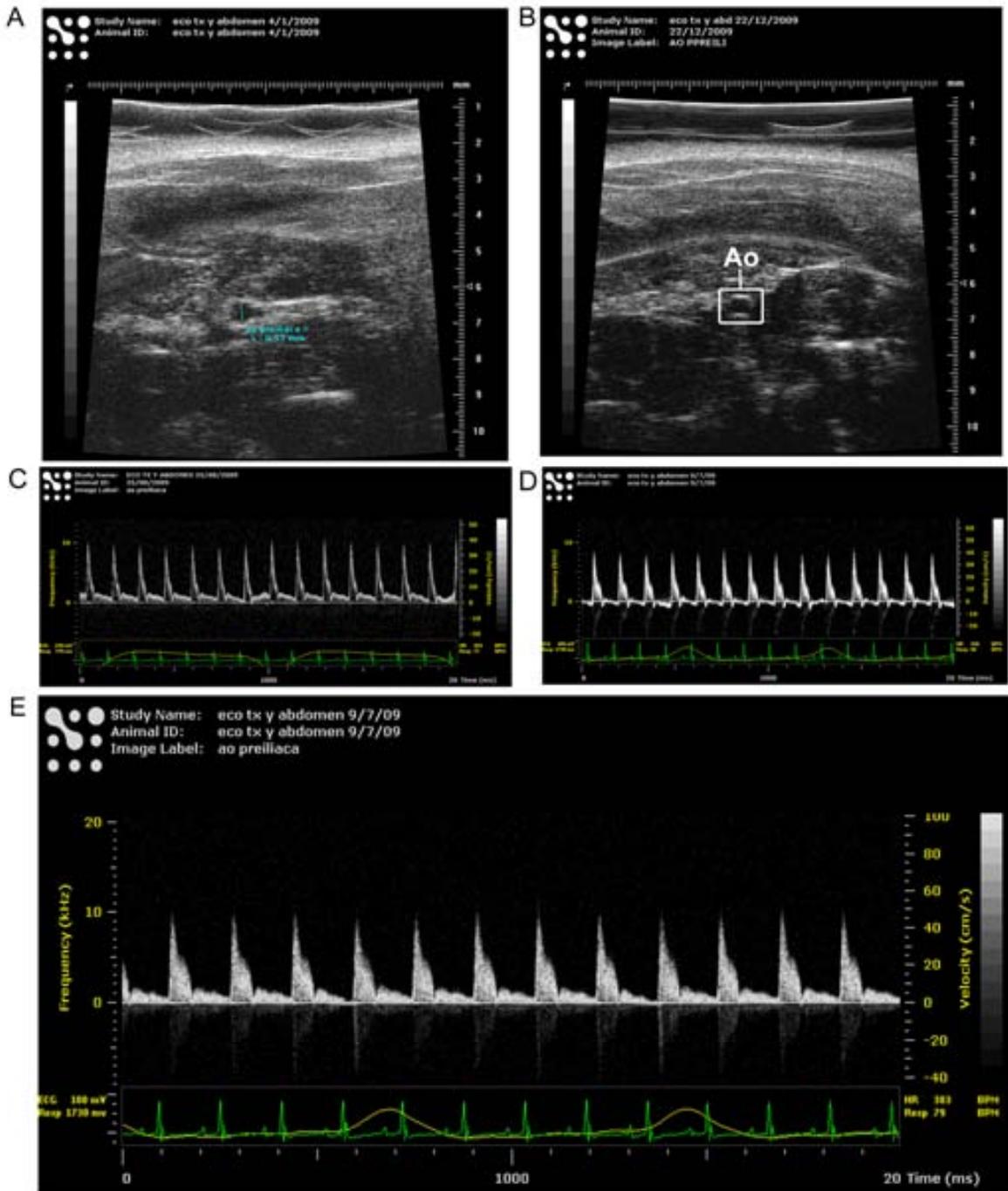


Fig. 21. Aorta preliaca. A y B. Imágenes en modo bidimensional del abdomen caudal de un ratón en el que se observa una sección transversa de la aorta preliaca (Ao), que aparece como una estructura redondeada y anecogénica, con paredes hiperecogénicas. C. Espectro Doppler pulsado de la aorta preliaca de un ratón que presenta flujo como con resistencia intermedia. D. Espectro Doppler pulsado de la aorta preliaca en otro ratón con perfil de velocidad de flujo como y resistencia intermedia. E. Espectro Doppler pulsado observado de forma más frecuente en la aorta preliaca del ratón. Se caracteriza por presentar un perfil de velocidad de flujo intermedio con resistencia intermedia.

### C.1.6.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Los registros Doppler pulsado se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a 60° en el 65,40% de los casos (80,00% en machos y 56,30% en hembras).

#### Descripción de la onda Doppler pulsado de la aorta descendente abdominal preiliaca

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los machos y en todas las hembras excepto en una.

El 3,80% de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo tipo romo mientras que el 96,20% restante tenía un flujo de tipo intermedio. En esta localización, el 96,20% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia intermedia y un 3,80% tenía resistencia alta con flujo reverso. En la Tabla 58 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

Aorta descendente abdominal preiliaca		Total		Machos		Hembras	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Romo	1	3,80%	1	10,00%	0	0,00%
	Intermedio	25	96,20%	9	90,00%	16	100,00%
<b>Ondas</b>	Resistencia alta	1	3,80%	0	00,00%	1	6,30%
	Resistencia intermedia	25	96,20%	10	100,00%	15	93,80%

Tabla 58. Características del espectro Doppler pulsado de la aorta preiliaca en los ratones estudiados.

Según cómo se posicionan el transductor y la plataforma donde se encuentra el ratón, el espectro Doppler se obtiene por encima o por debajo de la línea base (Fig. 21).

#### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler pulsado en la aorta descendente abdominal preiliaca se obtuvo con una frecuencia cardiaca de  $443,92 \pm 64,86$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

Los valores numéricos de cada uno de los datos quedan representados en las Tablas 59, 60 y 61.

## RESULTADOS

<b>Aorta descendente abdominal preiliaca</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	443,92	64,86	439,00	381,00	511,00	26
PSV (mm/s)	462,84	131,77	478,81	394,45	538,57	26
MDV (mm/s)	36,53	35,87	27,13	14,92	63,31	26
TAMX (mm/s)	245,91	70,78	251,84	204,23	294,54	26
a (mm/s <sup>2</sup> )	37434,84	12340,03	36527,36	29567,81	46050,60	26
t (ms)	11,86	2,15	11,67	10,83	13,33	26
PI	1,77	0,24	1,81	1,66	1,90	26
RI	0,93	0,11	0,93	0,88	0,98	26
F (mm <sup>3</sup> /s)	87,38	38,37	85,09	66,53	102,89	26

Tabla 59. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta preiliaca de todos los ratones, sin considerar el sexo del animal.

<b>Aorta descendente abdominal preiliaca. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	448,93	69,26	452,00	387,00	511,00	10
PSV (mm/s)	462,31	134,26	453,04	394,45	524,78	10
MDV (mm/s)	38,67	24,12	32,46	17,18	63,31	10
TAMX (mm/s)	235,55	65,28	222,73	204,23	255,77	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	36970,22	13108,81	36699,81	29567,81	42885,19	10
t (ms)	12,00	1,72	12,50	10,83	12,50	10
PI	1,77	0,20	1,82	1,65	1,87	10
RI	0,91	0,06	0,92	0,88	0,94	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	93,19	44,32	98,80	66,53	106,79	10

Tabla 60. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta preiliaca de los ratones macho.

<b>Aorta descendente abdominal preiliaca. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	440,79	64,09	432,83	379,00	499,17	16
PSV (mm/s)	463,18	134,63	491,80	399,65	540,92	16
MDV (mm/s)	35,19	42,31	24,34	11,11	65,76	16
TAMX (mm/s)	252,38	75,35	266,96	209,76	295,66	16
a (mm/s <sup>2</sup> )	37725,23	12266,03	36527,36	28930,43	48413,85	16
t (ms)	11,77	2,43	11,67	9,17	13,75	16
PI	1,77	0,27	1,77	1,68	1,92	16
RI	0,94	0,13	0,94	0,88	0,98	16
F (mm <sup>3</sup> /s)	83,76	35,19	83,16	66,42	87,82	16

Tabla 61. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la aorta preiliaca de los ratones hembra.

## C.2 ESTADÍSTICA INFERENCIAL AORTA MURINA

La estadística inferencial se ha aplicado para describir el comportamiento y la evolución de las diferentes variables estudiadas a lo largo

de la aorta (aorta ascendente, descendente torácica y abdominal). Las mediciones realizadas en el arco aórtico no se incluyen en este análisis ya que el número de animales estudiados es menor y se considera insuficiente para realizar un análisis inferencial. Las variables sometidas a estudio son el diámetro y el área del vaso, frecuencia cardiaca, velocidades del flujo (máxima, mínima y media), aceleración y tiempo de aceleración, índices vasculares y flujo sanguíneo.

El objetivo de este análisis es estimar el comportamiento que tendrían las variables estudiadas en una población general que se sometiera a las mismas condiciones del presente estudio, basándose en los resultados obtenidos en esta muestra de 27 animales.

En la aorta, que es una estructura continua que cambia y evoluciona a lo largo de su recorrido, es posible realizar un estudio longitudinal del comportamiento de las diversas variables de interés desde su inicio, en la aorta ascendente, hasta el punto final, antes de la bifurcación de las arterias ilíacas comunes. Se ha considerado que el comportamiento de cada variable en un punto concreto de la aorta está relacionado con el comportamiento de la misma variable en un punto anterior al de la medición. Así por ejemplo, el diámetro de la aorta descendente torácica estará relacionado con el diámetro de la aorta ascendente.

Para hacer este análisis se han usado dos modelos diferentes. Cada modelo consta de dos partes:

1. Modelo 1.

- 1. a. Estudia el efecto independiente que tienen el vaso y el sexo en cada variable dependiente. En este modelo no se incluye el efecto del peso de los animales. Como resumen, el modelo se expresa de la siguiente manera:

$$\text{Modelo 1.a. Variable dependiente} = \mu + \text{Vaso} + \text{Sexo}$$

Con este modelo podemos ver, por ejemplo, si el diámetro de la aorta en conjunto (sin especificar una localización concreta) es diferente entre machos y hembras.

- 1. b. En una segunda parte se evalúa la interacción (vaso\*sexo) y se contrastan las diferencias de cada variable dependiente en cada localización según el género.

*Modelo 1.b. Variable dependiente =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo*

Las cinco localizaciones que se estudian son:

- Aorta ascendente.
- Aorta descendente torácica.
- Aorta descendente abdominal:
  - Prerrenal.
  - Postrenal.
  - Preiliaca.

Con este modelo podemos ver, por ejemplo, si el diámetro de la aorta ascendente (se especifica una localización concreta) es diferente entre machos y hembras.

## 2. Modelo 2.

- 2. a. También estudia el efecto independiente que tienen el vaso y el sexo en cada variable dependiente. A diferencia del modelo 1, en este caso se incluye el efecto del peso de los animales para valorar si las diferencias que se observan entre animales de sexo diferente pueden verse influidas por las diferencias de peso. Como resumen, el modelo se expresa de la siguiente manera:

*Modelo 2.a. Variable dependiente =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso*

Por ejemplo, si con el modelo 1.a se observan diferencias en el diámetro de la aorta en conjunto (sin especificar una localización concreta) entre animales de distinto sexo y, en el modelo 2.a estas diferencias desaparecen, podríamos pensar que las diferencias observadas en el modelo 1.a no se explican en su totalidad por el género, sino por el hecho de que los animales de diferente sexo tienen también un peso diferente y esto contribuye a la explicación de las posibles diferencias. Es posible, por tanto, que si hubiésemos estudiado animales de distinto sexo pero de peso similar entre sí no se hubieran observado diferencias en el modelo 1.a.

- 2. b. En la segunda parte, al igual que en el modelo 1.b, se evalúa la interacción (vaso\*sexo) y se contrastan las diferencias de cada variable dependiente en cada localización según el género, teniendo en cuenta el efecto del peso de los animales.

*Modelo 2.b. Variable dependiente =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo*

## RESULTADOS

Con este modelo podemos ver, por ejemplo, si el diámetro de la aorta ascendente (especificando una localización concreta) es diferente en machos y hembras, teniendo en cuenta el peso de los animales.

Por ejemplo, si con el modelo 1.b se observan diferencias en el diámetro de la aorta ascendente (se especifica una localización concreta) entre machos y hembras y, en el modelo 2.b estas diferencias desaparecen, podríamos pensar que las diferencias observadas en el modelo 1.b no se explican en su totalidad por el género, sino por el hecho de que los animales de diferente sexo tendrían también un peso diferente que podría ser la explicación de estas diferencias. Si hubiésemos estudiado animales de distinto sexo pero de peso similar, seguramente no se hubiesen observado diferencias en el modelo 1.b.

### C.2.1 DIÁMETRO

El promedio del diámetro luminal de la aorta disminuye progresivamente desde su inicio hasta el final, mostrando diferencias estadísticamente significativas entre sí (ver índices en las Tablas 62 y 63). Las localizaciones con índices iguales no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí. Las localizaciones con índices diferentes son estadísticamente diferentes entre sí.

Diámetro (D, mm)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,56 <sup>a</sup>	1,51	1,60
Aorta descendente torácica	1,15 <sup>b</sup>	1,08	1,22
Aorta descendente abdominal prerrenal	1,03 <sup>c</sup>	0,98	1,09
Aorta descendente abdominal postrenal	0,77 <sup>d</sup>	0,72	0,81
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,67 <sup>e</sup>	0,63	0,72

Tabla 62. Modelo 1.a. Diámetro =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,690. Los índices indican grupos diferenciados.

Diámetro (D, mm)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,56 <sup>a</sup>	1,51	1,62
Aorta descendente torácica	1,16 <sup>b</sup>	1,08	1,23
Aorta descendente abdominal prerrenal	1,04 <sup>c</sup>	0,98	1,09
Aorta descendente abdominal postrenal	0,77 <sup>d</sup>	0,72	0,82
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,68 <sup>e</sup>	0,62	0,73

Tabla 63. Modelo 2.a. Diámetro =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,511; P-valor para peso=0,561. Los índices indican grupos diferenciados.

## RESULTADOS

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en el diámetro de la aorta no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo >0,05), por lo que se podría concluir que, en términos generales, el género no afecta al diámetro de la aorta, considerada en su conjunto (sin especificar localizaciones concretas). A partir del modelo 2.a se observa que el efecto del peso tampoco influye de forma estadísticamente significativa en el diámetro de la aorta en conjunto (P=0,561).

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias del diámetro en cada localización de la aorta según el género, se observan diferencias entre ambos modelos (1.b y 2.b) (Tablas 64 y 65).

Diámetro (D, mm)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1,54	1,47	1,62
	Aorta descendente torácica	1,11	1,01	1,21
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	1,10	1,01	1,19
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,77	0,68	0,86
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,69	0,61	0,78
Hembra	Aorta ascendente	1,56	1,51	1,62
	Aorta descendente torácica	1,17	1,09	1,26
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	0,99	0,92	1,05
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,76	0,73	0,80
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,66	0,61	0,70

Tabla 64. Modelo 1.b. Diámetro =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias según el género para el diámetro en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de la aorta descendente prerrenal (\*, P=0,044) según el género del animal.

En el modelo 1.b, el diámetro de la aorta descendente prerrenal es significativamente superior en machos que en hembras (P=0,044).

Con el modelo 2.b, que tiene en cuenta el efecto del peso en los datos, no se observan diferencias entre machos y hembras en la aorta descendente abdominal prerrenal.

Diámetro (D, mm)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1,58	1,44	1,71
	Aorta descendente torácica	1,14	0,97	1,32
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,13	1,01	1,25
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,80	0,66	0,95
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,72	0,57	0,88
Hembra	Aorta ascendente	1,54	1,46	1,63
	Aorta descendente torácica	1,15	1,04	1,27
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,97	0,86	1,07
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,74	0,66	0,83
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,64	0,56	0,71

Tabla 65. Modelo 2.b. Diámetro =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción teniendo en cuenta el vaso, sexo y el peso y se contrastan las diferencias entre sexos para diámetro en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el diámetro de los vasos según el género del animal.

### C.2.2 ÁREA

En ambos modelos se observa que el área de la luz de la aorta disminuye progresivamente a lo largo de su recorrido. Las diferencias entre las distintas localizaciones son estadísticamente significativas (ver índices en las Tablas 66 y 67).

Área (A, mm <sup>2</sup> )			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,91 <sup>a</sup>	1,80	2,02
Aorta descendente torácica	1,06 <sup>b</sup>	0,93	1,18
Aorta descendente abdominal prerrenal	0,85 <sup>c</sup>	0,76	0,94
Aorta descendente abdominal postrenal	0,47 <sup>d</sup>	0,42	0,52
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,36 <sup>e</sup>	0,31	0,41

Tabla 66. Modelo 1.a. Área =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,752. Los índices indican grupos diferenciados.

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en el área de la aorta en conjunto no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo >0,05), por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta al área de la aorta.

Con el modelo 2.a se observa que el efecto del peso en el área de la aorta en conjunto tampoco es estadísticamente significativo (P=0,466).

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias del área en cada localización según el género, se observan diferencias entre ambos modelos. En el modelo 1.b, el área luminal de la aorta descendente prerrenal es significativamente superior en machos que en hembras (P=0,048) (Tabla 68).

Área (A, mm <sup>2</sup> )			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,93 <sup>a</sup>	1,80	2,04
Aorta descendente torácica	1,07 <sup>b</sup>	0,94	1,20
Aorta descendente abdominal prerrenal	0,86 <sup>c</sup>	0,78	0,95
Aorta descendente abdominal postrenal	0,48 <sup>d</sup>	0,42	0,54
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,37 <sup>e</sup>	0,31	0,44

Tabla 67. Modelo 2.a Área =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,436; P-valor para peso=0,466. Los índices indican grupos diferenciados.

## RESULTADOS

Área (A, mm <sup>2</sup> )				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1,88	1,71	2,05
	Aorta descendente torácica	0,98	0,82	1,15
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	0,96	0,81	1,11
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,48	0,38	0,58
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,39	0,30	0,48
Hembra	Aorta ascendente	1,93	1,79	2,07
	Aorta descendente torácica	1,10	0,94	1,27
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	0,78	0,68	0,88
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,46	0,42	0,51
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,34	0,29	0,39

Tabla 68. Modelo1. b. Área =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para el área en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en el área de la aorta descendente prerrenal (\*, P=0,048) según el sexo del animal.

Mientras que en el modelo 2.b, al considerar el peso de los animales, no se observan estas diferencias (Tabla 69).

Área (A, mm <sup>2</sup> )				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1,95	1,70	2,19
	Aorta descendente torácica	1,05	0,77	1,33
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,03	0,84	1,21
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,55	0,35	0,74
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,45	0,25	0,66
Hembra	Aorta ascendente	1,89	1,72	2,05
	Aorta descendente torácica	1,06	0,86	1,26
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,74	0,59	0,89
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,42	0,30	0,54
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,30	0,19	0,41

Tabla 69. Modelo 2.b. Área =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para el área en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el área de los vasos según el género.

### C.2.3 FRECUENCIA CARDIACA

En los dos modelos, el intervalo de confianza de la frecuencia cardiaca al realizar las mediciones incluye valores superiores a 400 latidos por minuto (ver índices en las Tablas 70 y 71).

La frecuencia cardiaca en las diferentes localizaciones es similar, excepto en la aorta prerrenal y preiliaca. En ambos modelos se observa que la frecuencia cardiaca en la aorta descendente prerrenal es estadísticamente superior a la que tienen los ratones al medir la aorta descendente preiliaca (P=0,023).

En los dos modelos (1.a y 2.a) el efecto del género en la frecuencia cardiaca, en general, no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo

RESULTADOS

>0,05). A partir del modelo 2.a se concluye que el efecto del peso en la frecuencia cardiaca en la aorta en general tampoco es estadísticamente significativo (P=0,737).

HR (bpm)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	447,78 <sup>ab</sup>	425,75	469,80
Aorta descendente torácica	445,89 <sup>ab</sup>	420,29	471,48
Aorta descendente abdominal prerrenal	473,35 <sup>a</sup>	449,23	497,48
Aorta descendente abdominal postrenal	461,40 <sup>ab</sup>	438,33	484,47
Aorta descendente abdominal preiliaca	444,72 <sup>b</sup>	419,48	469,96

Tabla 70. Modelo 1.a. Frecuencia cardiaca =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,650. Los índices indican grupos diferenciados.

HR (bpm)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	446,27 <sup>ab</sup>	422,94	469,59
Aorta descendente torácica	444,19 <sup>ab</sup>	417,34	471,04
Aorta descendente abdominal prerrenal	471,77 <sup>a</sup>	446,61	496,92
Aorta descendente abdominal postrenal	459,83 <sup>ab</sup>	436,26	483,41
Aorta descendente abdominal preiliaca	443,21 <sup>b</sup>	416,52	469,90

Tabla 71. Modelo 2.a. Frecuencia cardiaca =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,883; P-valor para peso=0,737. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias de la frecuencia cardiaca en cada localización según el género, no se observan diferencias en ninguno de los dos modelos (Tablas 72 y 73).

HR (bpm)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	448,07	414,74	481,39
	Aorta descendente torácica	453,60	422,84	484,36
	Aorta descendente abdominal prerrenal	473,27	435,74	510,79
	Aorta descendente abdominal postrenal	474,60	437,12	512,08
	Aorta descendente abdominal preiliaca	448,93	408,21	489,66
Hembra	Aorta ascendente	446,05	419,34	472,76
	Aorta descendente torácica	439,33	404,24	474,42
	Aorta descendente abdominal prerrenal	471,95	442,49	501,40
	Aorta descendente abdominal postrenal	451,17	424,45	477,89
	Aorta descendente abdominal preiliaca	440,50	410,12	470,89

Tabla 72. Modelo 1.b. Frecuencia cardiaca =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para HR en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia cardiaca registrada en cada vaso según el género del animal.

HR (bpm)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	438,76	374,85	502,66
	Aorta descendente torácica	444,08	382,87	505,28
	Aorta descendente abdominal prerrenal	463,96	401,30	526,61
	Aorta descendente abdominal postrenal	465,29	407,19	523,39
	Aorta descendente abdominal preiliaca	439,62	372,10	507,14
Hembra	Aorta ascendente	452,32	406,42	498,22
	Aorta descendente torácica	445,44	394,98	495,91
	Aorta descendente abdominal prerrenal	478,09	430,34	525,85
	Aorta descendente abdominal postrenal	457,35	413,03	501,67
	Aorta descendente abdominal preiliaca	446,78	399,20	494,35

Tabla 73. Modelo 2.b. Frecuencia cardiaca =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para frecuencia cardiaca en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la frecuencia cardiaca de los ratones en cada vaso según el género.

### C.2.4 VELOCIDAD SISTÓLICA MÁXIMA

En los dos modelos se observa que la velocidad sistólica máxima disminuye progresivamente desde la aorta ascendente, donde supera los 1000 mm/s de promedio, hasta la aorta descendente abdominal preiliaca, donde alcanza valores promedios de entre 400 y 500 mm/s. Las diferencias en la velocidad sistólica máxima de las cinco localizaciones evaluadas son estadísticamente significativas entre sí, excepto entre la aorta descendente abdominal prerrenal y postrenal (ver índices en las Tablas 74 y 75).

En el modelo 1.a el efecto del género en la velocidad sistólica máxima de la aorta en conjunto no es, en términos generales, estadísticamente significativo (P-valor para sexo=0,759) por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta la PSV de la aorta (Tabla 74).

Por el contrario, al utilizar el modelo 2.a se observa que, en términos generales, sí existen diferencias estadísticamente significativas en la velocidad sistólica máxima según si se estudia un macho o una hembra (P-valor para sexo=0,007). De la misma forma se observa que el efecto del peso en la velocidad sistólica máxima también es estadísticamente significativo (P=0,011) (Tabla 75). Esto nos indica que en general, machos y hembras tienen una PSV diferente y que el peso aporta información relevante al estudio.

## RESULTADOS

PSV (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1154,73 <sup>a</sup>	1081,90	1227,56
Aorta descendente torácica	790,80 <sup>b</sup>	748,19	833,42
Aorta descendente abdominal prerrenal	636,29 <sup>c</sup>	565,37	707,21
Aorta descendente abdominal postrenal	575,01 <sup>c</sup>	486,10	663,93
Aorta descendente abdominal preiliaca	463,96 <sup>d</sup>	414,12	513,79

Tabla 74. Modelo 1.a. PSV =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,759. Los índices indican grupos diferenciados.

PSV (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1141,76 <sup>a</sup>	1067,38	1216,13
Aorta descendente torácica	773,70 <sup>b</sup>	729,69	817,70
Aorta descendente abdominal prerrenal	622,38 <sup>c</sup>	553,54	691,22
Aorta descendente abdominal postrenal	561,17 <sup>c</sup>	473,60	648,74
Aorta descendente abdominal preiliaca	451,11 <sup>d</sup>	403,12	499,11

Tabla 75. Modelo 2.a. PSV =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,007; P-valor para peso=0,011. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias de la velocidad sistólica máxima en cada localización según el género, se observan diferencias entre ambos modelos. Así, en el modelo 1.b, la velocidad sistólica máxima en la aorta ascendente y en la aorta descendente prerrenal es estadísticamente diferente entre machos y hembras (P=0,008 y P=0,029 respectivamente) (Tabla 76). En cambio, en el modelo 2.b, que tiene en cuenta además del efecto de sexo el efecto del peso de los animales, no se observan diferencias en la aorta ascendente entre machos y hembras pero sí en la aorta descendente torácica (P=0,012), en la aorta descendente prerrenal (P=0,001) y en la aorta descendente abdominal preiliaca (P=0,006) (Tabla 77). Teniendo en cuenta que en el modelo 2.a se ha visto que el peso es una covariable importante (P=0,011), los resultados del modelo 2.b son los más interesantes. Si se repitiera el estudio con animales de pesos más homogéneos, es posible que en la aorta ascendente no se observaran diferencias entre machos y hembras (ya que es probable que estas diferencias no se expliquen en su totalidad por el género, sino también por el hecho de tener pesos diferentes). En cambio, es posible que las diferencias observadas en la aorta descendente torácica, prerrenal y preiliaca se manifestaran nuevamente. En este caso sería

## RESULTADOS

necesario realizar nuevos estudios para discriminar si las diferencias se deben a uno u otro factor o a ambos.

PSV (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente*	1262,30	1169,38	1355,22
	Aorta descendente torácica	759,51	697,35	821,66
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	553,25	481,28	625,22
	Aorta descendente abdominal postrenal	595,48	444,75	746,21
	Aorta descendente abdominal preiliaca	462,31	383,36	541,25
Hembra	Aorta ascendente*	1085,69	994,87	1176,51
	Aorta descendente torácica	809,00	751,66	866,34
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	690,09	590,29	789,89
	Aorta descendente abdominal postrenal	559,74	455,08	664,40
	Aorta descendente abdominal preiliaca	463,18	399,31	527,05

Tabla 76. Modelo 1.b.  $PSV = \mu + Vaso + Sexo + Vaso*Sexo$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias según el género en PSV en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en PSV en la aorta ascendente (\*,  $P=0,008$ ) y en la aorta descendente prerrenal (\*\*,  $P=0,029$ ) según el género del animal.

PSV (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1183,33	1068,64	1298,03
	Aorta descendente torácica*	673,54	571,94	775,14
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	474,28	389,72	558,85
	Aorta descendente abdominal postrenal	516,52	381,42	651,61
	Aorta descendente abdominal preiliaca***	383,34	309,54	457,14
Hembra	Aorta ascendente	1138,73	1037,42	1240,03
	Aorta descendente torácica*	859,89	792,65	927,14
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	741,52	632,50	850,53
	Aorta descendente abdominal postrenal	611,32	513,01	709,63
	Aorta descendente abdominal preiliaca***	516,43	455,27	577,59

Tabla 77. Modelo 2.b.  $PSV = \mu + Vaso + Sexo + Peso + Vaso*Sexo$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para PSV en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en PSV en la aorta descendente torácica (\* $P=0,012$ ), en la aorta descendente abdominal prerrenal (\*\*,  $P=0,001$ ) y en la aorta descendente abdominal preiliaca (\*\*\*,  $P=0,006$ ) según el género del animal.

### C.2.5 VELOCIDAD DIASTÓLICA MÍNIMA

En ambos modelos se observa que la velocidad diastólica mínima va aumentando progresivamente a lo largo de la aorta, lo que se traduce en una desaparición paulatina del flujo reverso al inicio de la diástole. En ambos modelos el flujo reverso se observa mayoritariamente en la aorta ascendente y descendente torácica y, al avanzar por el abdomen en sentido caudal, desaparece.

Las diferencias en la velocidad diastólica mínima entre la aorta ascendente, la descendente torácica y todos los puntos estudiados en el

## RESULTADOS

abdomen son estadísticamente significativas. Entre la aorta descendente prerrenal, postrenal y preiliaca no se observan diferencias (ver índices diferentes en las Tablas 78 y 79).

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en la velocidad diastólica mínima de la aorta en general no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo >0,05). En el modelo 2.a se observa además que el efecto del peso tampoco es estadísticamente significativo en la MDV de la aorta en general (P=0,959).

MDV (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	-188,70 <sup>a</sup>	-208,72	-168,69
Aorta descendente torácica	-114,56 <sup>b</sup>	-134,45	-94,68
Aorta descendente abdominal prerrenal	33,80 <sup>c</sup>	10,18	57,43
Aorta descendente abdominal postrenal	35,21 <sup>c</sup>	11,40	59,03
Aorta descendente abdominal preiliaca	34,84 <sup>c</sup>	20,80	48,89

Tabla 78. Modelo 1.a. MDV =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,156. Los índices indican grupos diferenciados.

MDV (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	-188,64 <sup>a</sup>	-208,12	-169,16
Aorta descendente torácica	-114,49 <sup>b</sup>	-134,41	-94,57
Aorta descendente abdominal prerrenal	33,87 <sup>c</sup>	9,69	58,06
Aorta descendente abdominal postrenal	35,28 <sup>c</sup>	10,27	60,29
Aorta descendente abdominal preiliaca	34,91 <sup>c</sup>	20,04	49,77

Tabla 79. Modelo 2.a. MDV =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,422; P-valor para peso=0,959. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias de la velocidad diastólica mínima en cada localización según el género, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los modelos (Tablas 80 y 81).

## RESULTADOS

MDV (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	-193,69	-228,42	-158,96
	Aorta descendente torácica	-112,55	-151,29	-73,81
	Aorta descendente abdominal prerrenal	8,77	-32,73	50,26
	Aorta descendente abdominal postrenal	20,46	-21,89	62,81
	Aorta descendente abdominal preiliaca	38,67	24,48	52,85
Hembra	Aorta ascendente	-182,86	-207,07	-158,64
	Aorta descendente torácica	-113,23	-132,40	-94,05
	Aorta descendente abdominal prerrenal	52,93	28,60	77,27
	Aorta descendente abdominal postrenal	47,56	21,15	73,97
	Aorta descendente abdominal preiliaca	35,18	15,11	55,26

Tabla 80. Modelo 1.b.  $MDV = \mu + Vaso + Sexo + Vaso*Sexo$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para MDV en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en MDV en las diferentes localizaciones según el género del animal.

MDV (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	-192,23	-227,14	-157,32
	Aorta descendente torácica	-111,00	-153,47	-68,54
	Aorta descendente abdominal prerrenal	10,23	-35,19	55,65
	Aorta descendente abdominal postrenal	21,92	-28,43	72,27
	Aorta descendente abdominal preiliaca	40,13	20,94	59,31
Hembra	Aorta ascendente	-183,84	-212,16	-155,52
	Aorta descendente torácica	-114,18	-137,00	-91,39
	Aorta descendente abdominal prerrenal	51,98	26,64	77,32
	Aorta descendente abdominal postrenal	46,60	19,71	73,49
	Aorta descendente abdominal preiliaca	34,20	15,05	53,34

Tabla 81. Modelo 2.b.  $MDV = \mu + Vaso + Sexo + Peso + Vaso*Sexo$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para MDV en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en MDV en cada vaso según el género.

### C.2.6 VELOCIDAD MEDIA

En ambos modelos se observa que el promedio de la velocidad media disminuye progresivamente desde la aorta ascendente hasta la aorta descendente abdominal preiliaca. Las diferencias en las cinco localizaciones evaluadas son estadísticamente significativas entre sí, excepto entre la aorta descendente abdominal prerrenal y la postrenal (ver índices en las Tablas 82 y 83).

En el modelo 1.a, el efecto del género en la velocidad media de la aorta en general (sin especificar localizaciones concretas) no es estadísticamente significativo ( $P$ -valor para sexo = 0,476) por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta la TAMX de la aorta (Tabla 82).

## RESULTADOS

Por el contrario, al utilizar el modelo 2.a se observa que, en general, sí existen diferencias estadísticamente significativas en la velocidad media según si se estudia un macho o una hembra (P-valor para sexo = 0,021). En cambio, el efecto del peso en la velocidad media en cada localización no es estadísticamente significativo (P=0,072) (Tabla 83). En este caso, como el peso no se considera una covariable significativa, los resultados más correctos serían los del modelo 1.a. Sin embargo, si se repitiera el estudio en nuevos animales y el P-valor del peso fuera menor a 0,05, los valores que obtendríamos serían similares a los del modelo 2.a (que, en general, el sexo y el peso sí tienen efecto en la TAMX de la aorta).

TAMX (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	633,99 <sup>a</sup>	589,99	677,99
Aorta descendente torácica	430,62 <sup>b</sup>	407,00	454,24
Aorta descendente abdominal prerrenal	344,43 <sup>c</sup>	307,30	381,56
Aorta descendente abdominal postrenal	302,18 <sup>c</sup>	252,59	351,76
Aorta descendente abdominal preiliaca	244,42 <sup>d</sup>	218,07	270,77

Tabla 82. Modelo 1.a. TAMX =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,476. Los índices indican grupos diferenciados.

TAMX (mm/s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	628,39 <sup>a</sup>	581,82	674,96
Aorta descendente torácica	423,14 <sup>b</sup>	398,61	447,68
Aorta descendente abdominal prerrenal	338,42 <sup>c</sup>	302,32	374,52
Aorta descendente abdominal postrenal	296,20 <sup>c</sup>	245,78	346,62
Aorta descendente abdominal preiliaca	238,88 <sup>d</sup>	211,92	265,83

Tabla 83. Modelo 2.a. TAMX =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,021; P-valor para peso=0,072. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias de la velocidad media en cada localización según el género, se observan diferencias entre ambos modelos. En el modelo 1.b, la velocidad media en la aorta descendente prerrenal es estadísticamente superior en hembras que en machos (P=0,013) (Tabla 84). En el modelo 2.b también se observa que la velocidad media es significativamente superior en las hembras en la aorta descendente prerrenal (P<0,001). Pero además, en la aorta descendente torácica y en la aorta descendente abdominal preiliaca se obtienen resultados similares (P=0,020 y P=0,013, respectivamente) (Tabla 85). Como la covariable

## RESULTADOS

peso no es significativa ( $P=0,072$ ), en este estudio los resultados más correctos serían los del modelo 1.b (sólo habría diferencias estadísticamente significativas en la aorta prerrenal). Sin embargo, si repitiéramos el estudio y el P-valor del peso fuese menor a 0,05, seguramente los resultados obtenidos serían similares a los del modelo 2.b.

TAMX (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	677,21	610,90	743,52
	Aorta descendente torácica	407,84	374,60	441,08
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	297,03	264,35	329,70
	Aorta descendente abdominal postrenal	300,74	219,35	382,12
Hembra	Aorta descendente abdominal preiliaca	235,55	197,17	273,94
	Aorta ascendente	609,38	556,04	662,72
	Aorta descendente torácica	447,60	414,37	480,82
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	378,20	323,24	433,17
	Aorta descendente abdominal postrenal	305,27	244,70	365,85
	Aorta descendente abdominal preiliaca	252,38	216,63	288,12

Tabla 84. Modelo 1.b. TAMX =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para TAMX en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en TAMX en la aorta descendente prerrenal (\*,  $P=0,013$ ) según el género del animal.

TAMX (mm/s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	643,13	559,68	726,57
	Aorta descendente torácica*	370,54	314,25	426,83
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	262,94	225,72	300,16
	Aorta descendente abdominal postrenal	266,65	183,53	349,77
	Aorta descendente abdominal preiliaca***	201,47	157,37	245,57
Hembra	Aorta ascendente	632,28	578,17	686,38
	Aorta descendente torácica*	469,48	429,32	509,65
	Aorta descendente abdominal prerrenal**	400,39	341,26	459,53
	Aorta descendente abdominal postrenal	327,53	270,72	384,34
	Aorta descendente abdominal preiliaca***	275,36	241,33	309,39

Tabla 85. Modelo 2.b. TAMX =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para TAMX en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en TAMX en la aorta descendente torácica (\* $P=0,020$ ), en la aorta descendente abdominal prerrenal (\*\*,  $P\leq 0,001$ ) y en la aorta descendente abdominal preiliaca (\*\*\*,  $P=0,013$ ) según el género.

### C.2.7 ACELERACIÓN

En ambos modelos la aceleración del flujo disminuye a lo largo de la aorta. Las diferencias en las localizaciones estudiadas son estadísticamente significativas entre sí, excepto entre la aorta descendente torácica y la prerrenal y entre la aorta prerrenal y la postrenal (ver índices en las Tablas 86 y 87).

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en la aceleración no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo  $> 0,05$ ), por lo que se

RESULTADOS

podría concluir que, en general, el género no afecta a la aceleración a lo largo de la aorta.

a (mm/s <sup>2</sup> )			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	144961,25 <sup>a</sup>	126078,40	163844,10
Aorta descendente torácica	55184,20 <sup>b</sup>	46495,68	63872,73
Aorta descendente abdominal prerrenal	47157,94 <sup>bc</sup>	40937,23	53378,65
Aorta descendente abdominal postrenal	45541,23 <sup>c</sup>	38499,37	52583,21
Aorta descendente abdominal preiliaca	37898,70 <sup>d</sup>	32973,94	42823,47

Tabla 86. Modelo 1.a. Aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,513. Los índices indican grupos diferenciados.

En el modelo 2.a, el efecto del peso en la aceleración tampoco es estadísticamente significativo (P=0,347).

a (mm/s <sup>2</sup> )			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	143927,55 <sup>a</sup>	125111,33	162743,78
Aorta descendente torácica	53867,57 <sup>b</sup>	44914,40	62820,73
Aorta descendente abdominal prerrenal	46052,72 <sup>bc</sup>	39910,40	52195,03
Aorta descendente abdominal postrenal	44446,46 <sup>c</sup>	37651,90	51241,02
Aorta descendente abdominal preiliaca	36875,59 <sup>d</sup>	32119,04	41632,14

Tabla 87. Modelo 2.a. Aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,591; P-valor para peso= 0,347. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias de la aceleración en cada localización según el género, se observan diferencias entre ambos modelos. En el modelo 1.b, la aceleración de la aorta descendente prerrenal es estadísticamente superior en las hembras (P=0,041) (Tabla 88).

a (mm/s <sup>2</sup> )				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	160611,21	136243,70	184978,71
	Aorta descendente torácica	55634,47	44246,90	67022,05
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	40086,07	32441,04	47731,11
	Aorta descendente abdominal postrenal	45117,87	34035,41	56200,33
	Aorta descendente abdominal preiliaca	36970,22	29262,38	44678,05
Hembra	Aorta ascendente	134422,86	108351,40	160494,33
	Aorta descendente torácica	54219,06	42155,84	66282,28
	Aorta descendente abdominal prerrenal*	51207,10	43767,34	58646,85
	Aorta descendente abdominal postrenal	45129,75	37225,84	53033,65
	Aorta descendente abdominal preiliaca	37722,15	31902,91	43541,38

Tabla 88. Modelo 1.b. Aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para la aceleración en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en la aceleración en la aorta descendente prerrenal (\*, P=0,041) según el género del animal.

## RESULTADOS

En el modelo 2.b, al considerar el efecto del peso de los animales, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguna localización por lo que puede ser que las diferencias observadas en el modelo 1.b no se expliquen completamente por el género, sino que la diferencia de peso puede ser responsable en parte de los cambios (Tabla 89).

a (mm/s <sup>2</sup> )				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	154369,72	128095,92	180643,52
	Aorta descendente torácica	48948,22	31393,09	66503,36
	Aorta descendente abdominal prerrenal	33844,59	19051,90	48637,27
	Aorta descendente abdominal postrenal	38876,38	25336,26	52416,50
	Aorta descendente abdominal preiliaca	30728,73	17546,51	43910,95
Hembra	Aorta ascendente	138614,92	110626,58	166603,26
	Aorta descendente torácica	58237,96	43519,70	72956,21
	Aorta descendente abdominal prerrenal	55280,64	43025,36	67535,92
	Aorta descendente abdominal postrenal	49220,86	37493,78	60947,93
	Aorta descendente abdominal preiliaca	41931,26	31386,92	52475,60

Tabla 89. Modelo 2.b. Aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para la aceleración en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la aceleración en cada vaso según el género.

### C.2.8 TIEMPO DE ACELERACIÓN

En ambos modelos el tiempo de aceleración más bajo es el de la aorta ascendente, seguido por la aorta descendente abdominal en los tres puntos estudiados (que no difieren estadísticamente entre sí), y el más alto el de la aorta descendente torácica (ver índices en las Tablas 90 y 91).

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en el tiempo de aceleración en la aorta no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo > 0,05), por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta al tiempo de aceleración del flujo en la aorta.

t (ms)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	9,81 <sup>a</sup>	8,70	10,93
Aorta descendente torácica	15,38 <sup>c</sup>	13,45	17,30
Aorta descendente abdominal prerrenal	12,50 <sup>b</sup>	11,03	13,97
Aorta descendente abdominal postrenal	12,01 <sup>b</sup>	11,13	12,88
Aorta descendente abdominal preiliaca	11,83 <sup>b</sup>	11,01	12,65

Tabla 90. Modelo 1.a Tiempo de aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,742. Los índices indican grupos diferenciados.

RESULTADOS

En el modelo 2.a, el efecto del peso en el tiempo de aceleración tampoco es estadísticamente significativo (P=0,930).

t (ms)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	9,80 a	8,66	10,94
Aorta descendente torácica	15,36c	13,42	17,30
Aorta descendente abdominal prerrenal	12,49b	10,98	14,00
Aorta descendente abdominal postrenal	12,00b	11,15	12,84
Aorta descendente abdominal preiliaca	11,82b	10,95	12,69

Tabla 91. Modelo 2.a. Tiempo de aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,817; P-valor para peso=0,930. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias del tiempo de aceleración en cada localización según el género, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos modelos (Tablas 92 y 93).

t (ms)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	9,58	8,47	10,70
	Aorta descendente torácica	14,26	11,62	16,90
	Aorta descendente abdominal prerrenal	13,07	10,10	16,04
	Aorta descendente abdominal postrenal	11,92	10,97	12,87
	Aorta descendente abdominal preiliaca	12,00	10,99	13,01
Hembra	Aorta ascendente	10,00	8,30	11,70
	Aorta descendente torácica	16,14	13,55	18,73
	Aorta descendente abdominal prerrenal	12,17	11,01	13,33
	Aorta descendente abdominal postrenal	12,11	10,78	13,44
	Aorta descendente abdominal preiliaca	11,77	10,62	12,92

Tabla 92. Modelo 1.b. Tiempo de aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para el tiempo de aceleración en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de aceleración en las diferentes localizaciones según el género del animal.

t (ms)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	9,45	7,44	11,46
	Aorta descendente torácica	14,11	10,98	17,24
	Aorta descendente abdominal prerrenal	12,93	9,57	16,29
	Aorta descendente abdominal postrenal	11,78	9,97	13,608
	Aorta descendente abdominal preiliaca	11,87	10,20	13,53
Hembra	Aorta ascendente	10,09	8,05	12,13
	Aorta descendente torácica	16,23	13,40	19,05
	Aorta descendente abdominal prerrenal	12,26	10,71	13,80
	Aorta descendente abdominal postrenal	12,20	10,28	14,11
	Aorta descendente abdominal preiliaca	11,86	10,39	13,33

Tabla 93. Modelo 2.b. Tiempo de aceleración =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para el tiempo de aceleración en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el tiempo de aceleración en cada vaso según el género.

### C.2.9 ÍNDICE DE PULSATILIDAD

En la aorta, los índices de pulsatilidad más altos se observan en el tórax (aorta ascendente y descendente torácica) donde alcanzan valores promedio superiores a 2. En la aorta descendente abdominal postrenal y preiliaca se obtienen índices estadísticamente inferiores a los del tórax pero similares entre sí. Por último, en la aorta descendente prerrenal el índice de pulsatilidad es menor al de la aorta en el tórax y al de la aorta postrenal, pero similar al de la aorta preiliaca (ver índices diferentes en las Tablas 94 y 95).

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en el PI de la aorta no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo >0,05), por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta al índice de pulsatilidad de la aorta.

PI			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	2,13 <sup>a</sup>	2,07	2,20
Aorta descendente torácica	2,10 <sup>a</sup>	2,05	2,15
Aorta descendente abdominal prerrenal	1,76 <sup>c</sup>	1,68	1,84
Aorta descendente abdominal postrenal	1,88 <sup>b</sup>	1,76	1,99
Aorta descendente abdominal preiliaca	1,78 <sup>bc</sup>	1,69	1,87

Tabla 94. Modelo 1.a.  $PI = \mu + \text{Vaso} + \text{Sexo}$ . P-valor para sexo= 0,073. Los índices indican grupos diferenciados.

En el modelo 2.a, el efecto del peso en el PI en cada localización tampoco es estadísticamente significativo (P=0,453).

PI			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	2,12 <sup>a</sup>	2,05	2,20
Aorta descendente torácica	2,09 <sup>a</sup>	2,04	2,14
Aorta descendente abdominal prerrenal	1,75 <sup>c</sup>	1,67	1,84
Aorta descendente abdominal postrenal	1,87 <sup>b</sup>	1,74	1,99
Aorta descendente abdominal preiliaca	1,77 <sup>bc</sup>	1,66	1,88

Tabla 95. Modelo 2.a.  $PI = \mu + \text{Vaso} + \text{Sexo} + \text{Peso}$ . P-valor para sexo=0,992; P-valor para peso=0,453. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias del índice de pulsatilidad en cada localización según el género, se observan diferencias entre ambos modelos. En el modelo 1.b, el índice de pulsatilidad de la aorta postrenal es estadísticamente mayor en machos que en hembras (P=0,022) (Tabla 96).

## RESULTADOS

PI				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	2,16	2,04	2,27
	Aorta descendente torácica	2,13	2,04	2,23
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,84	1,68	1,99
	Aorta descendente abdominal postrenal*	2,02	1,85	2,19
	Aorta descendente abdominal preiliaca	1,77	1,65	1,89
Hembra	Aorta ascendente	2,10	2,04	2,17
	Aorta descendente torácica	2,06	2,02	2,10
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,70	1,62	1,77
	Aorta descendente abdominal postrenal*	1,76	1,62	1,90
	Aorta descendente abdominal preiliaca	1,76	1,64	1,90

Tabla 96. Modelo 1.b.  $PI = \mu + \text{Vaso} + \text{Sexo} + \text{Vaso} \times \text{Sexo}$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para PI en una localización concreta. Se observan diferencias estadísticamente significativas en PI en la aorta postrenal (\*,  $P=0,022$ ) según el género del animal.

En el modelo 2.b, no se observan diferencias en ninguna localización debidas al género (Tabla 97).

PI				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	2,10	1,88	2,31
	Aorta descendente torácica	2,07	1,91	2,24
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,78	1,57	1,99
	Aorta descendente abdominal postrenal	1,96	1,71	2,22
	Aorta descendente abdominal preiliaca	1,72	1,48	1,95
Hembra	Aorta ascendente	2,14	2,02	2,29
	Aorta descendente torácica	2,10	2,00	2,20
	Aorta descendente abdominal prerrenal	1,74	1,62	1,86
	Aorta descendente abdominal postrenal	1,80	1,65	1,95
	Aorta descendente abdominal preiliaca	1,80	1,67	1,94

Tabla 97. Modelo 2.b.  $PI = \mu + \text{Vaso} + \text{Sexo} + \text{Peso} + \text{Vaso} \times \text{Sexo}$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para PI en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en PI en cada vaso según el género.

### C.2.10 ÍNDICE DE RESISTENCIA

En los dos modelos se observa que el índice de resistencia de la aorta en el tórax es significativamente mayor que en el abdomen (ver índices en las Tablas 98 y 99) y que el efecto del género en el índice de resistencia de la aorta no es estadísticamente significativo ( $P$ -valor para sexo  $>0,05$ ), por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta al RI en la aorta.

RESULTADOS

RI			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,16a	1,15	1,18
Aorta descendente torácica	1,14a	1,12	1,17
Aorta descendente abdominal prerrenal	0,95b	0,91	0,99
Aorta descendente abdominal postrenal	0,96b	0,92	1,00
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,93b	0,89	0,97

Tabla 98. Modelo 1.a. RI =  $\mu$  + Vaso + Sexo. P-valor para sexo=0,635. Los índices indican grupos diferenciados.

En el modelo 2.a, el efecto del peso en el índice de resistencia de la aorta tampoco es estadísticamente significativo (P=0,884).

RI			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1,16a	1,15	1,18
Aorta descendente torácica	1,14a	1,12	1,17
Aorta descendente abdominal prerrenal	0,95b	0,91	0,99
Aorta descendente abdominal postrenal	0,96b	0,92	1,00
Aorta descendente abdominal preiliaca	0,93b	0,89	0,97

Tabla 99. Modelo 2.a. RI =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso. P-valor para sexo=0,625; P-valor para peso=0,884. Los índices indican grupos diferenciados.

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias del índice de resistencia en cada localización según el género, no se observan diferencias estadísticamente significativas en ninguno de los dos modelos (Tablas 100 y 101).

RI			
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%
			Inferior Superior
Macho	Aorta ascendente	1,15	1,13 1,18
	Aorta descendente torácica	1,14	1,10 1,19
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,99	0,90 1,06
	Aorta descendente abdominal postrenal	1,00	0,94 1,06
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,91	0,87 0,95
Hembra	Aorta ascendente	1,17	1,15 1,19
	Aorta descendente torácica	1,14	1,18 1,17
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,92	0,89 0,96
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,93	0,89 0,99
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,94	0,88 1,00

Tabla 100. Modelo 1.a. RI =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para RI en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en RI en ninguna localización según el género del animal.

## RESULTADOS

RI				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1,15	1,12	1,19
	Aorta descendente torácica	1,14	1,09	1,20
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,98	0,90	1,06
	Aorta descendente abdominal postrenal	1,00	0,93	1,07
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,91	0,86	0,95
Hembra	Aorta ascendente	1,17	1,14	1,20
	Aorta descendente torácica	1,14	1,11	1,17
	Aorta descendente abdominal prerrenal	0,92	0,89	0,96
	Aorta descendente abdominal postrenal	0,93	0,89	0,97
	Aorta descendente abdominal preiliaca	0,94	0,89	1,00

Tabla 101. Modelo 2.a.  $RI = \mu + Vaso + Sexo + Peso + Vaso*Sexo$ . Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexo para RI en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en RI en cada vaso según el género.

### C.2.11 FLUJO

En ambos modelos se observa que el flujo sanguíneo disminuye progresivamente a lo largo de la aorta. Las diferencias del flujo en cada localización evaluada son estadísticamente significativas entre sí (ver índices en las Tablas 102 y 103).

En ambos modelos (1.a y 2.a), el efecto del género en el flujo en la aorta no es estadísticamente significativo (P-valor para sexo >0,05), por lo que se podría concluir que, en general, el género no afecta al flujo en la aorta.

Flujo (mm <sup>3</sup> /s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1217,35 <sup>a</sup>	1108,35	1326,36
Aorta descendente torácica	457,90 <sup>b</sup>	395,22	520,59
Aorta descendente abdominal prerrenal	293,46 <sup>c</sup>	246,49	340,44
Aorta descendente abdominal postrenal	143,49 <sup>d</sup>	116,16	170,82
Aorta descendente abdominal preiliaca	88,97 <sup>e</sup>	71,15	106,79

Tabla 102. Modelo 1.a.  $Flujo = \mu + Vaso + Sexo$ . P-valor para sexo=0,671. Los índices indican grupos diferenciados.

En el modelo 2.a el efecto del peso en el valor del flujo de cada localización tampoco es estadísticamente significativo (P=0,969).

Flujo (mm <sup>3</sup> /s)			
Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Aorta ascendente	1217,66 <sup>a</sup>	1105,19	1330,12
Aorta descendente torácica	458,31 <sup>b</sup>	391,13	525,48
Aorta descendente abdominal prerrenal	293,79 <sup>c</sup>	246,50	341,08
Aorta descendente abdominal postrenal	143,81 <sup>d</sup>	109,44	178,18
Aorta descendente abdominal preiliaca	89,27 <sup>e</sup>	62,96	115,58

Tabla 103. Modelo 2.a.  $Flujo = \mu + Vaso + Sexo + Peso$ . P-valor para sexo=0,863; P-valor para peso=0,969. Los índices indican grupos diferenciados.

## RESULTADOS

Al evaluar la interacción (vaso\*sexo) y contrastar las diferencias en el flujo sanguíneo en cada localización según el género, no se observan diferencias significativas en ninguno de los dos modelos (Tablas 104 y 105).

Flujo (mm <sup>3</sup> /s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1286,01	1102,76	1469,26
	Aorta descendente torácica	399,79	325,03	474,54
	Aorta descendente abdominal prerrenal	290,02	228,73	351,31
	Aorta descendente abdominal postrenal	150,17	102,53	197,81
	Aorta descendente abdominal preiliaca	93,19	67,13	119,25
Hembra	Aorta ascendente	1171,87	1042,71	1301,03
	Aorta descendente torácica	493,97	407,82	580,11
	Aorta descendente abdominal prerrenal	293,62	225,98	361,25
	Aorta descendente abdominal postrenal	136,77	110,60	162,94
	Aorta descendente abdominal preiliaca	83,77	67,07	100,46

Tabla 104. Modelo 1.b. Flujo =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para el flujo en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en el flujo en ninguna localización según el género del animal.

Flujo (mm <sup>3</sup> /s)				
Sexo	Vaso	Media	Intervalo de confianza 95%	
			Inferior	Superior
Macho	Aorta ascendente	1285,42	1053,68	1517,16
	Aorta descendente torácica	399,16	268,18	530,14
	Aorta descendente abdominal prerrenal	289,43	194,63	384,22
	Aorta descendente abdominal postrenal	149,58	45,64	253,520
	Aorta descendente abdominal preiliaca	92,60	0,00	188,91
Hembra	Aorta ascendente	1172,27	1022,09	1322,45
	Aorta descendente torácica	494,36	383,63	605,08
	Aorta descendente abdominal prerrenal	294,01	199,64	388,37
	Aorta descendente abdominal postrenal	137,16	74,54	199,77
	Aorta descendente abdominal preiliaca	84,17	21,91	146,42

Tabla 105. Modelo 2.b. Flujo =  $\mu$  + Vaso + Sexo + Peso + Vaso\*Sexo. Se evalúa la interacción y se contrastan las diferencias entre sexos para el flujo en una localización concreta. No se observan diferencias estadísticamente significativas en flujo en cada vaso según el género.

### C.3 ESTUDIO ECOGRÁFICO VASOS PERIFÉRICOS

Se realizaron análisis descriptivos e inferenciales de los datos obtenidos ecográficamente en el tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda, arteria subclavia izquierda, arteria renal derecha y arteria femoral.

Los resultados descriptivos de las variables cuantitativas se han expresado como media y desviación estándar. Los resultados descriptivos de

las variables cualitativas se han expresado como frecuencia absoluta y porcentaje.

En el análisis inferencial, estas arterias se han estudiado de forma independiente, sin aplicar un modelo longitudinal. En ellas se ha empleado un modelo de Análisis de la Covarianza (ANCOVA), que permite valorar diferencias según el género en cada vaso periférico estudiado, ajustado por el peso del animal, que actúa como covariable.

Todos los resultados, tanto descriptivos como inferenciales, se exponen a continuación.

### **C.3.1 TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO**

#### **C.3.1.1 Abordaje ecográfico**

Puede valorarse completamente a partir de un abordaje paraesternal derecho en sección longitudinal, con el transductor en el tercio medio del tórax, paralelo al eje central del ratón, levemente dirigido hacia la izquierda y hacia dorsal.

Este abordaje permite examinar el origen de las tres ramas del arco aórtico en modo B y calcular el diámetro de la luz de cada una de estas localizaciones en sección longitudinal y transversa (rotando el transductor 90°) (Fig. 22). También permite obtener el registro Doppler pulsado del tronco braquiocefálico y realizar mediciones en él.

#### **C.3.1.2 Descripción de los resultados obtenidos**

##### **C.3.1.2.1 Ecografía bidimensional**

El tronco braquiocefálico pudo examinarse en 26 animales (10 machos y 16 hembras). En una de las hembras del estudio no fue posible obtener imágenes vasculares de calidad en el tórax.

No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de los casos.

##### **Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)**

El diámetro del tronco braquiocefálico pudo medirse en todos los machos (10/10) y en todas las hembras estudiadas (16/16) (Fig. 22).

## RESULTADOS

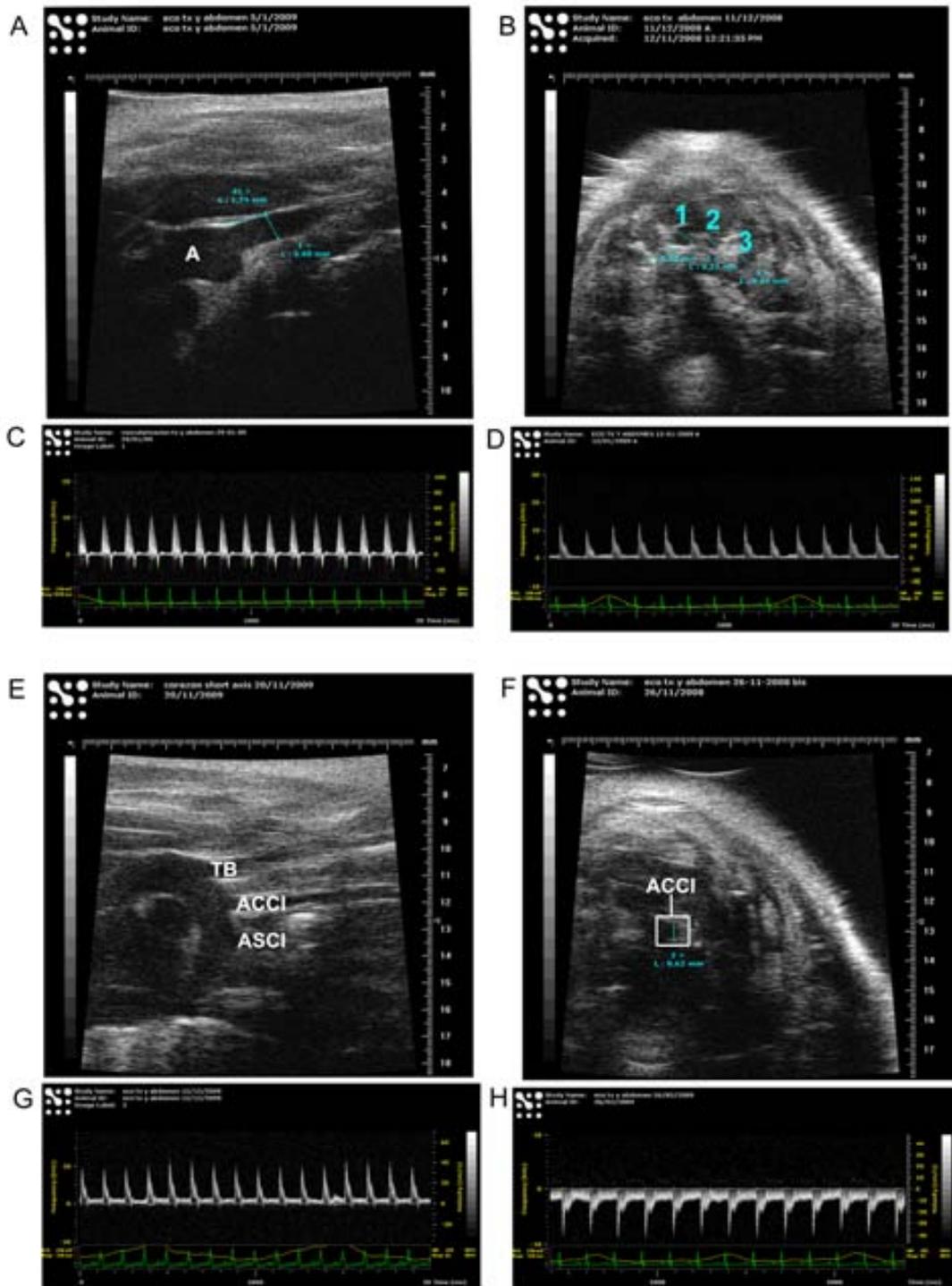


Fig. 22. A. Imagen ecográfica en la que se observa la aorta ascendente y la salida del tronco braquiocefálico en sección longitudinal. B. Imagen ecográfica transversa de la entrada del tórax en la que se observan las tres ramas del arco aórtico (1: TB; 2: ACCI; 3: ASCI). C. Espectro Doppler pulsado del TB, que presenta flujo intermedio con resistencia alta. D. Espectro Doppler del TB de otro ratón que presenta perfil de velocidad de flujo y resistencia intermedios. E. Imagen ecográfica bidimensional del arco aórtico en la que se observan sus tres ramas. F. Imagen ecográfica bidimensional transversa de la ACCI. G. Espectro Doppler pulsado de la ACCI de un ratón con perfil de velocidad de flujo intermedio y resistencia alta. H. Perfil de velocidad de flujo y resistencia intermedios en la ACCI de otro ratón.

## RESULTADOS

El diámetro medio de este vaso es de  $0,73 \pm 0,16$  mm y el área  $0,43 \pm 0,19$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 106, 107 y 108 se muestran los valores del diámetro y área del tronco braquiocefálico según el género.

Tronco braquiocefálico						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,73	0,16	0,73	0,60	0,84	26
Área (mm <sup>2</sup> )	0,43	0,19	0,42	0,28	0,55	26

Tabla 106. Diámetro y área del tronco braquiocefálico en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta su sexo.

Tronco braquiocefálico. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,75	0,17	0,73	0,63	0,80	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,46	0,21	0,42	0,31	0,50	10

Tabla 107. Diámetro y área del tronco braquiocefálico de los machos.

Tronco braquiocefálico. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,71	0,16	0,75	0,58	0,84	16
Área (mm <sup>2</sup> )	0,42	0,17	0,44	0,27	0,55	16

Tabla 108. Diámetro y área en el tronco braquiocefálico de las hembras.

No se observaron diferencias significativas en el diámetro ni en el área del TB según el sexo (diámetro  $P=0,247$ , área  $P=0,167$ ) ni según el peso de los animales (diámetro  $P=0,158$ , área  $P=0,119$ ).

### C.3.1.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los machos y en 15 hembras (15/16). El ángulo de incidencia fue menor a  $60^\circ$  en un 50,00% (5/10) de los machos y en un 86,70% (13/15) de las hembras.

#### Descripción de la onda Doppler pulsado del tronco braquiocefálico

En el 96,00% de los animales se observó un perfil de velocidad de flujo arterial de tipo intermedio (10/10 machos y 14/15 hembras) y en el 4,00% restante (1/15 hembras) un flujo de tipo romo. En este vaso, el 96,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia alta y el 4,00% restante ondas Doppler de resistencia intermedia sin flujo reverso. En la Tabla 109 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

## RESULTADOS

Tronco braquiocefálico		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Romo	1	4,00%	0	0,00%	1	6,70%
	Intermedio	24	96,00%	10	100,00%	14	93,30%
<b>Ondas</b>	Resistencia alta	24	96,00%	9	90,00%	15	100,00%
	Resistencia intermedia	1	4,00%	1	10,00%	0	0,00%

Tabla 109. Características del espectro Doppler pulsado del tronco braquiocefálico murino.

En el tronco braquiocefálico, debido al posicionamiento del transductor y a la dirección del flujo sanguíneo, el espectro Doppler queda por encima de la línea base ya que la sangre se dirige hacia el transductor (Fig. 22).

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler en el tronco braquiocefálico se obtuvo estando los animales a una frecuencia cardíaca de  $443,47 \pm 56,61$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

Los datos que se muestran en las Tablas 110, 111 y 112 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia alta o intermedia.

Tronco braquiocefálico						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
<b>HR (bpm)</b>	443,47	56,61	431,33	402,33	500,33	25
<b>PSV (mm/s)</b>	518,28	164,46	504,84	425,18	549,01	25
<b>MDV (mm/s)</b>	-72,13	31,95	-76,14	-87,05	-61,36	25
<b>TAMX (mm/s)</b>	268,36	85,26	249,66	216,73	300,86	25
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	67884,99	39220,38	60388,46	42290,15	70772,80	25
<b>t (ms)</b>	9,63	3,65	9,17	6,67	12,50	25
<b>PI</b>	2,22	0,18	2,22	2,16	2,31	25
<b>RI</b>	1,14	0,06	1,15	1,12	1,18	25
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	109,14	43,29	103,59	65,99	143,48	25

Tabla 110. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en el tronco braquiocefálico de todos los ratones, sin tener en cuenta el sexo del animal.

## RESULTADOS

<b>Tronco braquiocefálico. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>HR (bpm)</b>	443,73	46,16	440,83	400,00	494,00	10
<b>PSV (mm/s)</b>	544,85	143,08	505,72	466,22	674,85	10
<b>MDV (mm/s)</b>	-66,47	41,11	-85,90	-89,69	-50,07	10
<b>TAMX (mm/s)</b>	286,57	82,90	259,18	223,63	352,08	10
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	53079,86	19100,53	58491,95	35165,88	67376,42	10
<b>t (ms)</b>	11,92	3,40	11,67	10,00	14,17	10
<b>PI</b>	2,18	0,24	2,21	2,03	2,31	10
<b>RI</b>	1,13	0,08	1,14	1,10	1,18	10
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	126,52	48,64	141,85	96,33	171,45	10

Tabla 111. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en el tronco braquiocefálico de los ratones macho.

<b>Tronco braquiocefálico. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>HR (bpm)</b>	443,29	64,22	426,33	402,33	514,67	15
<b>PSV (mm/s)</b>	500,56	179,90	461,88	388,61	549,01	15
<b>MDV (mm/s)</b>	-75,91	25,00	-70,56	-87,05	-61,36	15
<b>TAMX (mm/s)</b>	256,22	87,45	237,00	211,42	300,86	15
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	77755,07	46276,38	60388,46	42290,15	113703,23	15
<b>t (ms)</b>	8,10	3,02	7,50	5,83	10,00	15
<b>PI</b>	2,25	0,12	2,23	2,16	2,32	15
<b>RI</b>	1,15	0,04	1,16	1,12	1,19	15
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	97,56	36,50	97,63	63,83	135,77	15

Tabla 112. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en el tronco braquiocefálico de los ratones hembra.

La frecuencia cardiaca y el flujo sanguíneo del tronco braquiocefálico son significativamente diferentes según el peso del animal ( $P=0,031$  y  $P=0,036$  respectivamente). Sin embargo, no se ven afectados por el género ( $P=0,056$  y  $P=0,273$  respectivamente). En una población sometida a las mismas circunstancias, se esperaría que la frecuencia cardiaca y el flujo sanguíneo aumentaran al aumentar el peso de los animales. Por cada gramo de peso la frecuencia cardiaca aumentaría 13,21 latidos por minuto y el flujo aumentaría 9,24 mm<sup>3</sup>/s.

Se observan diferencias estadísticamente significativas según el género del ratón en el índice de pulsatilidad ( $P=0,021$ ) y el tiempo de aceleración ( $P=0,002$ ), en los que, por otro lado, no se observan diferencias significativas debidas al efecto del peso del animal ( $P=0,053$  y  $P=0,056$  respectivamente) (Tablas 113 y 114).

## RESULTADOS

Sexo	PI		
	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Macho	2,01	1,82	2,19
Hembra	2,37	2,22	2,51

Tabla 113. Índice de pulsatilidad del TB, obtenido mediante análisis inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que el PI fuera mayor en hembras que en machos.

Sexo	t (ms)		
	Media	Intervalo de confianza 95%	
		Inferior	Superior
Macho	15,14	11,61	18,67
Hembra	5,95	3,27	8,63

Tabla 114. Tiempo de aceleración del TB, obtenido mediante análisis inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que las hembras tuvieran un tiempo de aceleración menor que los machos.

### C.3.2 ARTERIA CARÓTIDA COMÚN IZQUIERDA

#### C.3.2.1 Abordaje ecográfico

Para visualizar el origen de la arteria carótida común izquierda en modo bidimensional y medir su diámetro luminal se realiza el mismo abordaje que en el caso del tronco braquiocefálico (Fig. 22).

Para obtener el registro Doppler pulsado de la arteria carótida común izquierda y realizar mediciones en él puede utilizarse un abordaje paraesternal izquierdo en sección longitudinal (transductor en el tercio superior del tórax, paralelo al eje central del cuerpo del ratón, dirigido hacia caudal y ligeramente a la derecha).

#### C.3.2.2 Descripción de los resultados obtenidos

##### C.3.2.2.1 Ecografía bidimensional

La arteria carótida común izquierda pudo examinarse en 26 animales (10 machos y 16 hembras). No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de ellos.

##### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la arteria carótida común izquierda pudo medirse en todos los machos (10/10) y en 14 de las 16 hembras estudiadas (Fig. 22).

## RESULTADOS

La luz de este vaso mide  $0,60 \pm 0,12$  mm y el área  $0,30 \pm 0,10$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 115, 116 y 117 se muestran los valores del diámetro y del área según el género del animal.

Arteria carótida común izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,60	0,12	0,63	0,57	0,68	24
Área (mm <sup>2</sup> )	0,30	0,10	0,31	0,26	0,36	24

Tabla 115. Diámetro y área de la arteria carótida común izquierda en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

Arteria carótida común izquierda. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,59	0,11	0,61	0,56	0,65	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,29	0,09	0,29	0,25	0,33	10

Tabla 116. Diámetro y área de la arteria carótida común izquierda de los machos.

Arteria carótida común izquierda. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,61	0,13	0,65	0,57	0,69	14
Área (mm <sup>2</sup> )	0,30	0,11	0,33	0,26	0,38	14

Tabla 117. Diámetro y área de la arteria carótida común izquierda de las hembras.

No se observaron diferencias significativas ni en el diámetro ni en el área de la arteria carótida común izquierda debidas al sexo (diámetro  $P=0,850$ ; área  $P=0,637$ ) o al peso del animal (diámetro  $P=0,990$ ; área  $P=0,857$ ).

### C.3.2.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Se obtuvieron registros de Doppler pulsado en todos los machos y en 15 hembras (15/16). El ángulo de incidencia fue menor a 60° en un 60,00% (6/10) de los machos y en un 86,70% (13/15) de hembras.

### Descripción de la onda Doppler pulsado de la arteria carótida común izquierda

En todos los animales se observó un perfil de velocidad de flujo intermedio en este vaso. El 92,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia alta, con flujo reverso al inicio de la diástole, y el 8,00% restante

## RESULTADOS

mostró resistencia intermedia. En la Tabla 118 se reflejan estos datos y su distribución según el sexo del animal.

Arteria carótida común izquierda		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Intermedio	25	100,00%	10	100,00%	15	100,00%
	Resistencia alta	23	92,00%	9	90,00%	14	93,30%
<b>Ondas</b>	Resistencia intermedia	2	8,00%	1	10,00%	1	6,70%

Tabla 118. Características del espectro Doppler pulsado de la arteria carótida común izquierda murina.

Según al posicionamiento del transductor, el espectro Doppler de la arteria carótida común izquierda queda por encima o por debajo de la línea base, dependiendo de si la sangre se dirige o se aleja del transductor respectivamente (Fig. 22).

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler en la arteria carótida común izquierda se obtuvo estando los animales a una frecuencia cardiaca de  $428,44 \pm 67,96$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

Los datos que se muestran en las Tablas 119, 120 y 121 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia alta o intermedia.

Se observaron diferencias estadísticamente significativas en el índice de pulsatilidad de la arteria carótida común izquierda según el género del ratón ( $P=0,023$ ), siendo superior en las hembras. En el resto de variables hemodinámicas no hubo diferencias derivadas ni del sexo ni del peso (Tabla 122). En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaba que el PI en este vaso fuera superior en hembras que en machos.

Arteria carótida común izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
<b>HR (bpm)</b>	428,44	67,96	416,33	397,83	487,00	24
<b>PSV (mm/s)</b>	366,50	106,54	370,45	282,89	426,32	25
<b>MDV (mm/s)</b>	-48,95	35,71	-51,71	-65,63	-36,99	25
<b>TAMX (mm/s)</b>	191,70	58,34	192,36	150,14	229,96	25
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	42283,86	26991,99	35366,43	25029,15	44706,21	25
<b>t (ms)</b>	10,32	2,26	10,00	8,33	11,67	25
<b>PI</b>	2,20	0,23	2,19	2,07	2,34	25
<b>RI</b>	1,14	0,09	1,14	1,11	1,17	25
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	56,14	25,70	54,03	36,85	74,86	24

Tabla 119. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria carótida común izquierda de todos los ratones, sin considerar su sexo.

## RESULTADOS

<b>Arteria carótida común izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>HR (bpm)</b>	440,78	51,75	416,33	400,00	490,00	9
<b>PSV (mm/s)</b>	371,04	87,33	382,07	300,65	425,60	10
<b>MDV (mm/s)</b>	-46,77	28,90	-51,92	-62,94	-33,79	10
<b>TAMX (mm/s)</b>	198,53	51,68	198,72	161,76	222,78	10
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	36025,71	9774,78	34386,02	26747,18	43877,01	10
<b>t (ms)</b>	10,33	2,26	10,00	8,33	11,67	10
<b>PI</b>	2,16	0,20	2,11	2,04	2,29	10
<b>RI</b>	1,13	0,08	1,13	1,11	1,19	10
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	59,07	26,62	59,95	40,80	81,15	10

Tabla 120. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria carótida común izquierda de los ratones macho.

<b>Arteria carótida común izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>HR (bpm)</b>	421,04	76,82	416,33	361,33	484,00	15
<b>PSV (mm/s)</b>	363,48	120,54	321,80	256,88	487,30	15
<b>MDV (mm/s)</b>	-50,41	40,54	-51,71	-68,53	-36,99	15
<b>TAMX (mm/s)</b>	187,15	63,73	161,76	131,15	241,10	15
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	46455,96	33777,60	41472,97	23502,44	59281,85	15
<b>t (ms)</b>	10,31	2,34	10,83	8,33	11,67	15
<b>PI</b>	2,23	0,26	2,23	2,13	2,39	15
<b>RI</b>	1,14	0,10	1,15	1,11	1,16	15
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	54,04	25,82	54,03	35,17	74,74	14

Tabla 121. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria carótida común izquierda de los ratones hembra.

<b>Sexo</b>	<b>Media</b>	<b>PI</b>	
		<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Macho</b>	1,97	1,80	2,15
<b>Hembra</b>	2,36	2,17	2,54

Tabla 122. Índice de pulsatilidad de la ACCI, obtenido mediante estadística inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que el PI en este vaso fuera superior en hembras que en machos.

### C.3.3 ARTERIA SUBCLAVIA IZQUIERDA

#### C.3.3.1 Abordaje ecográfico

Para visualizar el origen de la arteria subclavia izquierda en modo bidimensional y medir su diámetro luminal se debe realizar el mismo abordaje que en el caso del tronco braquiocefálico (Fig. 23).

## RESULTADOS

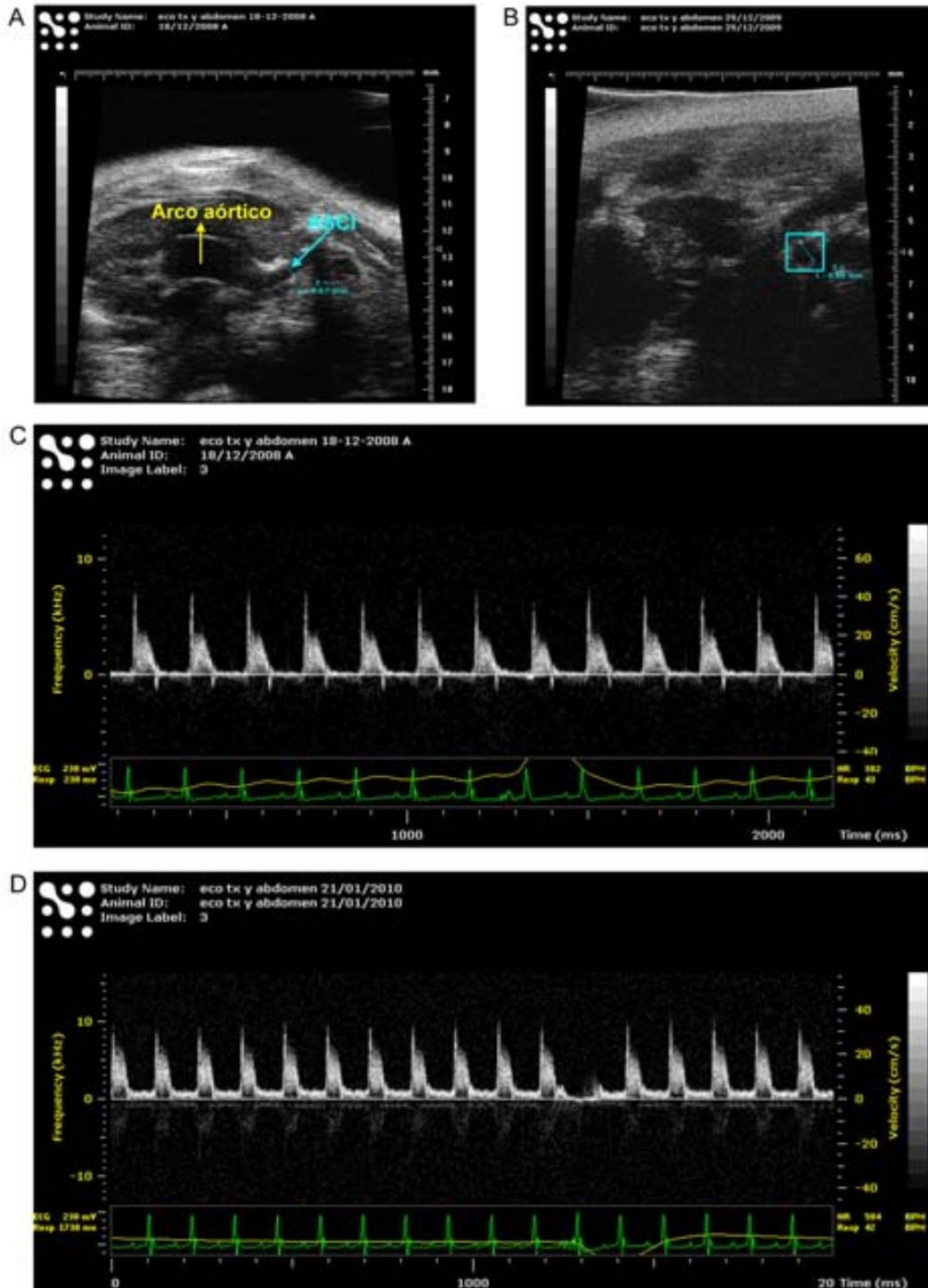


Fig. 23. A. Imagen ecográfica bidimensional del arco aórtico en la que se observa la salida de la arteria subclavia izquierda (ASCI) en sección longitudinal. B. Plano transverso de la arteria subclavia izquierda, que aparece como una estructura redondeada y anecogénica, de 0,66 mm de diámetro. C. Espectro Doppler pulsado de la arteria subclavia izquierda, que presenta un perfil de velocidad de flujo intermedio con resistencia alta. D. Espectro Doppler pulsado de la arteria subclavia izquierda de otro ratón en la que se observa un flujo arterial intermedio con resistencia intermedia.

Para obtener el registro Doppler pulsado de la arteria subclavia izquierda se realiza el mismo abordaje que en la arteria carótida común izquierda, pero en un plano paralelo a éste, desplazado ligeramente hacia la izquierda.

### C.3.3.2 Descripción de los resultados obtenidos

#### C.3.3.2.1 Ecografía bidimensional

La arteria subclavia izquierda pudo examinarse en 26 animales (10 machos y 16 hembras). No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de ellos.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la arteria subclavia izquierda pudo medirse en todos los machos (10/10) y en todas las hembras estudiados (16/16) (Fig. 23), siendo de  $0,56 \pm 0,10$  mm y el área de  $0,26 \pm 0,09$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 123, 124 y 125 se muestran los valores del diámetro y del área de este vaso según el género del animal.

Arteria subclavia izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,56	0,10	0,57	0,48	0,62	26
Área (mm <sup>2</sup> )	0,26	0,09	0,25	0,18	0,30	26

Tabla 123. Diámetro y área de la arteria subclavia izquierda en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

Arteria subclavia izquierda. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,55	0,08	0,57	0,48	0,59	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,24	0,07	0,25	0,18	0,27	10

Tabla 124. Diámetro y área de la arteria subclavia izquierda en los machos.

Arteria subclavia izquierda. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,57	0,11	0,57	0,48	0,67	16
Área (mm <sup>2</sup> )	0,26	0,10	0,26	0,18	0,35	16

Tabla 125. Diámetro y área de la arteria subclavia izquierda en las hembras.

No se observaron diferencias significativas ni en el diámetro ni en el área de la arteria subclavia izquierda debidas al sexo (diámetro  $P=0,535$ ; área  $P=0,658$ ) o al peso del animal (diámetro  $P=0,445$ ; área  $P=0,517$ ).

### C.3.3.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Se obtuvieron registros de Doppler pulsado en todos los machos y en 15 hembras (15/16). El ángulo de incidencia fue menor a 60° en un 90,00% (9/10) de los machos y en un 80,00% (12/15) de hembras.

#### Descripción de la onda Doppler pulsado de la arteria subclavia izquierda

El 100,00% de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo de tipo intermedio. Un 68,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia alta, con flujo reverso al inicio de la diástole, y el 32,00% restante tenía resistencia intermedia sin flujo reverso. En la Tabla 126 se muestran estos datos y su distribución según el sexo del animal.

Arteria subclavia izquierda		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
<b>Flujo</b>	Intermedio	25	100,00%	10	100,00%	15	100,00%
	Resistencia alta	17	68,00%	6	60,00%	11	73,30%
<b>Ondas</b>	Resistencia intermedia	8	32,00%	4	40,00%	4	26,70%

Tabla 126. Características del espectro Doppler pulsado de la arteria subclavia izquierda.

Debido al posicionamiento del transductor y a la dirección del flujo sanguíneo, el espectro Doppler queda por encima de la línea base ya que la sangre se dirige hacia el transductor (Fig. 23).

#### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler en la arteria subclavia izquierda se obtuvo teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $434,01 \pm 60,25$  latidos por minuto.

Los datos que se muestran en las Tablas 127, 128 y 129 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia alta o intermedia.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables hemodinámicas evaluadas, ni debidas al sexo ni al peso de los animales.

## RESULTADOS

<b>Arteria subclavia izquierda</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	434,01	60,25	431,33	383,00	493,33	25
PSV (mm/s)	392,15	113,31	339,06	318,10	472,22	25
MDV (mm/s)	-19,26	61,17	-41,53	-62,88	31,90	25
TAMX (mm/s)	210,42	62,09	188,40	177,30	249,68	25
a (mm/s <sup>2</sup> )	54213,67	28656,57	48187,52	38359,26	62900,17	25
t (ms)	8,14	3,88	7,50	6,67	9,17	25
PI	2,02	0,37	2,08	1,83	2,25	25
RI	1,06	0,16	1,11	0,93	1,19	25
F (mm <sup>3</sup> /s)	53,70	21,58	55,47	40,00	67,81	25

Tabla 127. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la arteria subclavia izquierda de todos los ratones, sin tener en cuenta el sexo del animal.

<b>Arteria subclavia izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	441,50	47,68	424,00	410,33	497,00	10
PSV (mm/s)	341,37	70,97	325,00	312,99	339,06	10
MDV (mm/s)	-7,68	58,32	-30,59	-41,53	40,56	10
TAMX (mm/s)	189,58	33,68	184,99	178,06	195,04	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	44464,34	14249,37	38886,33	34283,46	50302,53	10
t (ms)	7,08	2,46	7,50	5,00	8,33	10
PI	1,87	0,33	1,86	1,59	2,13	10
RI	1,02	0,17	1,09	0,86	1,11	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	45,23	14,11	44,91	40,00	55,47	10

Tabla 128. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria subclavia izquierda de los ratones macho.

<b>Arteria subclavia izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
HR (bpm)	429,02	68,52	456,00	362,00	493,33	15
PSV (mm/s)	426,00	125,31	435,29	333,85	533,97	15
MDV (mm/s)	-26,98	63,79	-56,65	-68,23	22,18	15
TAMX (mm/s)	224,31	73,23	218,22	160,61	292,72	15
a (mm/s <sup>2</sup> )	60713,22	34118,72	53159,22	46797,53	67172,89	15
t (ms)	8,85	4,54	8,33	6,67	9,83	15
PI	2,11	0,38	2,13	1,86	2,45	15
RI	1,09	0,15	1,13	0,94	1,20	15
F (mm <sup>3</sup> /s)	59,35	24,19	59,39	37,66	76,31	15

Tabla 129. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria subclavia izquierda de los ratones hembra.

Debido a que en la arteria subclavia izquierda un 32% de los ratones presentó flujo de resistencia intermedia y un 68% flujo de resistencia alta, los resultados descriptivos se han dividido también según la resistencia al flujo (Tablas 130 y 131).

## RESULTADOS

<b>Arteria subclavia izquierda. Ondas de resistencia alta</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,60	0,09	0,58	0,55	0,67	17
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,29	0,09	0,26	0,24	0,35	17
<b>HR (bpm)</b>	424,90	60,36	429,00	367,75	471,00	17
<b>PSV (mm/s)</b>	388,38	112,09	342,52	312,42	481,03	17
<b>MDV (mm/s)</b>	-57,06	18,99	-57,61	-69,55	-40,09	17
<b>TAMX (mm/s)</b>	205,14	62,56	187,15	163,34	258,53	17
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	50011,96	19028,95	47174,85	35282,11	62366,66	17
<b>t (ms)</b>	8,48	4,70	7,50	6,25	10,00	17
<b>PI</b>	2,22	0,26	2,19	2,07	2,36	17
<b>RI</b>	1,16	0,07	1,14	1,11	1,11	17
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	58,12	22,25	55,47	41,69	76,20	17

Tabla 130. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria subclavia izquierda de los 17 ratones con ondas de resistencia alta.

<b>Arteria subclavia izquierda. Ondas de resistencia intermedia</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,50	0,08	0,52	0,45	0,57	8
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,20	0,06	0,21	0,16	0,26	8
<b>HR (bpm)</b>	453,38	54,86	453,00	408,75	502,33	8
<b>PSV (mm/s)</b>	400,16	114,80	394,32	317,15	474,95	8
<b>MDV (mm/s)</b>	61,08	32,96	53,23	34,18	90,44	8
<b>TAMX (mm/s)</b>	216,90	65,42	204,14	172,25	258,46	8
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	63142,30	47828,14	46959,43	35625,80	64270,08	8
<b>t (ms)</b>	7,47	2,30	7,50	5,00	9,08	8
<b>PI</b>	1,58	0,19	1,56	1,45	1,74	8
<b>RI</b>	0,85	0,06	0,84	0,81	0,90	8
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	44,86	19,61	47,74	29,96	59,20	8

Tabla 131. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria subclavia izquierda de los 8 ratones con ondas de resistencia intermedia.

### C.3.4 ARTERIA RENAL DERECHA

#### C.3.4.1 Abordaje ecográfico

Para estudiar la arteria renal derecha se localiza primero la aorta en sección transversa en el abdomen craneal, usando como ventana acústica el parénquima hepático. Se desplaza el transductor caudalmente siguiendo las ramas de la aorta hasta llegar a la arteria renal derecha, que aparece en sección longitudinal dirigiéndose hacia el hilio renal derecho. La arteria renal derecha es más larga que la vena renal derecha y que la arteria renal izquierda, ya que cruza la vena cava caudal para alcanzar el riñón derecho (Fig.24).

## RESULTADOS

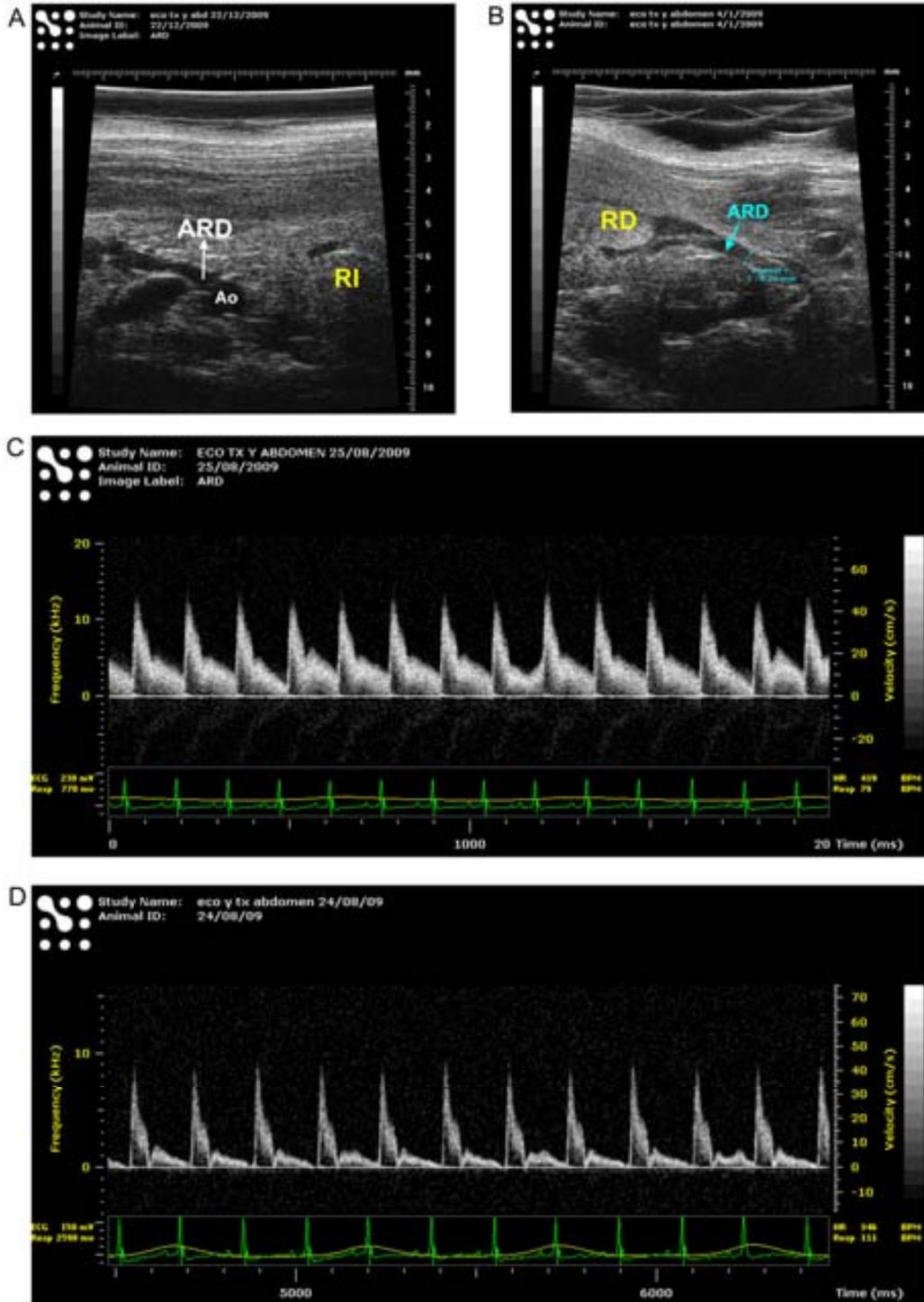


Fig. 24. A. Imagen ecográfica bidimensional del abdomen craneal de un ratón en la que se observa el riñón izquierdo (RI) y la arteria renal derecha (ARD) saliendo de la aorta (Ao). B. Imagen ecográfica transversa del abdomen craneal derecho de otro ratón en la que se observa el riñón derecho (RD) y el hilio renal con la arteria renal derecha. C. Espectro Doppler pulsado de la arteria renal derecha que presenta un perfil de velocidad de flujo parabólico con resistencia baja. D. Espectro Doppler pulsado de la arteria renal derecha de un ratón con perfil de velocidad de flujo y resistencia intermedios.

Una vez obtenida la imagen de la arteria renal derecha en sección longitudinal puede rotarse el transductor 90° para examinar el vaso en sección transversa.

Para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado, el transductor y la plataforma donde descansa el ratón deben ajustarse y orientarse hasta obtener un ángulo de incidencia menor a 60°, evitando al mismo tiempo ejercer presión excesiva sobre el animal. El volumen de muestra del Doppler pulsado se coloca en el eje longitudinal de la arteria renal derecha lo más cerca posible de la salida de la aorta, evitando las interferencias con este vaso.

### C.3.4.2 Descripción de los resultados obtenidos

#### C.3.4.2.1 Ecografía bidimensional

La arteria renal derecha se examinó en los 27 animales del estudio. No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de ellos.

#### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la arteria renal derecha pudo medirse en todos los machos estudiados (10/10) y en todas las hembras excepto una (16/17). El valor medio del diámetro es de  $0,51 \pm 0,12$  mm y el del área de  $0,22 \pm 0,12$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 132, 133 y 134 se muestran los valores del diámetro y del área de este vaso según el sexo del animal.

Arteria renal derecha						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,51	0,12	0,49	0,44	0,55	26
Área (mm <sup>2</sup> )	0,22	0,12	0,19	0,15	0,24	26

Tabla 132. Diámetro y área de la arteria renal derecha en el conjunto de los animales, sin tener en cuenta el sexo.

Arteria renal derecha. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,52	0,18	0,51	0,39	0,54	10
Área (mm <sup>2</sup> )	0,23	0,18	0,21	0,12	0,23	10

Tabla 133. Diámetro y área de la arteria renal derecha en los ratones macho.

## RESULTADOS

Arteria renal derecha. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
Diámetro (mm)	0,50	0,08	0,49	0,45	0,55	16
Área (mm <sup>2</sup> )	0,20	0,06	0,19	0,16	0,24	16

Tabla 134. Diámetro y área de la arteria renal derecha en los ratones hembra.

No se observaron diferencias significativas ni en el diámetro ni en el área de la arteria renal derecha debidas al sexo (diámetro  $P=0,112$ ; área  $P=0,110$ ) o al peso del animal (diámetro  $P=0,075$ ; área  $P=0,082$ ).

### C.3.4.2.2 Ecografía Doppler pulsado

Los registros Doppler se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a 60° en el 81,50% de los casos (100,00% en machos y 70,60% en hembras).

#### Descripción de la onda Doppler pulsado de la arteria renal derecha

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los animales.

El 85,20% (23/27) de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo parabólico y el 14,80% (4/27) restante de tipo intermedio. Lo mismo ocurre con la resistencia vascular: un 85,20% de los animales presentó un flujo de resistencia baja y el 14,80% restante un flujo de resistencia intermedia.

En la Tabla 135 se muestran estos datos y su distribución en cada sexo.

Aorta renal derecha		Total		Macho		Hembra	
		N	N%	N	N%	N	N%
Flujo	Parabólico	23	85,20%	10	100,00%	13	76,50%
	Intermedio	4	14,80%	0	0,00%	4	23,50%
Ondas	Resistencia baja	23	85,20%	10	100,00%	13	76,50%
	Resistencia intermedia	4	14,80%	0	0,00%	4	23,50%

Tabla 135. Características del espectro Doppler de la arteria renal derecha.

Según cómo se posicionan el transductor y la plataforma donde se encuentra el ratón, el espectro Doppler queda por encima o por debajo de la línea base dependiendo de si la sangre se dirige hacia el transductor o no respectivamente (Fig. 24).

## RESULTADOS

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler pulsado en la arteria renal derecha se obtuvo teniendo los animales una frecuencia cardíaca de  $428,22 \pm 49,45$  latidos por minuto.

Los datos que se muestran en las Tablas 136, 137 y 138 corresponden al total de los animales, sin considerar si presentan flujos de resistencia baja o intermedia.

Arteria renal derecha						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	428,22	49,45	433,67	391,00	468,00	27
PSV (mm/s)	552,38	255,64	492,01	333,71	711,71	27
MDV (mm/s)	115,49	79,36	97,32	60,66	120,52	27
TAMX (mm/s)	331,79	148,32	299,47	212,55	447,95	27
a (mm/s <sup>2</sup> )	44541,73	38038,82	31496,20	23091,45	52131,32	27
t (ms)	11,48	3,30	10,83	9,17	14,17	27
PI	1,31	0,30	1,29	1,06	1,54	27
RI	0,78	0,11	0,79	0,70	0,86	27
F (mm <sup>3</sup> /s)	68,57	44,95	58,12	37,27	79,28	26

Tabla 136. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria renal derecha de todos los ratones, sin diferenciar su sexo.

Arteria renal derecha. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	415,47	53,03	426,83	354,67	447,33	10
PSV (mm/s)	606,14	274,20	538,49	445,25	675,59	10
MDV (mm/s)	164,65	79,66	119,17	103,51	222,00	10
TAMX (mm/s)	377,64	164,19	326,65	298,04	455,96	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	54365,07	51899,67	33911,26	24116,29	52131,32	10
t (ms)	10,08	3,46	9,58	7,50	11,67	10
PI	1,16	0,21	1,22	1,06	1,29	10
RI	0,72	0,09	0,76	0,70	0,78	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	82,94	58,57	76,41	52,31	82,45	10

Tabla 137. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la arteria renal derecha de los ratones macho.

## RESULTADOS

<b>Arteria renal derecha. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>HR (bpm)</b>	435,73	47,22	433,67	416,33	471,00	17
<b>PSV (mm/s)</b>	520,76	247,06	410,55	312,96	711,71	17
<b>MDV (mm/s)</b>	86,56	65,32	74,87	52,93	99,25	17
<b>TAMX (mm/s)</b>	304,82	136,01	235,07	198,55	403,80	17
<b>a (mm/s<sup>2</sup>)</b>	38763,30	27209,77	30768,83	15496,49	49961,98	17
<b>t (ms)</b>	12,30	3,00	12,50	10,00	15,00	17
<b>PI</b>	1,39	0,32	1,44	1,15	1,56	17
<b>RI</b>	0,81	0,11	0,82	0,76	0,87	17
<b>F (mm<sup>3</sup>/s)</b>	59,59	32,95	49,60	35,00	76,47	16

Tabla 138. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler en la arteria renal derecha de los ratones hembra.

La velocidad diastólica mínima fue significativamente menor en las hembras que en los machos ( $P=0,031$ ). Sin embargo, no se observa un efecto directo del peso de los animales en esta variable ( $P=0,427$ ) (Tabla 139).

<b>Sexo</b>	<b>MDV (mm/s)</b>		
	<b>Media</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Macho</b>	193,96	108,99	278,93
<b>Hembra</b>	69,32	30,28	108,37

Tabla 139. Velocidad diastólica mínima de la ARD, obtenida mediante análisis inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que las hembras tuvieran una MDV menor que los machos.

Tanto el género del animal como el peso tienen influencia estadísticamente significativa en el índice de pulsatilidad (sexo  $P=0,001$ ; peso  $P=0,018$ ) y en el índice de resistencia (sexo  $P=0,000$ ; peso  $P=0,005$ ) de la arteria renal. En una población sometida a las mismas circunstancias, se esperaría que las hembras tuvieran un PI y un RI mayor que los machos en la arteria renal derecha (Tablas 140 y 141).

En el resto de parámetros hemodinámicos no se observaron diferencias según el género o el peso del ratón.

<b>Sexo</b>	<b>PI</b>		
	<b>Media</b>	<b>Intervalo de confianza 95%</b>	
		<b>Inferior</b>	<b>Superior</b>
<b>Macho</b>	0,86	0,59	1,12
<b>Hembra</b>	1,57	1,36	1,78

Tabla 140. Índice de pulsatilidad de la ARD, obtenida mediante análisis inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que las hembras tuvieran un PI mayor que los machos en la ARD.

Sexo	Media	RI	
		Intervalo de confianza 95% Inferior	Superior
Macho	0,58	0,46	0,69
Hembra	0,90	0,82	0,97

Tabla 141. Índice de resistencia de la ARD, obtenida mediante análisis inferencial a partir de los datos del estudio. En una población sometida a las mismas circunstancias se esperaría que las hembras tuvieran un RI mayor que los machos en la ARD.

### C.3.5 ARTERIA FEMORAL IZQUIERDA

#### C.3.5.1 Abordaje ecográfico

La arteria femoral es un vaso de calibre pequeño que puede observarse directamente por transparencia en la cara medial del muslo. Una vez rasurado el pelo se evidencia claramente el recorrido de la arteria y de la vena femoral. Por este motivo se coloca una cantidad abundante de gel de ecografía sobre la superficie cutánea y se alinea el transductor con el vaso, evitando ejercer presión para no colapsarlo.

Debido a la dimensión de la arteria femoral, el estudio bidimensional se efectúa en sección longitudinal, no transversa (Fig. 25).

Para realizar medidas con ecografía Doppler pulsado, el transductor y la plataforma donde descansa el ratón deben ajustarse y orientarse hasta obtener un ángulo de incidencia menor a 60°. Se coloca el volumen de muestra del Doppler pulsado sobre la arteria, evitando la interferencia de la vena femoral.

#### C.3.5.2 Descripción de los resultados obtenidos

##### C.3.5.2.1 Ecografía bidimensional

La arteria femoral izquierda se examinó en los 27 animales del estudio. No se observaron alteraciones vasculares ni perivasculares en ninguno de ellos.

##### Cálculo del diámetro de la luz vascular (D, mm)

El diámetro de la arteria femoral izquierda pudo medirse en 9 de los 10 machos estudiados y en todas las hembras excepto una (16/17) (Fig. 25). El valor medio de su diámetro es de  $0,184 \pm 0,038$  mm y el del área de  $0,028 \pm 0,012$  mm<sup>2</sup> (media  $\pm$  SD). En las Tablas 142, 143 y 144 se muestran los valores del diámetro y el área de este vaso según el sexo del animal

## RESULTADOS

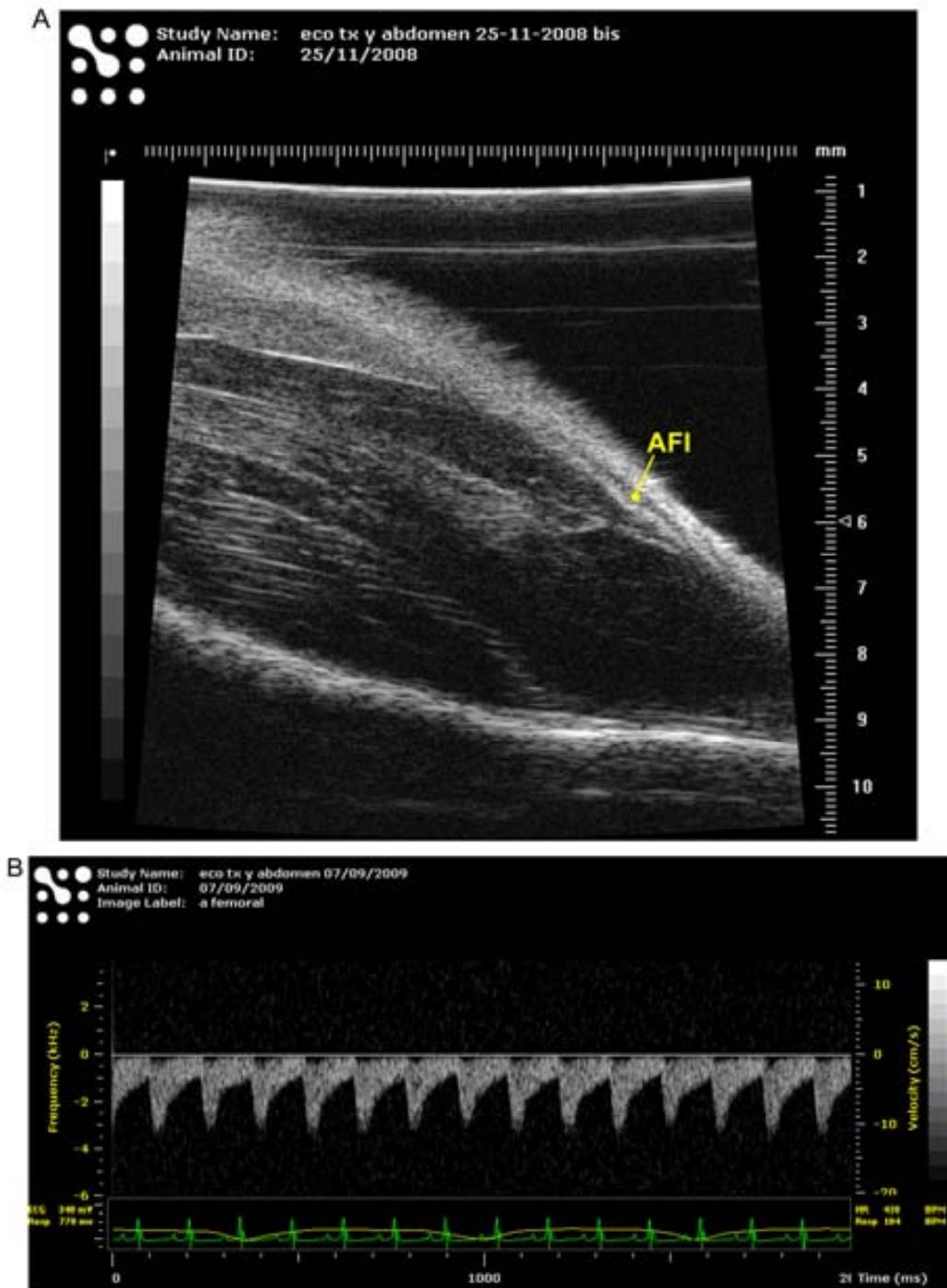


Fig. 25. A. Imagen ecográfica bidimensional de la cara medial del muslo izquierdo en la que se observa la presencia de la arteria femoral izquierda (AFI), en sección longitudinal, en localización subcutánea. B. Espectro Doppler pulsado obtenido en la arteria femoral izquierda de un ratón con frecuencia cardíaca superior a 400 latidos por minuto. El flujo, de tipo parabólico con resistencia baja, se aleja del transductor.

## RESULTADOS

<b>Arteria femoral izquierda</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,184	0,038	0,180	0,160	0,200	25
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,028	0,012	0,025	0,020	0,031	25

Tabla 142. Diámetro y área de la arteria femoral izquierda en el conjunto de los animales, sin considerar las diferencias de género.

<b>Arteria femoral izquierda. Macho</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,172	0,029	0,170	0,145	0,200	9
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,024	0,008	0,023	0,017	0,031	9

Tabla 143. Diámetro y área de la arteria femoral izquierda en los machos.

<b>Arteria femoral izquierda. Hembra</b>						
	<b>Media</b>	<b>SD</b>	<b>Mediana</b>	<b>Percentil 25</b>	<b>Percentil 75</b>	<b>N</b>
<b>Diámetro (mm)</b>	0,192	0,041	0,180	0,163	0,225	16
<b>Área (mm<sup>2</sup>)</b>	0,030	0,014	0,025	0,021	0,040	16

Tabla 144. Diámetro y área de la arteria femoral izquierda en las hembras.

No se observaron diferencias significativas en el diámetro y en el área de la arteria femoral izquierda debidas al sexo o al peso del animal (diámetro  $P=0,183$ ; área  $P=0,194$ ).

### **C.3.5.2.2 Ecografía Doppler pulsado**

Los registros Doppler se obtuvieron con ángulos de incidencia menores a  $60^\circ$  en el 100,00% de los casos.

#### **Descripción de la onda Doppler pulsado de la arteria femoral izquierda**

Se obtuvieron registros Doppler pulsado en todos los animales.

En todos los casos se observó un flujo parabólico de resistencia baja en la arteria femoral.

Según cómo se posicionan el transductor y la plataforma donde se encuentra el ratón, el espectro Doppler queda por encima o por debajo de la línea base dependiendo de si la sangre se dirige hacia el transductor o no respectivamente (Fig. 25).

## RESULTADOS

### Mediciones con Doppler pulsado

El registro Doppler pulsado de la arteria femoral izquierda se obtuvo teniendo los animales una frecuencia cardiaca de  $451,59 \pm 55,14$  latidos por minuto (media  $\pm$  SD).

En las Tablas 145, 146 y 147 se muestran los resultados obtenidos.

Arteria femoral izquierda						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	451,59	55,13	442,67	414,33	505,00	27
PSV (mm/s)	89,89	28,53	85,51	75,71	110,03	27
MDV (mm/s)	37,27	12,68	37,96	29,80	47,79	27
TAMX (mm/s)	63,99	20,27	59,99	51,66	81,56	27
a (mm/s <sup>2</sup> )	2101,45	988,32	1951,52	1436,37	2581,15	27
t (ms)	26,95	7,40	29,17	20,83	31,67	27
PI	0,82	0,14	0,80	0,72	0,87	27
RI	0,58	0,07	0,56	0,52	0,60	27
F (mm <sup>3</sup> /s)	1,83	1,05	1,50	1,25	2,30	25

Tabla 145 Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria femoral izquierda de todos los ratones, sin tener en cuenta el sexo del animal.

Arteria femoral izquierda. Macho						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	453,10	46,66	435,67	420,00	497,67	10
PSV (mm/s)	94,24	35,62	95,33	74,35	120,55	10
MDV (mm/s)	38,76	14,42	36,80	30,31	47,79	10
TAMX (mm/s)	65,84	24,81	66,90	51,46	88,83	10
a (mm/s <sup>2</sup> )	2457,04	1154,07	2149,31	1943,72	3130,69	10
t (ms)	25,95	9,47	27,67	17,50	30,83	10
PI	0,83	0,14	0,82	0,75	0,85	10
RI	0,58	0,07	0,57	0,55	0,59	10
F (mm <sup>3</sup> /s)	1,65	0,90	1,67	0,93	2,30	9

Tabla 146. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria femoral izquierda de los ratones macho.

Arteria femoral izquierda. Hembra						
	Media	SD	Mediana	Percentil 25	Percentil 75	N
HR (bpm)	450,71	60,93	447,33	391,67	505,00	17
PSV (mm/s)	87,33	24,29	85,12	78,90	99,04	17
MDV (mm/s)	36,39	11,92	37,96	29,80	44,59	17
TAMX (mm/s)	62,89	17,82	59,97	56,18	72,18	17
a (mm/s <sup>2</sup> )	1892,28	844,13	1877,98	1366,04	2215,28	17
t (ms)	27,55	6,12	29,17	24,17	31,67	17
PI	0,81	0,14	0,79	0,72	0,87	17
RI	0,58	0,08	0,56	0,52	0,61	17
F (mm <sup>3</sup> /s)	1,93	1,14	1,42	1,26	2,60	16

Tabla 147. Datos hemodinámicos obtenidos mediante ecografía Doppler pulsado en la arteria femoral izquierda de los ratones hembra.

No se observaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna de las variables hemodinámicas de la arteria femoral izquierda debidas al sexo o al peso de los animales.

Después de la eutanasia de cada ratón se realizó de forma inmediata su disección. El corazón, la aorta y sus ramas, las arterias renales y la arteria femoral izquierda se observaron y disecaron con microscopio estereoscópico. No se observaron lesiones vasculares ni perivasculares en ninguno de los animales estudiados ecográficamente.

Después de la fijación y de la toma y procesado de las muestras, se realizó el estudio morfológico de las arterias seleccionadas.

## **C.4 ANÁLISIS DE LA ESTRUCTURA DE LAS PAREDES ARTERIALES**

En este apartado se estudió la estructura de la pared de las arterias, analizadas previamente con ecografía, mediante diferentes técnicas histológicas e inmunohistoquímicas. En el caso de la aorta descendente abdominal prerrenal y postrenal se incluyeron muestras de ratones que mostraron resistencia alta e intermedia, y se compararon entre sí para evaluar posibles diferencias morfológicas entre ambos grupos.

### **C.4.1 TAMAÑO RELATIVO DE LAS ARTERIAS**

La Figura 26 muestra el tamaño relativo de las arterias aorta descendente abdominal -a nivel prerrenal, postrenal y preiliaco- y de la arteria femoral. Como puede observarse, el tamaño de la aorta disminuye caudalmente y es superior en conjunto al de la arteria femoral.

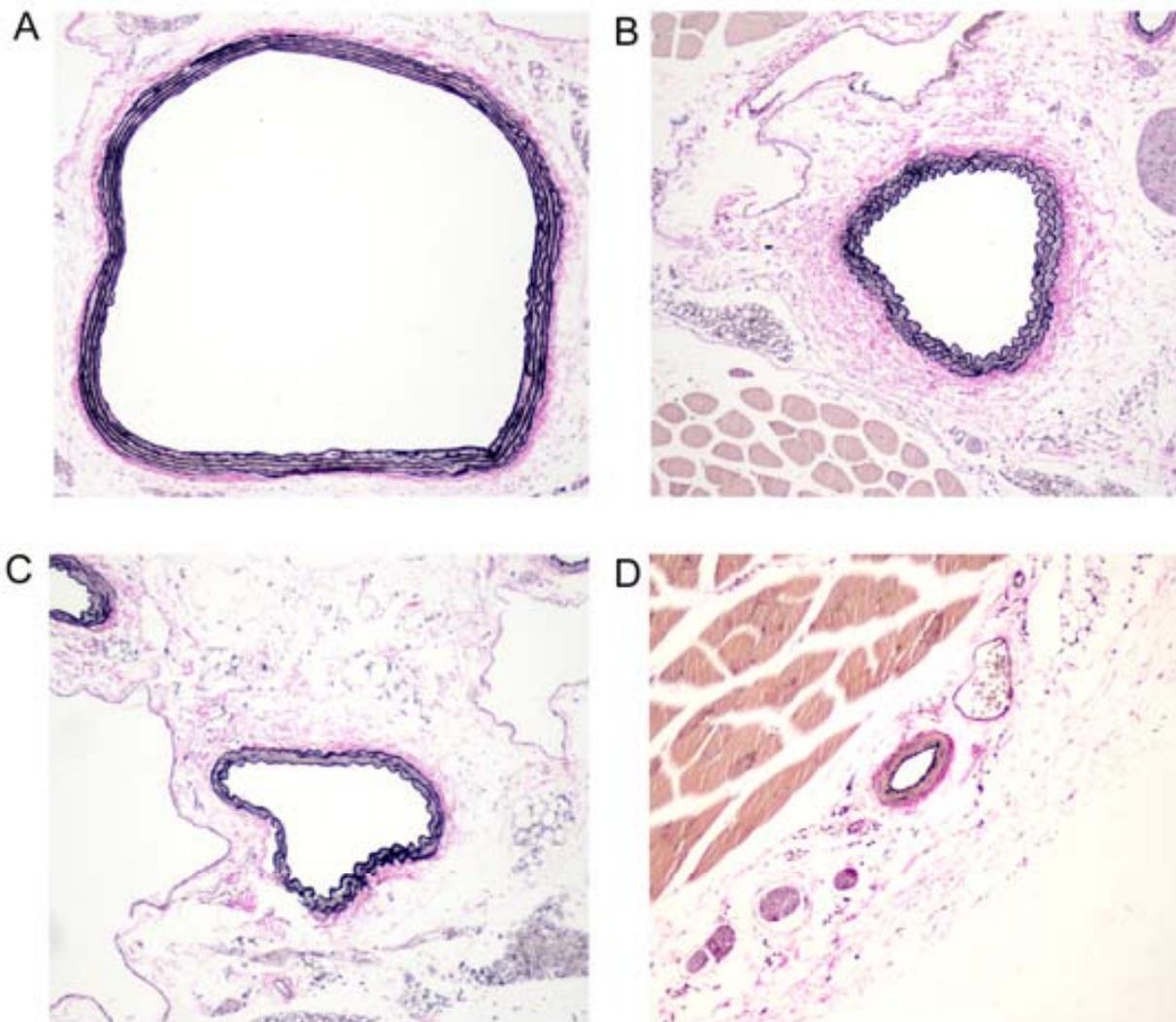


Fig. 26. Tamaño relativo de las arterias analizadas. A. Aorta descendente abdominal prerrenal. B. Aorta descendente abdominal postrenal. C. Aorta descendente abdominal preiliaca. D. A. femoral. Tinción de Verhoeff para fibras elásticas, 100X.

#### **C.4.2 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PRERRENAL**

Las células endoteliales de la túnica íntima no hacen prominencia hacia la luz del vaso (Fig. 27).

## RESULTADOS

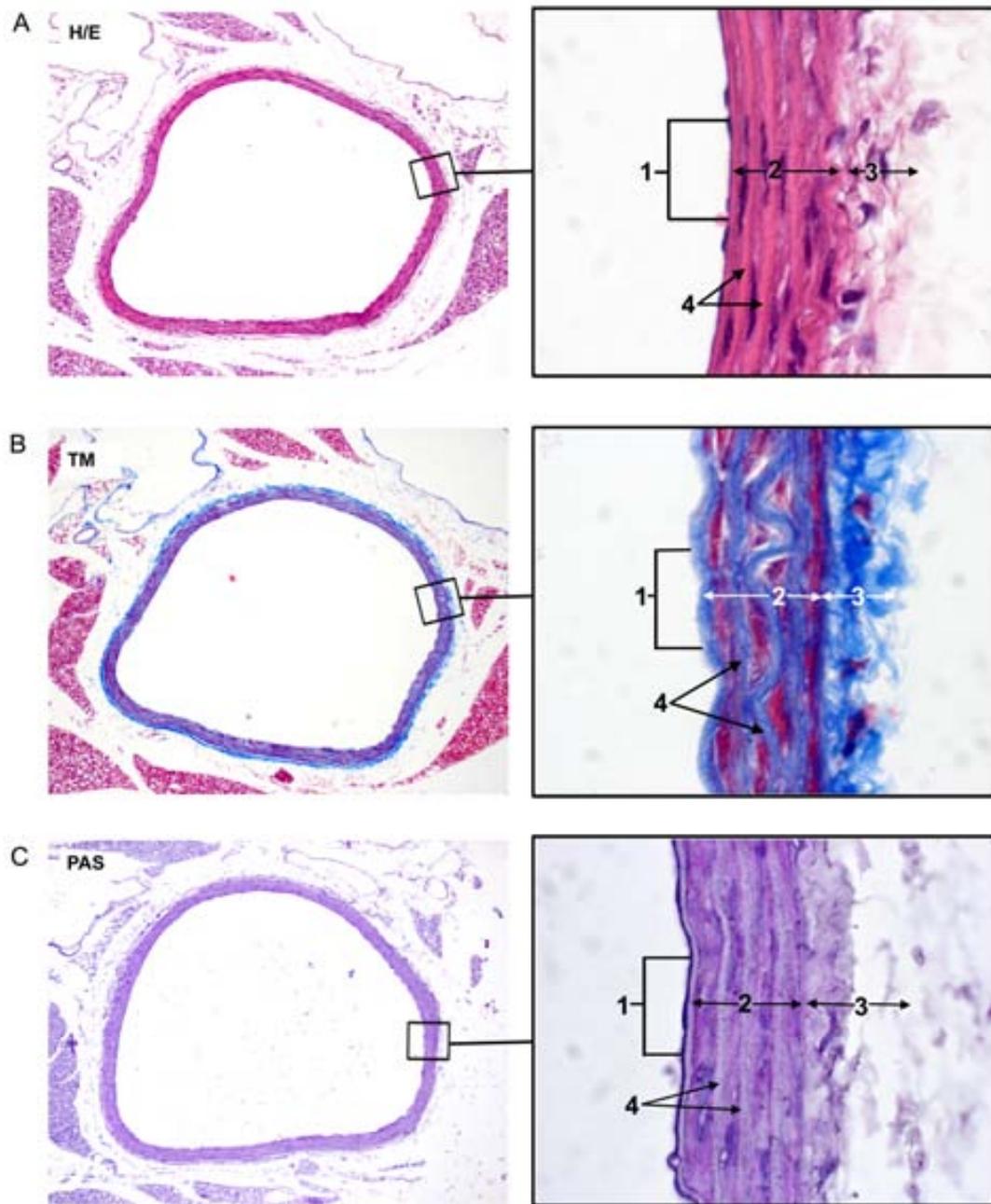


Fig. 27. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal prerrenal. A. Hematoxilina/Eosina. B. Tricrómico de Masson. C. Tinción de PAS. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas. 100X.

## RESULTADOS

La túnica media es la mayor de las tres túnicas y suele presentar cinco unidades lamelares. La capa elástica más interna no suele estar contraída. La elastina que forma estas capas es de naturaleza eosinófila en la tinción de Hematoxilina/Eosina; de color azul en el Tricrómico de Masson, lo que demuestra su carácter conjuntivo; y PAS negativa, indicando que no contiene glucosaminoglicanos. La tinción específica de Verhoeff tiñe las fibras elásticas de negro.

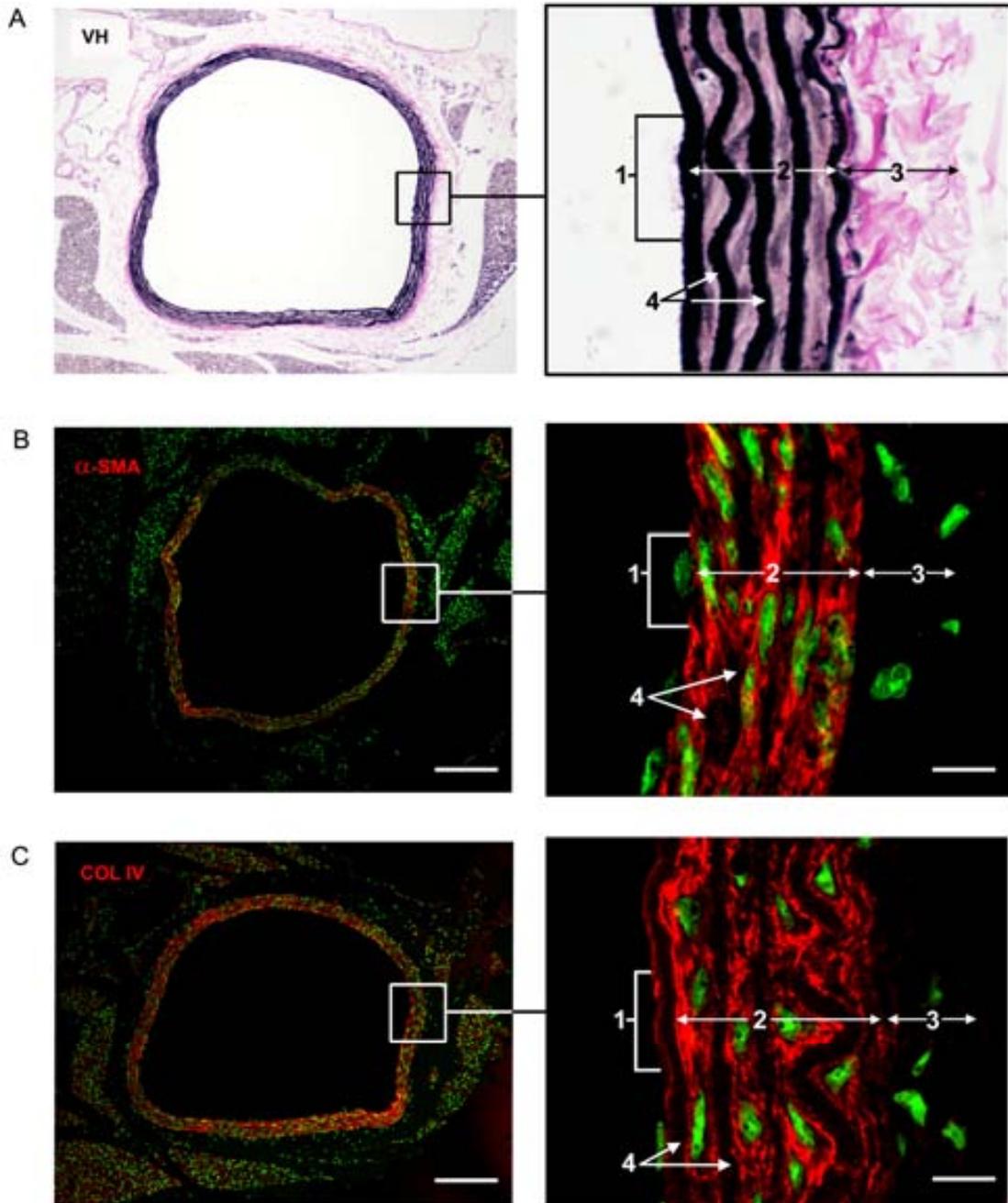


Fig. 28. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal prerrenal. A. Tinción de Verhoeff. B. Localización de la  $\alpha$ -SMA. C. Localización del colágeno IV. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas. A, 100X. Barras: 165  $\mu$ m.

Las células musculares lisas, marcadas con el anticuerpo Anti- $\alpha$ -SMA, se localizan únicamente en la túnica media (Fig. 28). El colágeno IV, que es muy abundante, se observa en la membrana basal de las células endoteliales y de las células musculares lisas. No está presente en las fibras elásticas (Fig. 28).

No se observaron diferencias morfológicas entre los ratones que presentaron un flujo de resistencia alta respecto a los de flujo intermedio.

#### **C.4.3 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL POSTRENAL**

Las células endoteliales de la túnica íntima hacen prominencia hacia la luz del vaso (Fig. 29). La túnica media suele presentar cuatro unidades lamelares.

La fibra elástica más interna suele estar contraída. Las características de tinción de las fibras elásticas son las mismas que las observadas en la porción prerrenal. Las células musculares lisas, marcadas con el anticuerpo Anti- $\alpha$ -SMA, sólo se sitúan en la túnica media (Fig. 30B). El colágeno IV tiene la misma localización que en la porción prerrenal (Fig. 30C), siendo menor su concentración a nivel de las membranas basales. La túnica adventicia, de marcado carácter conjuntivo, es de mayor tamaño, más del doble, que la existente en la porción prerrenal.

No se observaron diferencias morfológicas entre los ratones que presentaron un flujo de resistencia alta respecto a los de flujo intermedio.

## RESULTADOS

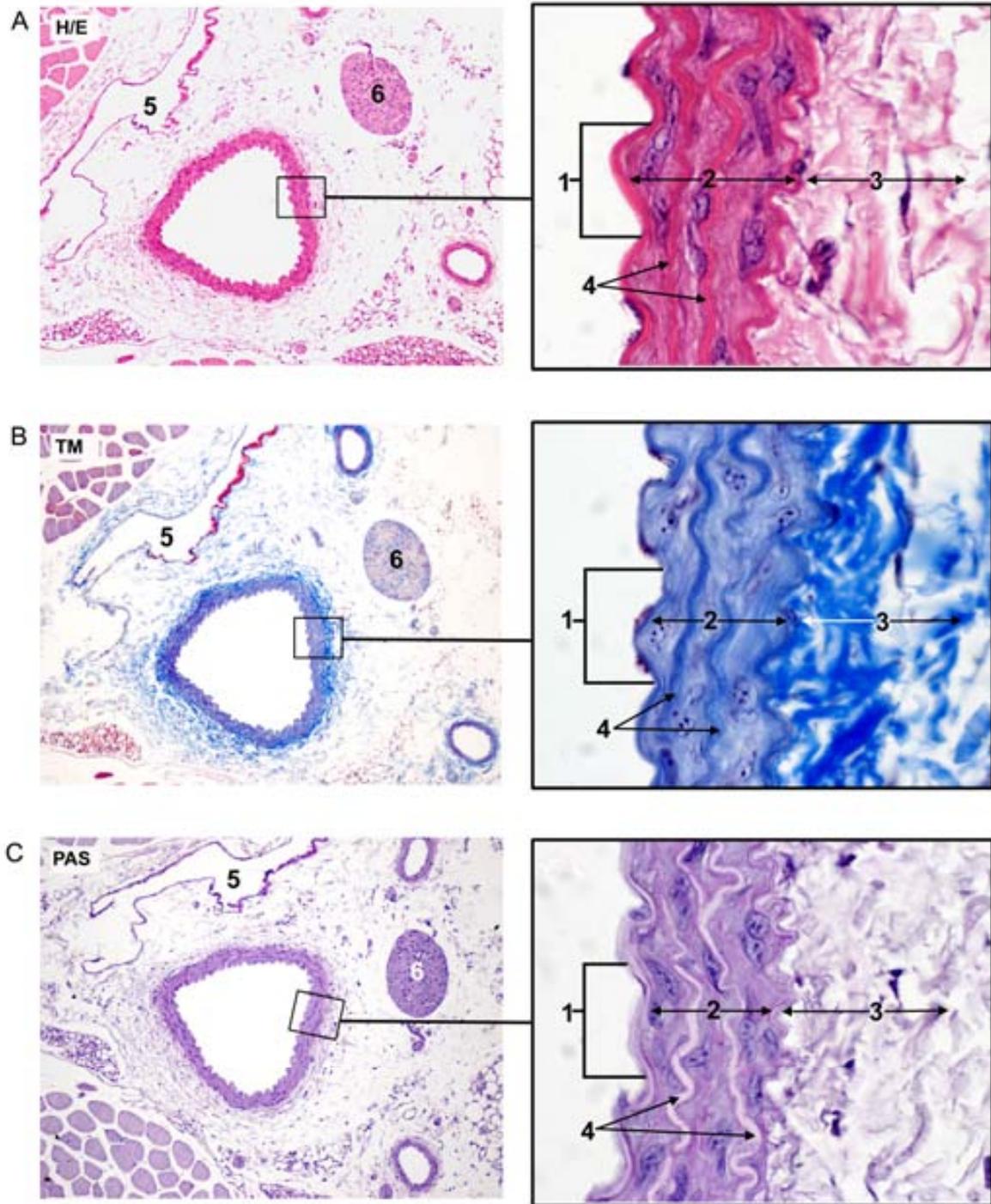


Fig. 29. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal postrenal. A. Hematoxilina/Eosina. B. Tricrómico de Masson. C. Tinción de PAS. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas; 5: v. cava caudal; 6: ganglio nervioso del plexo aórtico abdominal. 100X.

RESULTADOS

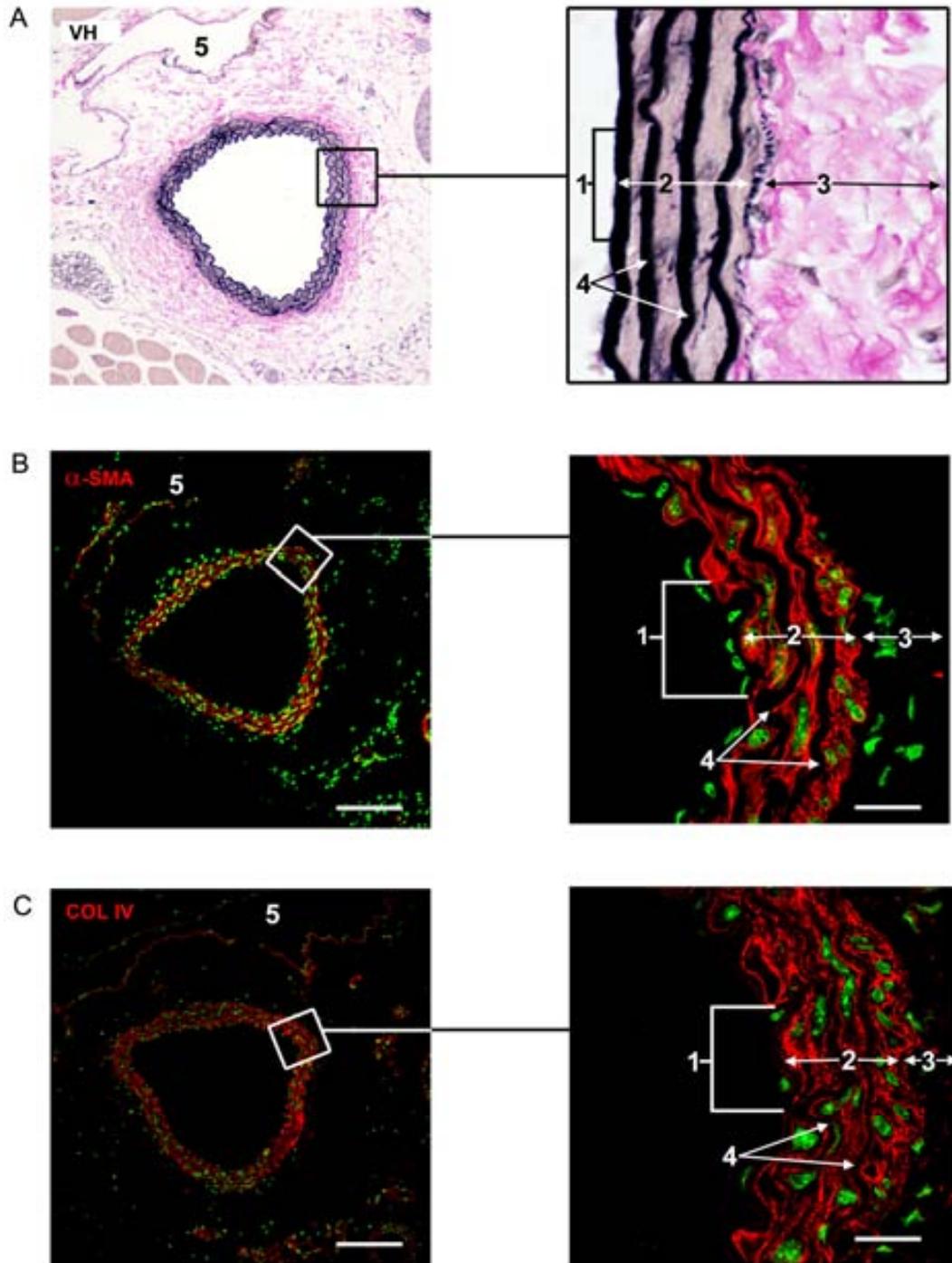


Fig. 30. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal postrenal. A. Tinción de Verhoeff. B. Localización de la  $\alpha$ -SMA. C. Localización del colágeno IV. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas. 5: v. cava caudal. A: 100X. Barras: 126  $\mu$ m.

### C.4.4 ESTRUCTURA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL PREILIACA

La túnica media suele presentar tres unidades lamelares. La fibra elástica más interna suele estar contraída (Fig. 31).

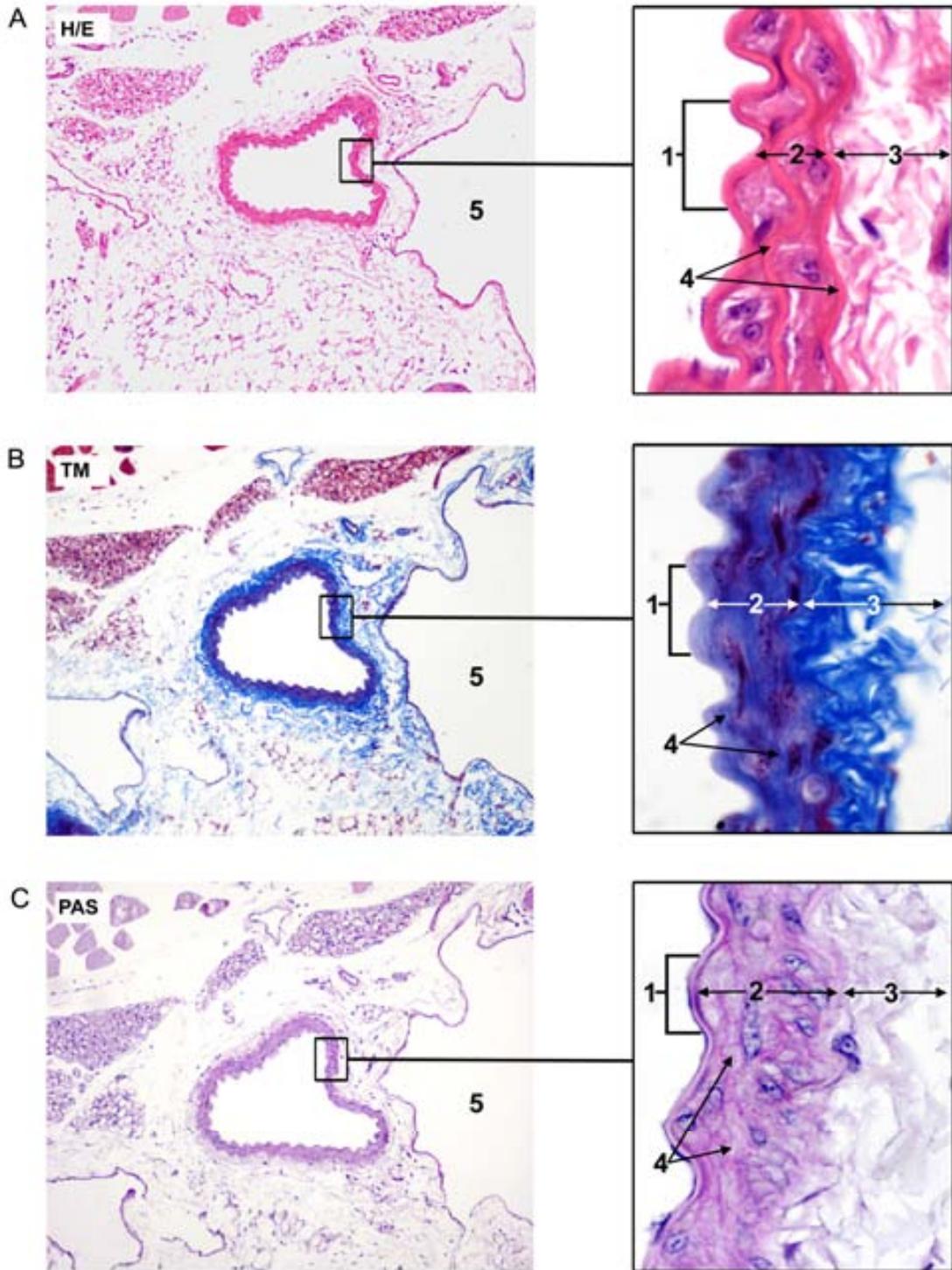


Fig. 31. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal preiliaca. A. Hematoxilina/Eosina. B. Tricrómico de Masson. C. Tinción de PAS. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas; 5: v. cava caudal. 100X.

## RESULTADOS

Las características de tinción de las fibras elásticas son las mismas que las observadas en las porciones prerrenal y postrenal. Las células musculares lisas, marcadas con el anticuerpo Anti- $\alpha$ -SMA, sólo se sitúan en la túnica media (Fig. 32B).

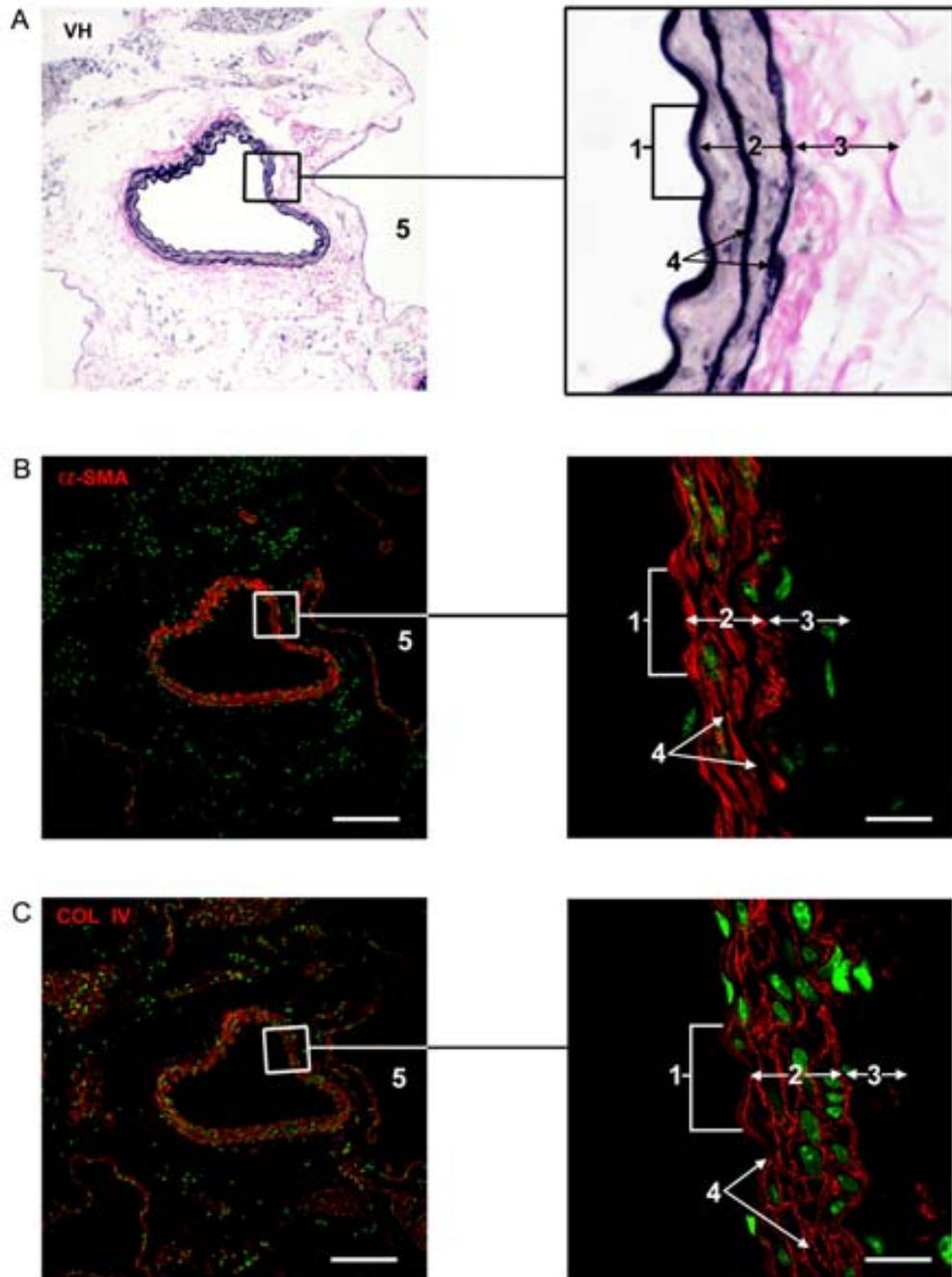


Fig. 32. Estructura de la pared de la aorta descendente abdominal preiliaca. A. Tinción de Verhoeff. B. Localización de la  $\alpha$ -SMA. C. Localización del colágeno IV. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: fibras elásticas; 5: v. cava caudal. A, 100X. Barras: 134  $\mu$ m.

El colágeno IV tiene la misma localización que en la porción postrenal, siendo menor su concentración (Fig. 32C). La túnica adventicia es de menor tamaño que en la porción postrenal. Las células endoteliales de la túnica íntima también hacen prominencia hacia la luz del vaso.

#### **C.4.5. ESTRUCTURA DE LA ARTERIA FEMORAL**

La túnica media sólo presenta dos capas de fibras elásticas: la lámina elástica interna, que es la de mayor tamaño y que suele estar contraída; y la lámina elástica externa, con muy poca cantidad de elastina (Fig.33).

Entre ambas se sitúa una capa muscular gruesa, marcada con el anticuerpo Anti- $\alpha$ -SMA (Fig. 34B). Las características de tinción de las capas elásticas son las mismas que las observadas en las fibras elásticas de la aorta. El colágeno IV tapiza la cara abluminal de las células endoteliales y rodea las fibras musculares lisas (Fig. 34C).

RESULTADOS

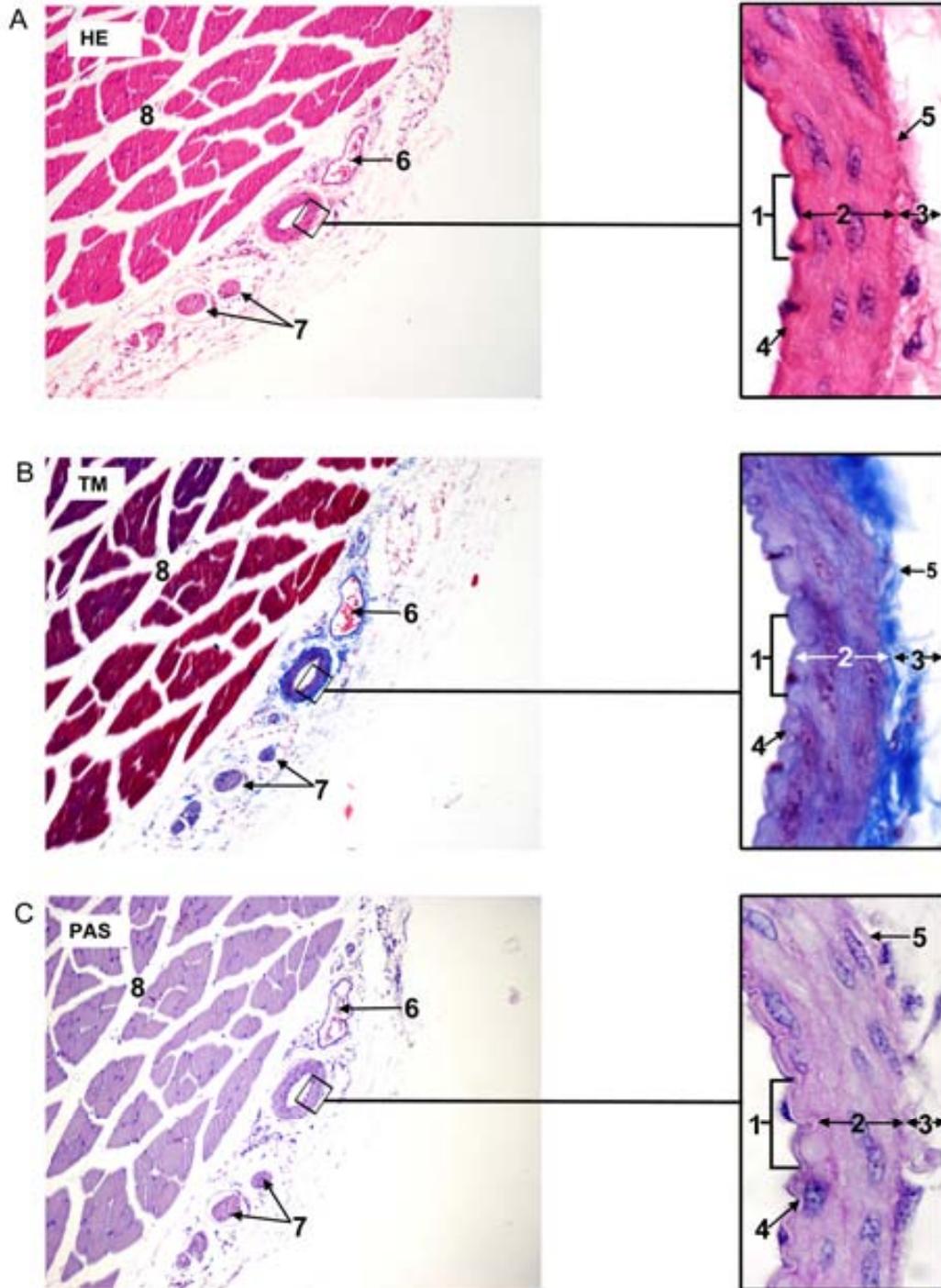


Fig. 33. Estructura de la pared de la arteria femoral. A. Hematoxilina/Eosina. B. Tricrómico de Masson. C. Tinción de PAS. 1: túnica íntima; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: lámina elástica interna; 5: lámina elástica externa; 6: v. femoral; 7: ramas nervio safeno; 8: m. recto femoral. 100X.

RESULTADOS

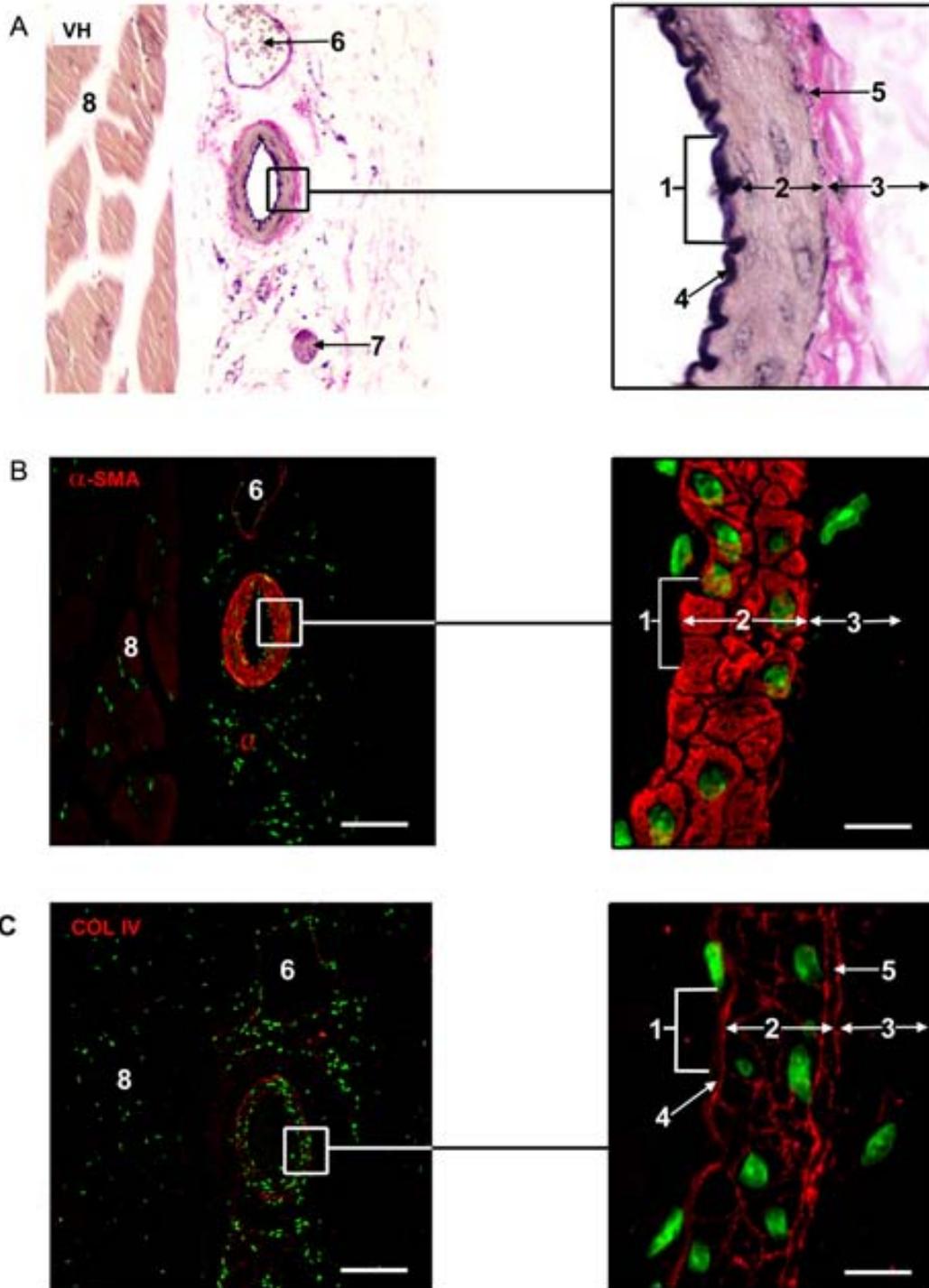


Fig. 34. Estructura de la pared de la arteria femoral. A. Tinción de Verhoeff. B. Localización de la  $\alpha$ -SMA. C. Localización del colágeno IV. 1: túnica interna; 2: túnica media; 3: túnica adventicia; 4: lámina elástica interna; 5: lámina elástica externa; 6: v. femoral; 7: n. safeno; 8: m. recto femoral. A, 100X; Barras: 96  $\mu$ m.

## C.5 ANÁLISIS MORFOLÓGICO DE LOS CORAZONES DE LOS RATONES DEFICIENTES PARA *Sirt1*

### C.5.1 MORFOLOGÍA EXTERNA Y ESTRUCTURA INTERNA

Los ratones heterocigotos deficientes para *Sirt1* tenían un peso similar a sus hermanos de camada silvestres (Tabla 1) y un corazón de mayor tamaño (Fig. 35).

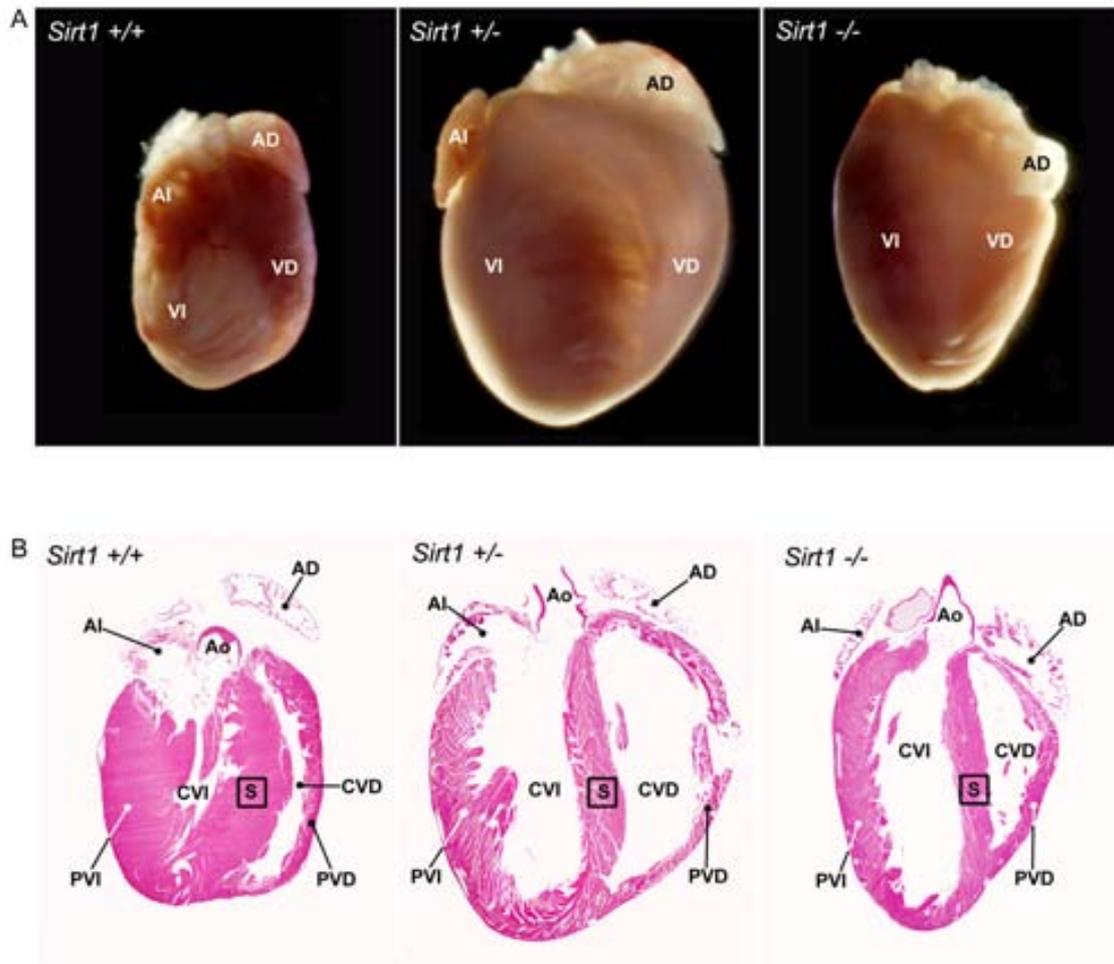


Fig. 35. Morfología externa y estructura interna de los corazones de los ratones mutantes *Sirt1*. Nótese la cardiomegalia y el adelgazamiento de la pared de los ventrículos y del septo de los ratones homocigotos y heterocigotos adultos para *Sirt1*. A. Corazones adultos aislados. B. Secciones histológicas teñidas con Hematoxilina/Eosina que pasan por las cuatro cavidades del corazón adulto. AD: atrio derecho; AI: atrio izquierdo; CVD: cavidad del ventrículo derecho; CVI: cavidad del ventrículo izquierdo; PVD: pared del ventrículo derecho; PVI: pared del ventrículo izquierdo; S: septo interventricular; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

## RESULTADOS

El corazón de los ratones homocigotos deficientes tenía un tamaño menor que el de los heterocigotos, aunque también ligeramente superior al de sus hermanos silvestres (Fig. 35). Los ratones homocigotos deficientes son siempre de menor tamaño que los silvestres y que los heterocigotos (Tabla 1).



Fig. 36. Secciones transversales del tórax de ratones recién nacidos (P0) que pasan por los ventrículos cardiacos. Me: médula espinal; PuD: pulmón derecho; Pul: pulmón izquierdo; PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo.

Estos datos indican un posible efecto de *Sirt1* sobre el tamaño del corazón, que podría inducir cardiomegalia. No hubo cambios en el tamaño relativo de los componentes cardíacos: el incremento fue similar en el atrio derecho e izquierdo, así como en los ventrículos derecho e izquierdo (Fig. 35).

Dado que *Sirt1* ha sido asociado a un efecto protector sobre la hipertrofia cardíaca (Planavila et al. 2011), se decidió estudiar la estructura de las paredes de los ventrículos. El análisis histológico de los corazones evidenció el adelgazamiento de la pared de los ventrículos derecho e izquierdo, así como del septo interventricular en los ratones *Sirt1* +/- y *Sirt1* -/- (Fig. 35). Por otra parte, las cavidades ventriculares estaban más dilatadas que en los ratones silvestres (Fig. 35). Estos datos sugieren un efecto protector de *Sirt1* sobre la dilatación cardíaca.

Cheng et al.(2003) describen que los ratones deficientes para *Sirt1* presentaban anomalías en la formación del corazón, concretamente malformaciones del septo interatrial y atrioventricular, sugiriendo además que estas malformaciones estarían relacionadas con la muerte temprana observada en estos ratones mutantes. Para conocer si la dilatación cardíaca observada en los corazones adultos de ratones deficientes para *Sirt1* se produce durante el desarrollo embrionario del corazón o si bien es un proceso que se instaura después del nacimiento, se analizaron los corazones de ratones recién nacidos (P0) (Fig. 36). El estudio de las secciones transversales del tórax, a nivel de los ventrículos cardíacos, indicaba que, en el momento del nacimiento, no son evidentes en los ratones mutantes para *Sirt1*, ni la cardiomegalia, ni la dilatación de las cavidades ventriculares con el adelgazamiento de las paredes de los ventrículos (Fig. 36).

### **C.5.2 ANÁLISIS *IN VIVO* DE LA MORFOLOGÍA CARDIACA**

Para confirmar que la dilatación cardíaca observada en los corazones recuperados de los ratones mutantes para *Sirt1* no era un artefacto post mórtem, se decidió realizar el estudio de la morfología cardíaca *in vivo* mediante MRI. Para comparar los tamaños relativos en los corazones, se midió en diástole el grosor de la pared de los ventrículos izquierdo y derecho, así como el grosor del septo, y los diámetros mayores de las cavidades de los ventrículos izquierdo y derecho (Fig. 37). Debido a las diferencias de peso

## RESULTADOS

observadas en los mutantes, los datos obtenidos se expresaron en relación al peso vivo de los animales. Los resultados indican una tendencia a la disminución del grosor de las paredes de los ventrículos y del septo interventricular en los ratones mutantes en comparación con los ratones silvestres, que no fue estadísticamente significativa (Fig. 37).

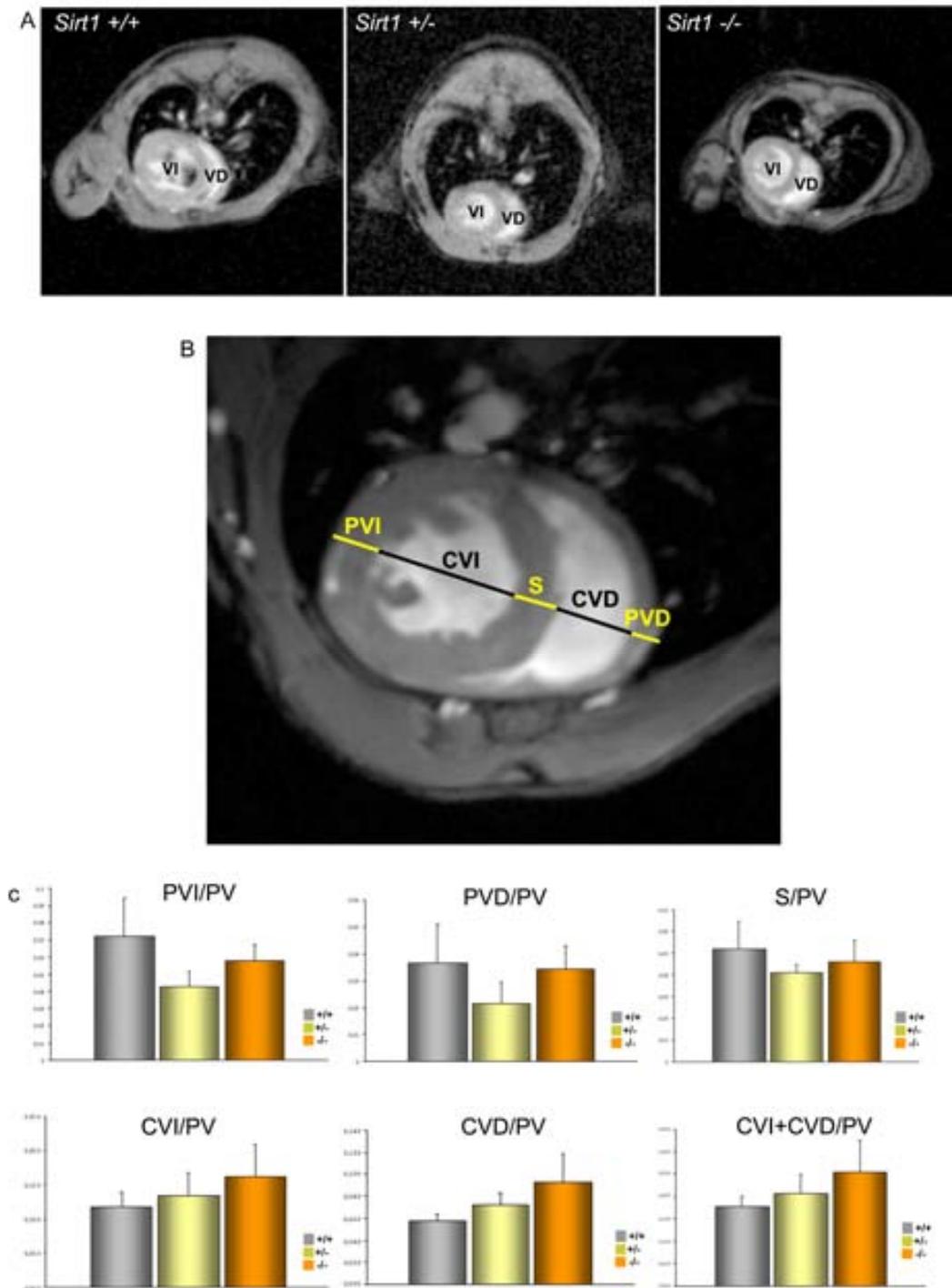


Fig. 37. Análisis mediante MRI de la morfología cardíaca. A. Sección transversa pasando por la zona media de los ventrículos cardíacos (dos cámaras). B. Parámetros medidos en diástole. C. Comparación de los parámetros entre los ratones mutantes (+/-, -/-) y los silvestres (+/+). Las imágenes de MRI fueron adquiridas con una secuencia IntraGate FLASH. CVD: cavidad ventrículo derecho; CVI: cavidad ventrículo izquierdo; PV: peso vivo; S: septo interventricular; VD: ventrículo derecho; VI: ventrículo izquierdo.

Las cavidades de los ratones mutantes tenían también una tendencia a ser de mayor tamaño, aunque, como el caso anterior, las diferencias no fueron estadísticamente significativas (Fig. 37). Cuando comparamos el sumatorio de los diámetros mayores de las cavidades ventriculares, el incremento observado en los ratones homocigotos deficientes fue casi estadísticamente significativo (*Sirt1* +/+ vs *Sirt1* -/-, P=0,0519, n=5).

Al comparar los resultados de la relación h/R, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los ratones mutantes para *Sirt1* y los ratones silvestres (Tabla 148). Estos resultados confirman parcialmente lo observado en los corazones analizados post mórtem.

	<i>Sirt1</i> +/+	<i>Sirt1</i> +/-	<i>Sirt1</i> -/-
<b>h/R ratio (media ± SD)</b>	0,42 ± 0,07	0,20 ± 0,02*	0,21 ± 0,03*

Tabla 148. Resultados obtenidos al comparar la relación h/R entre los tres grupos de animales. Los ratones mutantes para *Sirt1* tienen ratios menores que los ratones silvestres (\*, P<0,05).

Para descartar, que la dilatación de los ventrículos se debiera a una estenosis de las válvulas aórtica y/o pulmonar, se realizó una secuencia de MRI en el plano dorsal, que pasaba por las cuatro cavidades cardiacas (Fig. 38). En las imágenes obtenidas no se observaron cambios compatibles con estenosis aórtica ni pulmonar. Por último, para descartar que la dilatación de los ventrículos pudiera deberse a un proceso de hipertensión pulmonar (Steiner et al. 2009; Stenmark et al. 2009), se analizó el grosor de las arterias del parénquima pulmonar mediante el marcador de las células musculares lisas Anti- $\alpha$ -SMA. No se observó un aumento del grosor de la túnica media de las arterias pulmonares en los ratones mutantes para *Sirt1* (Fig. 38), lo que descartaba la presencia de hipertensión pulmonar en estos animales.

### C.5.3 ANÁLISIS MORFOMÉTRICO DE LOS CARDIOMIOCITOS

Los resultados obtenidos hasta el momento parecen indicar que la deficiencia de SIRT1 produce dilatación cardiaca, definida ésta como una condición patológica caracterizada por cardiomegalia y dilatación ventricular (O'Grady y O'Sullivan 2004; Recchia y Lionetti 2007), a diferencia de los resultados previamente aportados por otros autores en los que se indica que el

déficit de SIRT1 produce hipertrofia cardiaca (Alcendor et al. 2007; Sundaresan et al. 2011; Planavila et al. 2011).

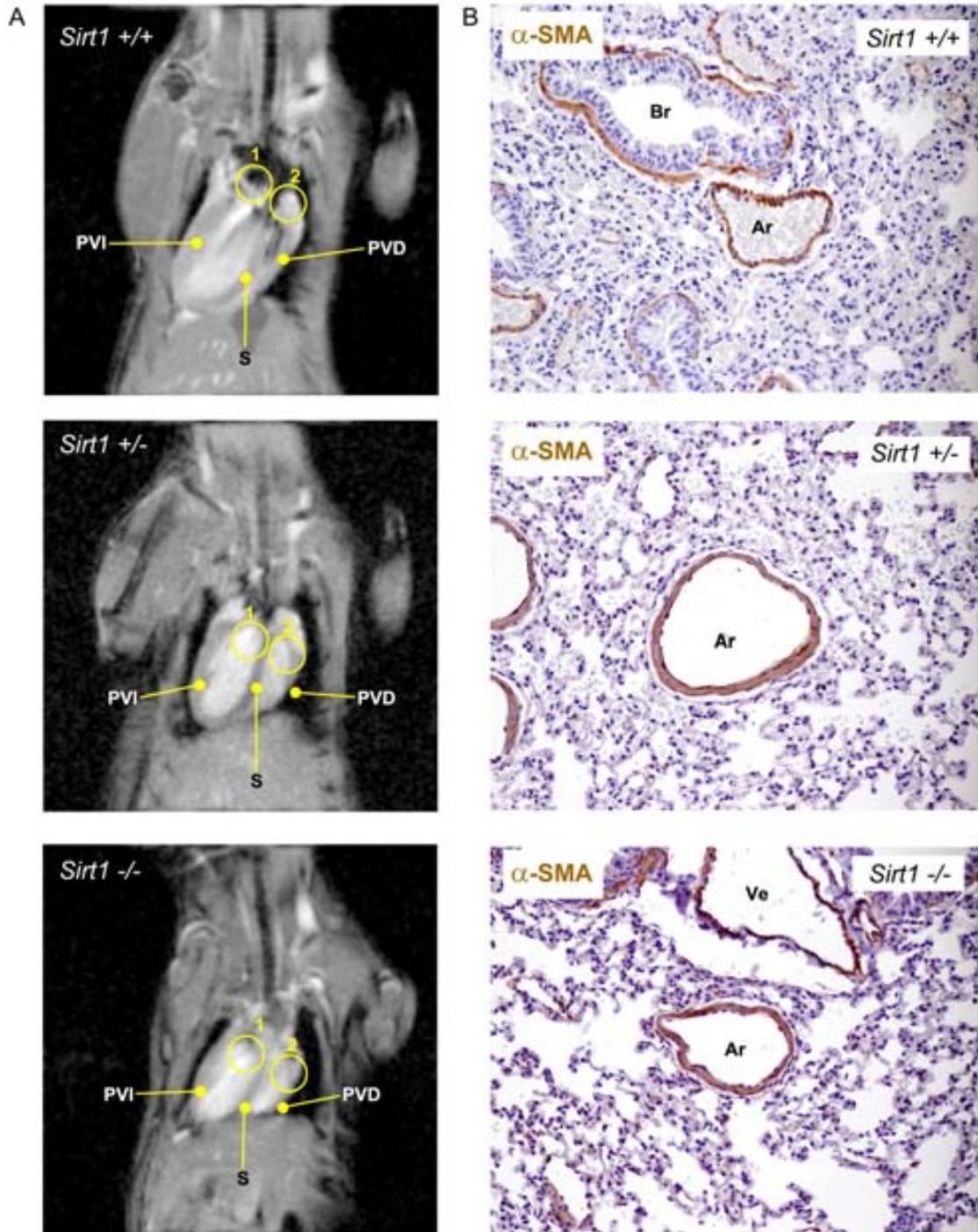


Fig. 38. A. Análisis mediante MRI de las válvulas aórtica y pulmonar. B. Grosor de la túnica media de las arterias pulmonares, mediante visualización de la proteína  $\alpha$ -SMA, 20X. Ar: arteria segmentaria; Br: bronquio segmentario; PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo interventricular; Ve: vena segmentaria. 1: localización válvula aórtica; 2: localización válvula pulmonar.

El tamaño de los cardiomiocitos es uno de los criterios que permite diferenciar entre hipertrofia, en la que existe un incremento de su tamaño, de

dilatación, donde puede producirse un estiramiento de los mismos (Campbell et al. 1991; Nishikawa et al. 2011).

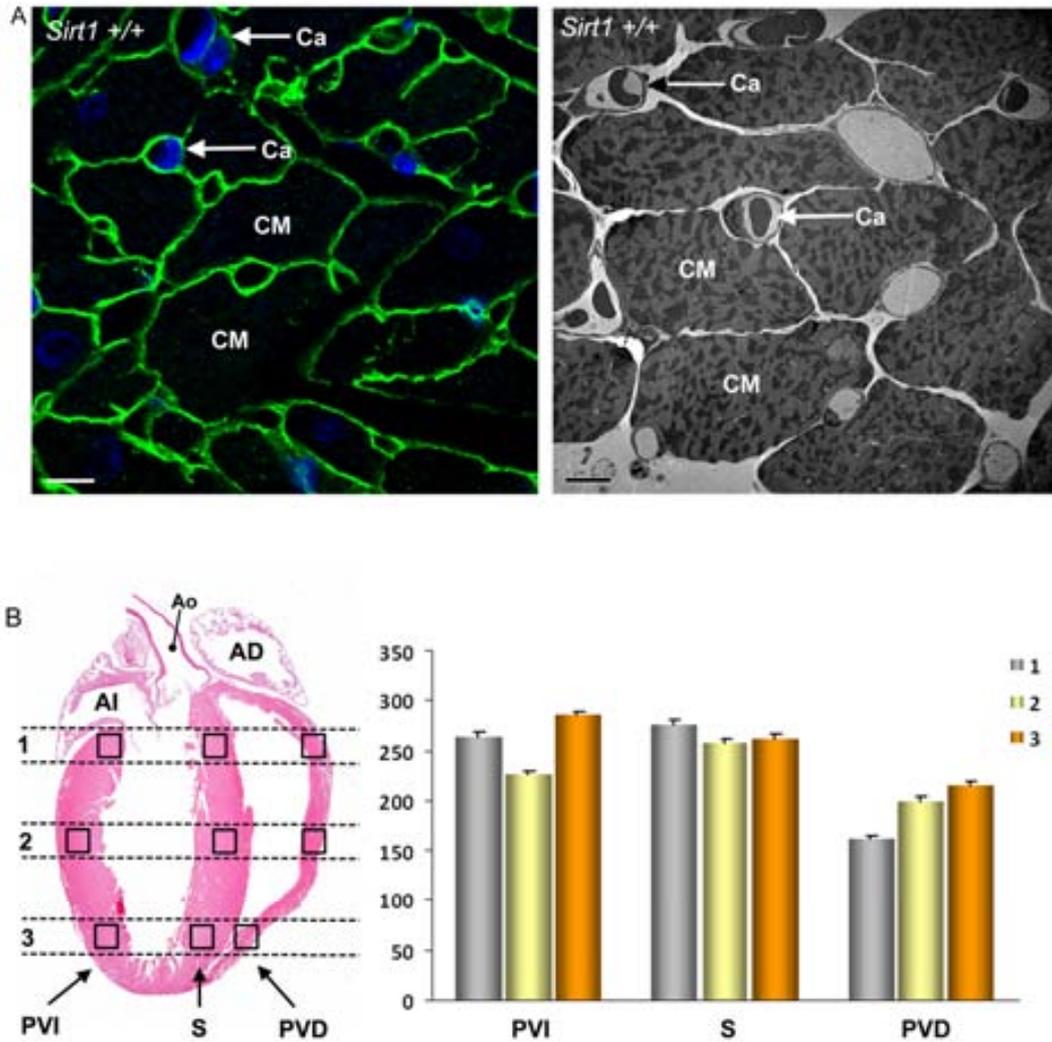


Fig. 39. Análisis morfométrico de los cardiomiocitos en el ratón silvestre. A. Las medidas se realizaron sobre cortes de parafina marcados con el anticuerpo Anti-Laminina que delimita perfectamente los límites de los cardiomiocitos (panel izquierdo). La correlación con una imagen de microscopía electrónica de transmisión de tamaño semejante (panel derecho) confirma la elegibilidad de este método a la hora de analizar morfométricamente los cardiomiocitos. B. Valores de las áreas de los cardiomiocitos en seis localizaciones diferentes del corazón situadas en las paredes de los ventrículos y del septo. 1: zona cercana a la base; 2: zona intermedia; 3: zona cercana al vértice. AD: atrio derecho; AI: atrio izquierdo; Ao: aorta; Ca: capilar; CM: cardiomiocito; PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo interventricular. Barras: 10  $\mu\text{m}$ .

El método estándar para la cuantificación del área de los cardiomiocitos consiste en medir los diámetros de estas células en cortes en parafina teñidos con Hematoxilina/Eosina (Matsumori y Kawai 1982). Este método no permite

## RESULTADOS

delimitar claramente el borde de los cardiomiocitos, por lo que se ha intentado desarrollar un método que permita delimitarlos con mayor precisión, empleando un marcador de la membrana basal. Como se puede observar en la Figura 39, el marcaje inmunohistoquímico con el anticuerpo Anti-Laminina delimita perfectamente el contorno de los cardiomiocitos en cortes histológicos en parafina. Los vasos sanguíneos que se sitúan entre las cardiomiocitos también están delimitados por laminina, pero la presencia de los núcleos de las células endoteliales o eritrocitos en su luz, así como su tamaño, permiten distinguirlos claramente de los cardiomiocitos (Fig. 39). La correlación con cortes similares de microscopía electrónica de transmisión, donde es posible distinguir sin equivocación los cardiomiocitos por la presencia de los sarcómeros, confirma la elegibilidad de este método para delimitar con exactitud los límites de los cardiomiocitos.

	Localización	P-VAL	Intervalo de confianza	Conclusión
	<b>PVI vs S</b>	0,4427	(-29,0396; -8,8102)	No significativo
<b>1</b>	<b>PVI vs PVD</b>	0,0000	(78,3526; 107,4669)	PVI>PVD
	<b>S vs PVD</b>	0,0000	(86,9214; 115,2315)	S>PVD
	<b>PVI vs S</b>	0,0000	(-49,8232; -17,5552)	PVI<S
<b>2</b>	<b>PVI vs PVD</b>	0,0000	(20,2992; 47,6911)	PVI>PVD
	<b>S vs PVD</b>	0,0000	(53,3737; 81,951)	S>PVD
	<b>PVI vs S</b>	0'0009	(13,1768; 51,3377)	PVI>S
<b>3</b>	<b>PVI vs PVD</b>	0,0000	(46,4401; 83,9748)	PVI>PVD
	<b>S vs PVD</b>	0,0000	(17,8161; 48,0942)	S>PVD

Tabla 149. Comparación del área de los cardiomiocitos en 6 localizaciones distintas del corazón de los ratones silvestres. PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo interventricular; 1: localización cercana a la base cardiaca; 2: localización intermedia; 3: localización cercana al vértice cardiaco.

Previamente a realizar el análisis morfométrico del corazón de los ratones mutantes, se decidió valorar el área de los cardiomiocitos en 6 localizaciones diferentes del corazón de los ratones silvestres (Fig. 39). Sorprendentemente, los resultados obtenidos indicaban una gran variación en el área de los cardiomiocitos dependiendo de su localización (Tabla 149 y 150).

Por ejemplo, como se observa en la Tabla 149, los cardiomiocitos cercanos a la base cardiaca tienen un área mayor si se encuentran en la pared del ventrículo izquierdo que en la pared del ventrículo derecho ( $P < 0,01$ ). En la Tabla 150 se muestra como, por ejemplo, en la pared del ventrículo derecho, el

## RESULTADOS

área de los cardiomiocitos es menor en la base que en el vértice del corazón ( $P < 0,01$ ,  $n=8$ ); mientras que en el septo, el área de los cardiomiocitos es mayor en la base que en el vértice ( $P=0,016$ ,  $n=8$ ). Estos resultados indicaban que, al comparar los datos obtenidos en diferentes animales se deberían realizar las mediciones de los cardiomiocitos en las mismas localizaciones cardiacas.

	Localización	P-VAL	Intervalo de confianza	Conclusión
<b>PVI</b>	1 vs 2	0,0000	(21,7939; 58,3570)	1>2
	1 vs 3	0,1029	(-40,3742; 3,7069)	No significativo
	2 vs 3	0,0000	(-77,3870; -39,4312)	2<3
<b>S</b>	1 vs 2	0,1248	(-4,0379; 33,1437)	No significativo
	1 vs 3	0,0161	(4,0933; 40,0773)	1>3
	2 vs 3	0,3599	(-8,6053; 23,6702)	No significativo
<b>PVD</b>	1 vs 2	0,0002	(-28, 8679; -8,8102)	1<2
	1 vs 3	0,0000	(-57,4487; -34,6231)	1<3
	2 vs 3	0,0000	(-40,5384; -13,8551)	2<3

Tabla 150. Comparación del área de los cardiomiocitos en 6 localizaciones distintas del corazón de los ratones silvestres. PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo interventricular; 1: localización cercana a la base cardiaca; 2: localización intermedia; 3: localización cercana al vértice cardíaco.

La comparación de las áreas de los cardiomiocitos entre los ratones mutantes para *Sirt1* y los ratones silvestres indicaba que, en general, las áreas de los cardiomiocitos de los ratones silvestres son significativamente mayores que las de los heterocigotos, y estas últimas mayores que las de los homocigotos, lo que indicaría que existe un efecto dosis génica de *Sirt1* sobre el área de los cardiomiocitos (Fig. 40). En algunas regiones no se encontraron diferencias significativas entre las áreas de los cardiomiocitos heterocigotos y homocigotos, por ejemplo en las zonas intermedias de la pared del ventrículo izquierdo y del septo (Fig. 40). En la única localización en la que no se encontraron diferencias significativas entre los ratones silvestres y los ratones mutantes fue en la pared del ventrículo derecho cerca de la base del corazón (Fig. 40).

## RESULTADOS

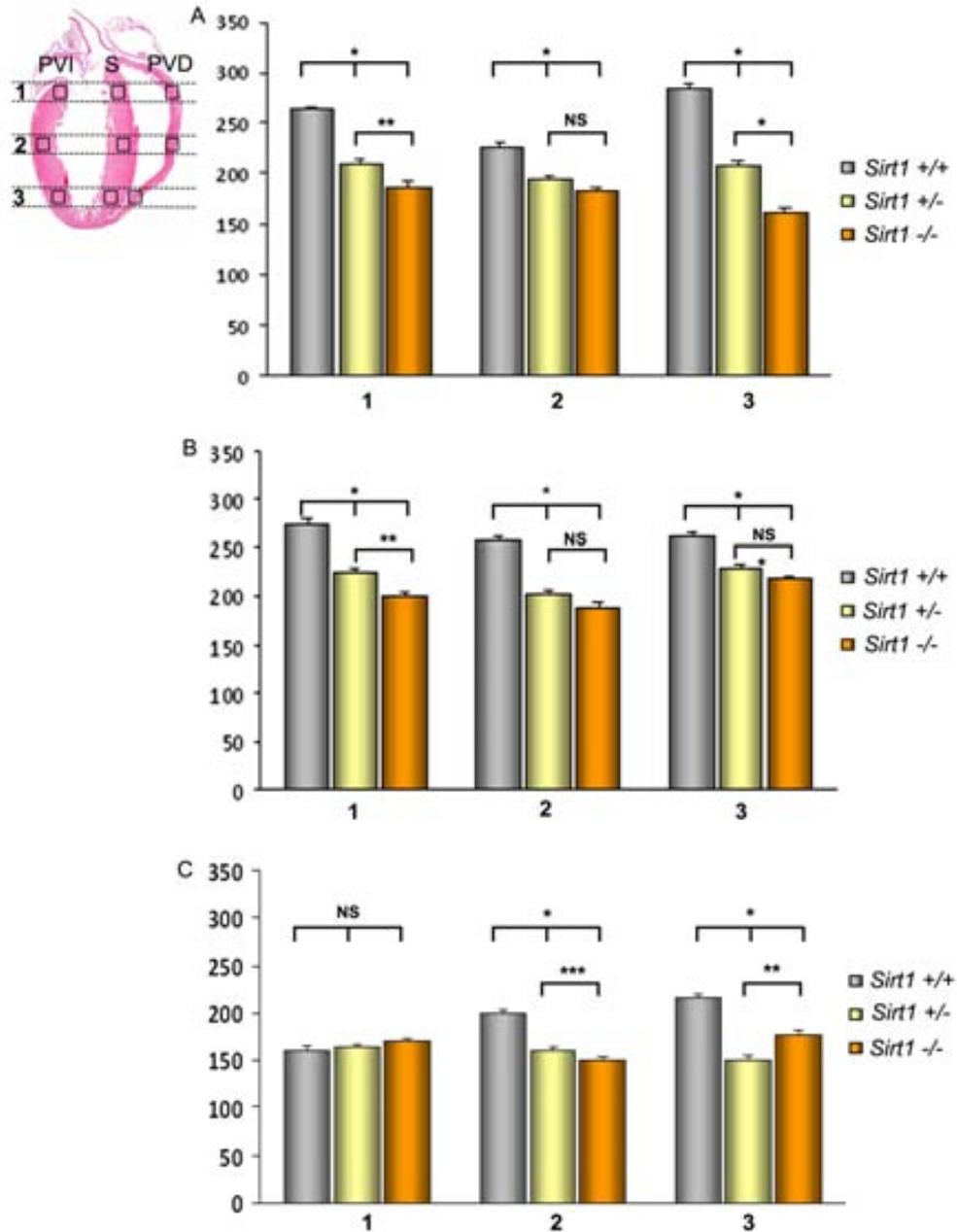


Fig. 40. Análisis comparativo del área de los cardiomiocitos entre los ratones silvestres y heterocigotos y homocigotos para *Sirt1*. A. Pared ventricular izquierda. B. Septo interventricular. C. Pared ventricular derecha. PVD: pared ventrículo derecho; PVI: pared ventrículo izquierdo; S: septo interventricular; 1: zona cercana a la base; 2: zona intermedia; 3: zona cercana al vértice. (A) \* $P < 0,0001$ ; \*\* $P < 0,05$ . (B) \* $P < 0,0001$ ; \*\* $P = 0,05$ . (C) \* $P < 0,0001$ ; \*\* $P = 0,01$ ; \*\*\* $P = 0,05$ .

### C.5.4 ANÁLISIS ULTRAESTRUCTURAL DE LOS CARDIOMIOCITOS

La observación mediante microscopía electrónica de transmisión de las muestras de la pared del ventrículo izquierdo procedentes de ratones adultos,

señala una alteración específica de las mitocondrias de los cardiomiocitos en los ratones mutantes (Fig. 41).

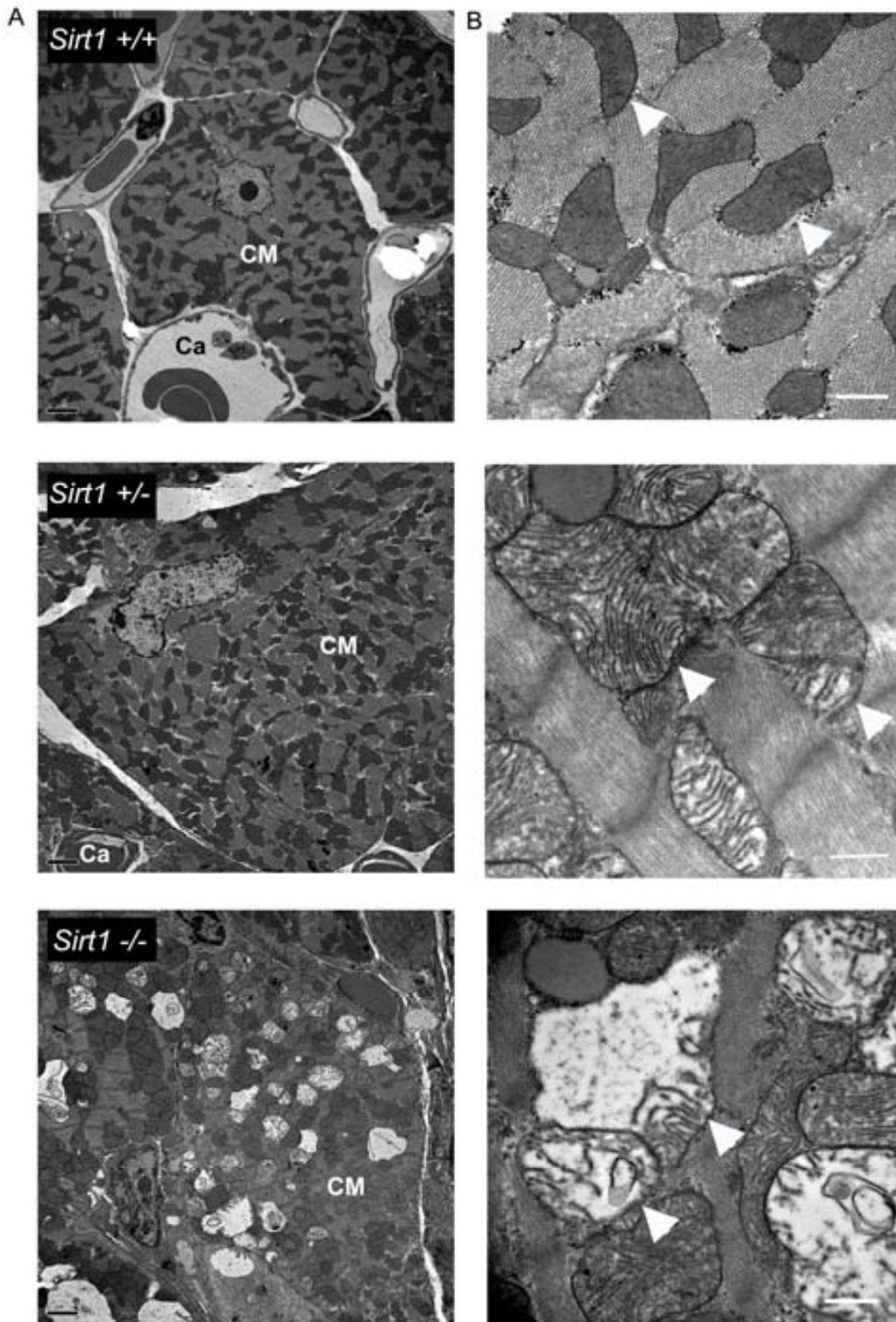


Fig. 41. Análisis ultraestructural de los cardiomiocitos de los ratones adultos. Las mitocondrias (puntas de flecha) están dilatadas, pierden sus crestas y aparecen con zonas electrolúcidas (\*) en los ratones mutantes. Las mitocondrias de los ratones mutantes homocigotos están mucho más alteradas que las de los ratones heterocigotos. CM: cardiomiocito; Ca: capilar. Barras A: 3,3 $\mu$ m; B: 0,4  $\mu$ m.

## RESULTADOS

La lesión subcelular consiste en la dilatación de las mitocondrias, con pérdida de crestas y aparición de espacios electrolúcidos en su interior (*swollen mitochondria*).

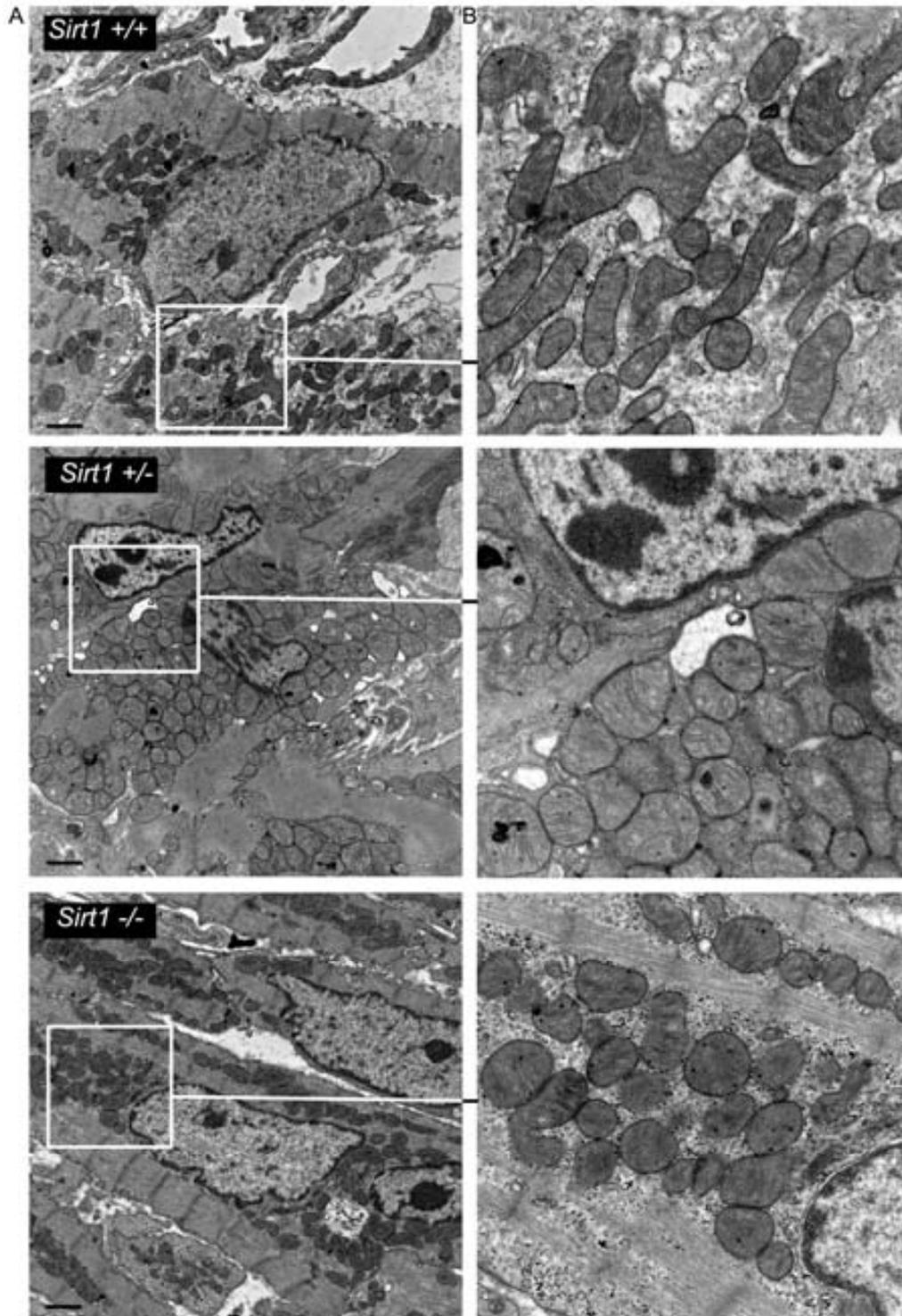


Fig. 42. Análisis ultraestructural de los cardiomiocitos de los ratones de un día de edad (P0). No se observan alteraciones manifiestas en las mitocondrias de los ratones mutantes respecto a los ratones silvestres. Barras A: 38 mm, B:1,28 mm.

El grado de lesión observado en las mitocondrias estaba relacionado con la dosis génica, estando menos alteradas las mitocondrias de los ratones mutantes heterocigotos que las de los homocigotos (Fig. 41). No se observó una disposición anormal de las miofibrillas, ni de los sarcómeros en los cardiomiocitos de los ratones mutantes (Fig. 41).

En cambio, el análisis ultraestructural de los cardiomiocitos de los ratones neonatos no mostró alteraciones evidentes en las mitocondrias de los ratones mutantes para *Sirt1* (Fig. 42).

### **C.5.5 ANÁLISIS DE OTROS MARCADORES DE LESIÓN CARDIACA**

Aunque no se observó fibrosis en las secciones de los corazones de los ratones mutantes teñidas con el Tricrómico de Masson (datos no mostrados), se planteó la utilización de un marcador de macrófagos (Mac-2) para identificar y cuantificar el número de estas células inflamatorias. Como se puede observar en la Figura 43, los macrófagos Mac-2 positivos fueron muy escasos tanto en los ratones silvestres como en los mutantes heterocigotos y homocigotos, lo que indicaba la ausencia de un proceso inflamatorio en el miocardio de estos animales.

Por último se utilizarón los marcadores ANP y BNP, que son péptidos natriuréticos, producidos por los cardiomiocitos de los atrios en condiciones normales, y que cuando existe una cardiopatía su expresión se traslada a los cardiomiocitos ventriculares (de Bold 1985; Clerico et al. 2011). La Figura 44 muestra como el ANP se sobreexpresa en los cardiomiocitos de los ventrículos de los ratones mutantes. Como era de esperar, los cardiomiocitos de los atrios de los ratones silvestres expresan ANP y BNP.

## RESULTADOS

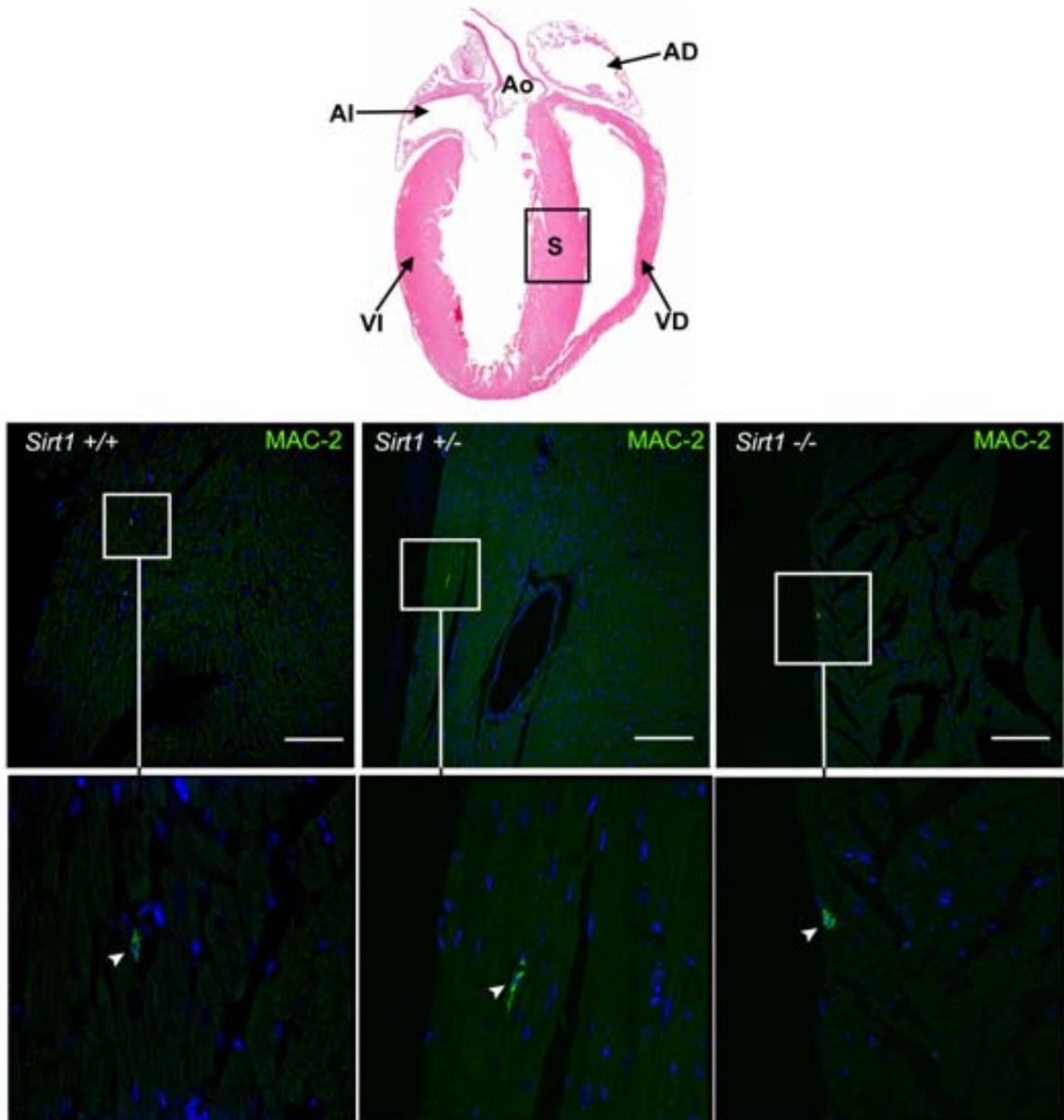


Fig. 43. Análisis del marcador MAC-2. Los macrófagos marcados con MAC-2 (puntas de flecha), que se observaban en el parénquima cardiaco, tanto de los ratones silvestres como de los ratones mutantes heterocigotos y homocigotos, fueron muy escasos y no se observaron diferencias aparentes en la cantidad encontrada entre los diferentes animales. Barras: 139  $\mu$ m.

## RESULTADOS

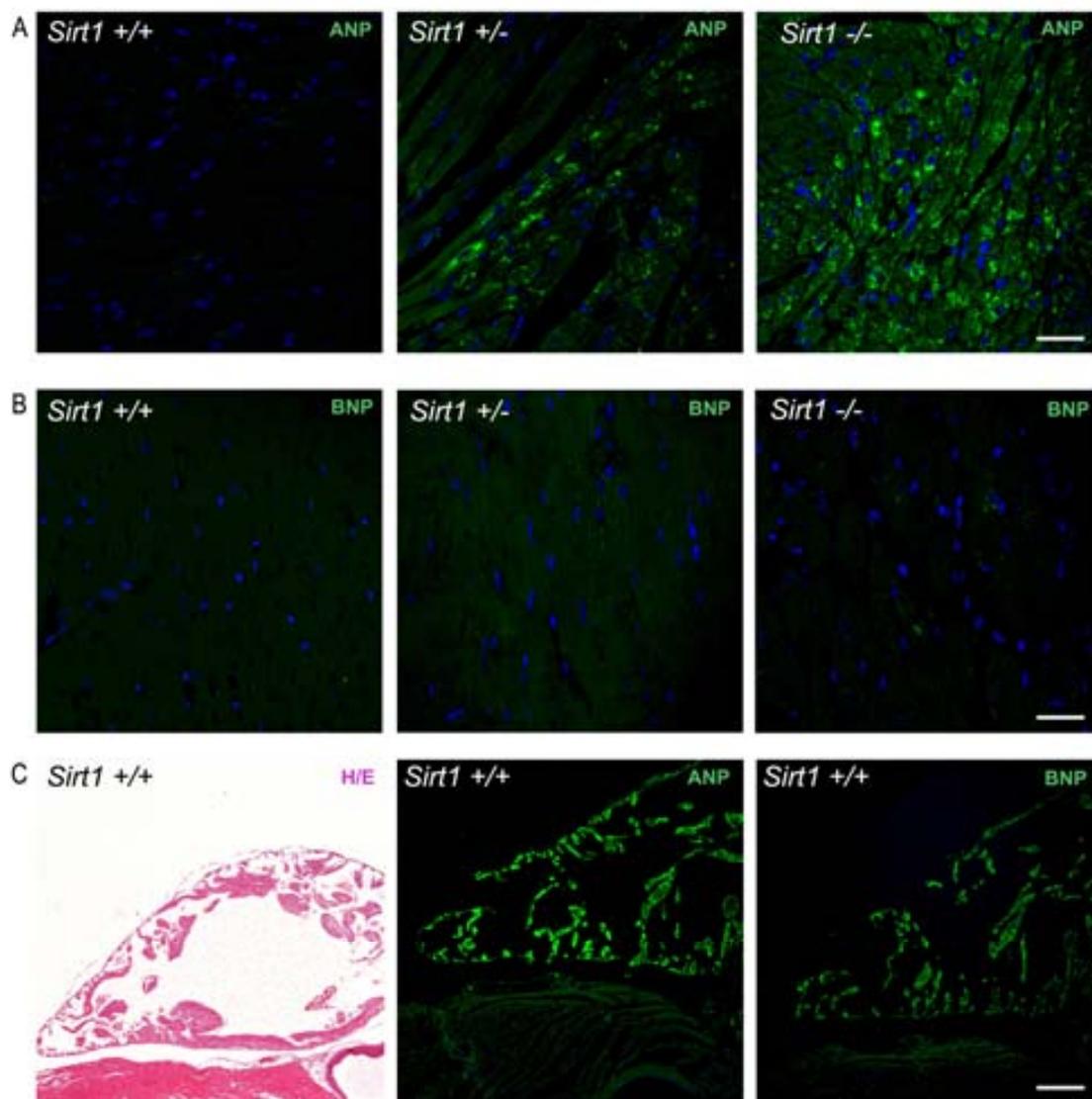


Fig. 44. Análisis de los marcadores ANP y BNP. A. ANP se sobreexpresa en los cardiomiocitos de los ventrículos de los ratones mutantes para *Sirt1*. B. Por el contrario, BNP no está sobreexpresado. C. Como era de esperar, los cardiomiocitos de los atrios de los ratones silvestres expresaban ANP y BNP. Barras: 300 μm.



## **D. DISCUSIÓN**



Como se ha podido observar en la introducción de este trabajo, de las especies animales usadas en investigación cardiovascular, el sistema circulatorio del ratón es el que guarda más similitudes anatómicas con el de los seres humanos (en comparación, por ejemplo, con el perro). Las similitudes anatómicas, son entre otras razones, como la posibilidad de estudiar modelos modificados genéticamente, responsables de que el ratón se haya convertido en los últimos años en el modelo animal más utilizado en investigación cardiovascular, incluida la biología vascular (Wright 1969; Katz et al. 2006; Layton et al. 2006; Natsis et al. 2009; Vilahur et al. 2011).

La metodología necesaria para producir modificaciones genéticas en las células de los mamíferos no empezó a desarrollarse hasta la mitad de la década de 1980 (Smithies et al. 1985; Thompson et al. 1989). Anteriormente, los estudios de función vascular en ratones eran anecdóticos (Webb et al. 1987). Incluso en años más recientes, los ratones sólo se han usado de forma ocasional en estudios de funcionalidad vascular normal (Faraci y Sigmund 1999). En contraposición a esto, desde el inicio de la creación de ratones knock-out y transgénicos, el número de estudios con modelos de enfermedades cardiovasculares ha ido en aumento. Sin embargo, aunque el número de estudios que investigan los efectos de las alteraciones genéticas en el desarrollo de ciertas patologías como la aterosclerosis ha aumentado, hay pocos estudios que investiguen los cambios en la función vascular de estos modelos (Bonthu et al. 1997; Stoyanova et al. 2007; Ni et al. 2008; Amirbekian et al. 2009).

Uno de los puntos más críticos a la hora de diseñar e interpretar estudios con ratones modificados genéticamente se debe a la influencia de la dotación genética (*genetic background*) y a la selección de una cepa control correcta. Para generar ratones modificados genéticamente, el abordaje más común es utilizar células madre embrionarias de la cepa de ratón 129, que se someten a la manipulación genética deseada e inyectarlas, posteriormente, en blastocistos de la cepa C57BL/6. Después de esto, la transmisión del genoma modificado se consigue cruzando estos ratones con otros C57BL/6 no modificados. Para eliminar la heterogeneidad en la dotación genética suelen realizarse retrocruzamientos durante varias generaciones. Después de 7 generaciones de

cruces, la dotación genética tiene una uniformidad de más del 99% (Picciotto y Wickman 1998).

Debido a que, muchas veces, los estudios con ratones modificados genéticamente se realizan antes de conseguir uniformidad en la dotación genética, se recomienda usar como controles a los propios hermanos de tipo silvestre de la camada. De esta forma, el grado de heterogeneidad en la dotación genética es similar, tanto en los animales modificados como en los controles. Sin embargo, controlar la dotación genética es fundamental ya que se sabe que mutaciones genéticas iguales pueden presentar fenotipos diferentes según la cepa de origen que se haya utilizado.

### **D.1 RATÓN C57BL/6**

La cepa de ratones C57BL/6 fue creada en 1921. Fue la primera a la que se secuenció el genoma y, hoy en día, es una de las cepas endogámicas más utilizadas tanto en investigación general, como para ser usada como cepa de origen para el desarrollo de líneas mutantes. Los ratones C57BL/6 se utilizan en diferentes áreas de investigación (biología cardiovascular, biología del desarrollo, diabetes, obesidad, inmunología, neurobiología) ya que presentan muchas características interesantes, como la de ser susceptibles a desarrollar obesidad inducida por dieta, diabetes tipo 2 y aterosclerosis. El hecho de que sea una cepa endogámica indica que es el resultado del cruce de al menos 20 generaciones consecutivas de uniones entre ratones hermanos. Esto permite que la descendencia sea uniforme, tanto genética como fenotípicamente. Además, como se ha mencionado antes, las hembras C57BL/6 se usan frecuentemente como donantes de embriones y sus blastocistos son utilizados como receptores de células madre embrionarias en la creación de ratones knockout (Picciotto y Wickman 1998).

Este estudio se llevó a cabo en esta cepa debido a todas estas características y a la importancia de conocer la fisiología vascular de un ratón empleado comúnmente en investigación cardiovascular y que es, al mismo tiempo, base de muchas de las cepas manipuladas genéticamente que sirven como modelos de enfermedad cardiovascular (Breslow 1996; Faraci y Sigmund 1999; Daugherty 2002; Daugherty y Cassis 2004; Westrick et al. 2007).

En el primer estudio, se incluyó un total de 27 animales (10 machos y 17 hembras) tras consultar al Servei d' Estadística de la Universitat Autònoma de Barcelona y teniendo en cuenta el número de animales que se utiliza habitualmente en este tipo de experimentos.

En una primera fase se realizó un estudio piloto con 7 hembras para poner a punto la técnica y obtener valores hemodinámicos preliminares. Después de esto, se realizó el estudio definitivo con 10 machos y 10 hembras. Una vez finalizado el estudio definitivo, se compararon los datos obtenidos en el estudio piloto preliminar y el definitivo. Al no haber diferencias entre ambos, se incluyeron las 7 primeras hembras en la muestra final.

Todos los animales estudiados eran adultos de dos meses de edad. Se seleccionó un grupo uniforme de edades para evitar las diferencias debidas a este factor.

En medicina humana la mayoría de constantes fisiológicas cardiovasculares se expresa en función de la edad del individuo y del género, muchas veces incluso haciendo una aproximación al peso del paciente o al área de superficie corporal (BSA) (Pearce et al. 1993; Garcier et al. 2003; Daimon et al. 2008; Mao et al. 2008; Wolak et al. 2008). Aunque en muchos de los estudios en ratones publicados actualmente no se especifica el género del animal o sólo se utilizan individuos de uno de los sexos, se creyó conveniente incluir este factor de variación, ya que el género determina, entre otros factores, que el peso de los animales a la misma edad sea diferente, lo que puede afectar a los resultados (Tanaka et al. 1996; Chaves et al. 2001; Collins et al. 2003; Stypmann et al. 2006; Gan et al. 2007; Stoyanova et al. 2007; Baumann et al. 2008; Bonnin et al. 2008; Ni et al. 2008; Amirbekian et al. 2009).

## **D.2 ECOGRAFÍA DE ALTA FRECUENCIA**

El aumento del uso del ratón en investigación ha estimulado el desarrollo de técnicas de imagen no invasivas, especialmente diseñadas para evaluar y monitorizar su sistema cardiovascular. Los métodos no invasivos permiten reducir el número de animales utilizados en experimentación, sobre todo al plantear estudios longitudinales. Al utilizar cada animal como su propio control, las hipótesis sobre el inicio de una enfermedad o sobre la efectividad de un

tratamiento concreto pueden ponerse a prueba con menos animales de los que serían necesarios en estudios terminales.

Aunque hasta el momento se han puesto a punto diferentes técnicas de diagnóstico por imagen aplicadas al ratón, como resonancia magnética nuclear, microCT o PET, la ecografía es la más extendida en investigación cardiovascular (Coatney 2001; Hartley et al. 2002; McVeigh 2006).

En este estudio se ha utilizado un ecógrafo de alta frecuencia especialmente diseñado y adaptado para animales de laboratorio de pequeño tamaño, debido a que sus características técnicas superan las prestaciones de los ecógrafos convencionales y se adaptan a las limitaciones debidas a la fisiología de estos animales (pequeño tamaño y frecuencia cardíaca y respiratoria elevadas) (Nieman et al. 2005; McVeigh 2006).

La utilización de transductores de alta frecuencia no es algo nuevo. En medicina humana se ha aplicado en imagen dermatológica, oftalmológica e intravascular con buenos resultados (Jemec et al. 2000; Schoenhagen y Nissen 2002; Conway et al. 2005; Gyetvai y Kolozsvari 2005; Zhou et al. 2006; Jasaitiene et al. 2010). En investigación cardiovascular con ratones también se ha utilizado, pero hasta ahora ningún estudio ha descrito las características hemodinámicas normales de las arterias del ratón C57BL/6 (Foster et al. 2002; Zhou et al. 2002; Zhou et al. 2004; Feintuch et al. 2007).

Una de las principales ventajas del ecógrafo utilizado en este estudio es que la frecuencia de insonación es alta y puede ajustarse dentro de un rango, lo que permite la mayor resolución posible en relación a la penetración necesaria para ecografiar los vasos de un ratón adulto. Otra de sus ventajas es la integración de Doppler pulsado a estas frecuencias. La implementación de un Doppler de frecuencia alta permite estudiar flujos con velocidades bajas, como el de la arteria femoral. Las sondas utilizadas en este estudio tienen una resolución temporal de hasta 200 imágenes por segundo (frame rate). Una resolución temporal baja limita el estudio cardiovascular de un ratón adulto, que tiene frecuencias cardíacas de más de 500 latidos por minuto. En cambio, una resolución temporal de 200 imágenes por segundo permite obtener 20 imágenes por ciclo cardíaco en un ratón con frecuencia cardíaca de 600 lpm (Coatney 2001; Zhou et al. 2002; Phoon 2006). Otra de sus ventajas es que el tamaño de las imágenes ( $16,5 \text{ mm}^2$  en la sonda de 30MHz y  $14,5 \text{ mm}^2$  en la

sonda de 40MHZ) es suficiente para escanear los vasos evaluados en este estudio.

### D.2.1 PREPARACIÓN DE LOS ANIMALES

Los ratones son animales nocturnos, por lo que se recomienda que los estudios a los que se someten se realicen por la mañana y a la misma hora para evitar variaciones debidas al ciclo circadiano del animal. Por este motivo, la fase experimental de este estudio se llevó a cabo durante la mañana. Además, los animales no se sometieron a ayuno previo con el fin de minimizar el estrés y las alteraciones fisiológicas que conlleva la alteración de la rutina diaria de los ratones (Suckow et al. 2001; Orr 2002; Fox et al. 2007).

#### D.2.1.1 Anestesia

Se empleó anestesia general debido a la necesidad de inmovilizar y sedar a los ratones, para disminuir el estrés de la manipulación y para obtener imágenes de calidad. Aunque todos los anestésicos generales tienen efectos en la función cardiovascular, diversos estudios han demostrado que el isoflurano es el fármaco más seguro en esta especie y con el que se mantienen parámetros más parecidos a los fisiológicos, produciendo menor depresión cardiovascular (Tabla 151). Además, comparativamente, el isoflurano es el fármaco que mantiene las constantes de forma más estable y con el que las mediciones son más reproducibles. Es fácil de administrar, tiene tiempos de inicio de acción y recuperación rápidos y baja toxicidad en relación a otros anestésicos generales (Chaves et al. 2001; Roth et al. 2002; Janssen et al. 2004).

Parámetros fisiológicos del ratón	
Parámetro	Valores medios
Peso de los adultos	20-40 g
Temperatura corporal	36,5-38,0°C
Frecuencia respiratoria	80-230 respiraciones por minuto
Frecuencia cardiaca	500-600 latidos por minuto

Tabla 151. Parámetros fisiológicos normales en el ratón (Orr 2002; Fox et al. 2007).

Algunos autores recomiendan realizar estos estudios en animales conscientes para evitar los artefactos debidos a la anestesia (Yang et al. 1999; Carlson y Wyss 2000; Janssen et al. 2002). Sin embargo, para conseguir este objetivo es necesario someter a los ratones a sesiones de entrenamiento y

habituaación a la técnica, algo que no se puede hacer en las instalaciones donde se efectuó este estudio. Además, algunos autores han descrito que las frecuencias cardiacas que se observan en ratones despiertos, que están siendo manipulados son superiores a las medidas mediante telemetría en ratones despiertos que no están siendo manipulados. Esto sugiere que, a pesar del entrenamiento, el tono simpático puede estar activado durante las mediciones debido a estrés (Uechi et al. 1998).

Existen otros factores importantes en el procedimiento anestésico de los ratones, como por ejemplo, realizar una buena monitorización anestésica, evitar ejercer presión excesiva sobre el cuerpo del ratón y mantener la temperatura corporal (Williams et al. 2002). La monitorización anestésica incluye dos aspectos: asegurar un plano anestésico adecuado para realizar el experimento y mantener las constantes dentro de parámetros lo más fisiológicos posibles. En el estudio esta monitorización se efectuó mediante visualización directa y gracias a la utilización de dispositivos adaptados para medir la frecuencia cardiaca y respiratoria y la temperatura corporal. La temperatura corporal se mantenía dentro de parámetros normales al colocar al ratón sobre una plataforma caliente y aplicar gel de ecografías atemperado como medio de contacto. Para garantizar el mantenimiento de los parámetros fisiológicos, la ecografía no comenzaba hasta estabilizar las constantes fisiológicas de los ratones. Además, durante todo el experimento se evitaba ejercer presión sobre el tórax y el abdomen del ratón para no alterar su función respiratoria.

### **D.2.2 ECOGRAFÍA VASCULAR**

Para cada uno de los vasos estudiados se ha descrito el mejor abordaje posible, sus características en modo bidimensional (diámetro y área) y sus propiedades hemodinámicas a partir del espectro Doppler de cada uno de ellos (perfil de velocidad de flujo y resistencia de la onda Doppler pulsado, velocidades, aceleración, tiempo de aceleración, flujo sanguíneo e índices vasculares).

### **D.2.2.1 Descripción de la onda Doppler pulsado**

La evaluación cualitativa del espectro Doppler pulsado de las arterias es un método útil para detectar de forma no invasiva posibles alteraciones vasculares que provoquen cambios en el flujo sanguíneo (Taylor et al. 1985). En medicina humana se han empleado durante décadas los términos trifásico, bifásico y monofásico al caracterizar los espectros de ondas arteriales. Sin embargo, las referencias publicadas para cada uno de estos términos son ambiguas, conflictivas o incluso inexistentes, por lo que han dado lugar a confusión. Los expertos en ecografía vascular suelen coincidir en que categorizar los espectros Doppler no es un trabajo tan simple como puede parecer, debido a que es una tarea bastante subjetiva que depende de la experiencia de quien lo interprete (Scissons 2008a). Por ejemplo, mientras que los flujos trifásicos y monofásicos aparecen ilustrados frecuentemente en múltiples publicaciones, los flujos bifásicos se definen y se representan de forma poco habitual. Algunas publicaciones describen las ondas bifásicas como aquellas que presentan flujo reverso. Otras en cambio describen lo contrario o incluso las confunden con ondas monofásicas (Scissons 2008a; Scissons 2008b; Scissons 2009).

Con la finalidad de unificar criterios, en este estudio se ha usado la clasificación descrita por Szatmari et al. (2001), tanto en la descripción del perfil de velocidad de flujo como en el patrón de resistencia de la onda Doppler pulsado. Además, en el cálculo de los índices vasculares, se ha empleado la velocidad diastólica mínima en vez de la final como describen Bonnin y Fressonnet (2005), debido a que, de esta forma, a partir de un valor numérico se intuye fácilmente si se trata de un flujo de resistencia alta ( $RI > 1$ ) o no, sin necesidad de ver la representación del espectro Doppler (Evans et al. 1980). Antes de realizar comparaciones con otros estudios de Doppler vascular, debe tenerse presente la definición de cada uno de los parámetros utilizados y el por qué se ha escogido.

### **D.2.2.2 Cálculo del flujo sanguíneo**

Calcular el flujo sanguíneo de forma no invasiva, a partir de datos obtenidos mediante ecografía (diámetro del vaso y velocidad media), es un método muy atractivo en ratones ya que debido a su pequeño tamaño y

volumen de sangre, los sistemas para calcular el flujo sanguíneo de forma invasiva (sondas de flujo, microesferas, termodilución) son más difíciles de realizar y más propensos a generar errores (Janssen et al. 2002).

Hasta el momento, se ha usado la ecografía convencional para calcular el gasto cardiaco en ratones adultos en la aorta ascendente. En estos casos, la precisión de las medidas se ha visto limitada al utilizar volúmenes de muestra relativamente grandes, difíciles de ajustar a la luz vascular, y al no disponer de una resolución espacial alta (Yang et al. 1999; Strauch et al. 2003; Janssen et al. 2004; Stypmann et al. 2006). Como se ha comentado antes, los ecógrafos de alta frecuencia tienen una resolución espacial elevada que permite medir de forma más precisa el diámetro del vaso (Baumann et al. 2008). Esto es muy importante para calcular el flujo sanguíneo ya que el diámetro aparece en la fórmula del flujo.

Medir el flujo sanguíneo con este método tiene ventajas e inconvenientes. Es más seguro y menos invasivo que otros sistemas, pero es necesario tener paciencia y entrenamiento para obtener imágenes y espectros Doppler de calidad, sobre todo en los vasos más profundos (aorta abdominal prerrenal) o en los de diámetro muy pequeño (arteria femoral). Estas medidas son aún más difíciles cuando se estudian ratones de mayor tamaño o que tienen gas en el tracto digestivo (Sato et al. 1987).

Además, a pesar de las características del ecógrafo, la medición del flujo sanguíneo puede verse influida por diferentes factores como el tamaño y la elasticidad del vaso, la contractilidad cardiaca y el gasto cardiaco, que pueden variar de un ratón a otro (Blackshear et al. 1980). Por otro lado, la precisión en las medidas del flujo sanguíneo puede verse afectada por diversos factores metodológicos (errores debidos a la forma del vaso, a la medición del diámetro del vaso y a su variación durante el ciclo cardiaco y errores en la estimación de la velocidad media) (Taylor y Holland 1990; Zwiebel et al. 1995).

En nuestro estudio, todas las medidas fueron hechas por la misma persona, con el fin de reducir la variabilidad interindividual. Además, se realizaron cuatro medidas de cada variable con el objetivo de reducir la variabilidad intraindividual, ya que no era posible repetir las medidas en el mismo animal en días consecutivos debido a las características de estabulación del laboratorio.

### **D.2.2.3 Otros datos numéricos obtenidos a partir del espectro Doppler**

En las ondas Doppler pulsado, además de hacer un análisis cualitativo del espectro Doppler de cada localización, se estudió la frecuencia cardiaca, las velocidades (máxima, mínima y media), la aceleración y el tiempo de aceleración en 4 ciclos cardiacos diferentes. Estas medidas cuantitativas pueden ser útiles para confirmar el análisis subjetivo de la onda Doppler pulsado y además ayudan a reducir la variabilidad intraobservador e interobservador de la interpretación de los datos (Shaan et al. 2003). Además, dos de estos parámetros son independientes del ángulo de insonación: la frecuencia cardiaca, que depende de la duración del ciclo cardiaco, y el tiempo de aceleración. Sin embargo, el tiempo de aceleración puede verse afectado por otros factores, cómo la colocación del volumen de muestra dentro del vaso (Mai et al. 2004).

#### **Aceleración del flujo sanguíneo**

En el caso de la aceleración, los resultados obtenidos en nuestro estudio mediante estadística descriptiva, muestran resultados variables en cada localización (desviaciones estándar grandes). Esto se debe en parte a la dificultad al realizar manualmente las mediciones sobre el espectro Doppler pulsado. En el caso de la aceleración y, a diferencia de lo que ocurre con el resto de variables hemodinámicas, el posicionamiento de los calíperos es muy sensible: mínimas diferencias en su colocación dan como resultado grandes diferencias en su valor.

## **D.3 ECOGRAFÍA DE LA AORTA ASCENDENTE, ARCO AÓRTICO Y AORTA DESCENDENTE TORÁCICA EN EL RATÓN**

### **D.3.1 NÚMERO DE ANIMALES**

Sólo se estudió el arco aórtico de 14 de los 27 ratones totales. Esto se debe a que al inicio del trabajo se consideraba prácticamente imposible obtener imágenes de calidad de los tres orificios del arco aórtico. Al avanzar en el estudio y adquirir mayor experiencia en la técnica, decidió incorporarse también esta porción de la aorta. No fue posible obtener datos en cada uno de los 3 orificios de estos 14 animales, pero los resultados descriptivos se han incluido porque, excepto en el caso del orificio del TB, las medidas pudieron hacerse en

más de 10 animales. No obstante, al ser un número menor al total, estos datos no se han incluido en el análisis inferencial de la aorta.

### **D.3.2 ABORDAJE**

El abordaje ecográfico a la aorta ascendente, arco aórtico y aorta descendente torácica descrito en este estudio es similar al que se menciona en otros trabajos de ecocardiografía transtorácica con transductores de alta frecuencia en ratón (Tanaka et al. 1996; Zhou et al. 2004).

En nuestro estudio, el abordaje paraesternal derecho con secciones longitudinales fue el más útil, puesto que permite obtener una visión anatómica de conjunto de la aorta en el tórax, permite evaluar posibles lesiones vasculares o perivasculares y realizar medidas en modo bidimensional del diámetro del vaso. Sin embargo, no es posible generalizar e indicar que éste sea el mejor abordaje en cualquier circunstancia ya que, en ocasiones, fue necesario estudiar diversos abordajes, obtener imágenes en cada uno de ellos y seleccionar, con posteridad, el mejor.

Por lo que respecta a la ecografía con Doppler pulsado, al ser necesario obtener imágenes en sección longitudinal con ángulos inferiores a 60° y, teniendo en cuenta que la aorta en el tórax describe una curva de 180°, es imprescindible realizar múltiples movimientos del transductor y de la plataforma donde descansa el ratón para obtener registros de calidad. En consecuencia, en un mismo estudio es necesario realizar también abordajes paraesternales izquierdos y transversos sobre la entrada del tórax, usando como ventana acústica el timo.

En resumen se puede concluir que estandarizar un protocolo de abordaje ecográfico a la aorta en el tórax no es fácil, ya que según el objetivo del estudio deberán realizarse más o menos maniobras para conseguir las imágenes deseadas.

Un detalle importante es que a pesar de que la superficie de contacto del transductor es grande en comparación con el tamaño del ratón, y por tanto no es posible colocarla entre los espacios intercostales, los artefactos debidos a la presencia de costillas son mínimos. El esternón, en cambio, a pesar de ser estrecho sí produce artefactos considerables, por lo que se debe evitar al máximo. Los pulmones tampoco originan muchos artefactos ya que los lóbulos

pulmonares se localizan dorsocaudales respecto al corazón. La porción más craneal del pulmón derecho no alcanza la posición del arco aórtico y la del pulmón izquierdo se encuentra al mismo nivel que el tronco pulmonar (Cook 1965; Popesko et al. 1992; Suckow et al. 2001; Zhou et al. 2004; Fox et al. 2007; Casteleyn et al. 2010).

### **D.3.3 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA ASCENDENTE**

En nuestro estudio, el diámetro luminal medio de la aorta ascendente al final de la sístole cardíaca mide  $1,56 \pm 0,12$  mm (media  $\pm$  SD). Este valor concuerda con los obtenidos por Zhou, et al. (2004), descritos en ratones de la misma cepa y edad, que observaron, mediante ecocardiografía transtorácica de alta frecuencia, un diámetro luminal al final de la sístole de  $1,36, \pm 0,04$  mm. Los mismos autores realizaron también las medidas al final de la diástole y concluyeron que el diámetro sistólico final es mayor que el diastólico final en un 15% como media, cuando se utiliza un abordaje paraesternal izquierdo y en un 18% cuando se utiliza un abordaje paraesternal derecho (sin diferencias estadísticamente significativas entre ambos abordajes). En nuestro caso decidimos utilizar el diámetro al final de la sístole cardíaca por ser más fácil de medir y porque corresponde al momento en que el flujo sanguíneo en el vaso es mayor (Tabla 152).

En cambio, estos valores son mayores a los descritos por Casteleyn et al. (2010), que mediante moldes de corrosión vascular, describe un diámetro de  $0,82 \pm 0,01$  mm en hembras de 2 meses de edad de la cepa C3HeB/FeJ (30 gramos de peso medio). Las diferencias pueden deberse a que se trata de dos cepas diferentes y a que, a pesar de ser animales de peso superior por lo que se esperaría un diámetro mayor, las técnicas utilizadas son diferentes, los animales están muertos y por tanto no se tienen en consideración las variaciones debidas al ciclo cardíaco (Casteleyn et al. 2010).

En cuanto al área de la aorta ascendente, no se han publicado estudios ecográficos que describan este dato en ratones, siendo nuestros resultados los primeros. El cálculo del área se efectuó a partir del diámetro, aplicando una fórmula matemática. Este método tiene limitaciones ya que, entre otras cosas, se asume que se ha obtenido una sección perfectamente transversa del vaso y

que se trata de un área circular, lo que no es siempre cierto (Riesen et al. 2002).

En este trabajo no se realizó el estudio histológico de la aorta ascendente ni de la descendente torácica murina, sino que se centró en las características histológicas de la aorta descendente abdominal y de la arteria femoral, ya que hay más información morfológica disponible de los primeros segmentos de la aorta en el ratón (Nakashima et al. 1994; Chow et al. 1996; Seo et al. 1997; Maeda et al. 2000; Jones et al. 2005; Maeda et al. 2007; Fernandez et al. 2008; Chalothorn y Faber 2010).

Diámetro (mm)	Cepa	Edad	Sexo	Anestesia	Técnica	Referencia
1,14±0,04	C57BL/6	1-2m	M/H	Isoflurano	Doppler, 30MHz	Zhou et al. 2004
0,82±0,01	C3HeB/FeJ	2m	H	Post mórtem	Moldes corrosión/CT	Casteleyn et al. 2010
1,1±0,11	NE	13m	NE	Ketamina-Xylacina	Doppler, 15MHz	Strauch et al. 2003
1,49±0,02	C57BL/6	9,2±0,6m	M	Tribromoetanol	Doppler, 30MHz	Stoyanova et al. 2007
~1,3	C57BL/6	2,1-2,3m	M	Ketamina-Xylacina	Doppler 20MHz, moldes de corrosión	Huo et al. 2008
1,41±0,02	ICR(CD1)	1,5-2,0m	H	Isoflurano	Doppler, 19MHz	Wong et al. 2002
1,1±0,10	ICR(CD1)	2,5-6,2m	M/H	Halotano	Doppler, 5,5-7,5MHz	Fentzke et al. 1997
1,34±0,10	ICR(CD1)	1,5m	M/H	Ketamina-Xylacina	Doppler, 12MHz	Stypmann et al. 2006
<b>1,56±0,12(H)</b> <b>1,54±0,13(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>

Tabla 152. Diámetro de la aorta ascendente del ratón descrita en la bibliografía publicada hasta el momento. NE: no especificado; M macho; H: hembra; m: meses.

### D.3.4 ESPECTRO DOPPLER PULSADO DE LA AORTA ASCENDENTE

En este estudio, todos los animales presentaron un perfil de velocidad de flujo como con resistencia elevada en la aorta ascendente. Esta información no ha sido descrita con anterioridad en el ratón.

#### D.3.4.1 Características hemodinámicas de la aorta ascendente

##### D.3.4.1.1 Velocidad sistólica máxima

La velocidad sistólica máxima en este estudio es similar a la descrita por Reddy et al. (2005) y por Wong et al. (2002), que también utilizaron ratones anestesiados con isoflurano y sondas de frecuencia relativamente alta, aunque eran de cepa diferente a la de este estudio (Tabla 153). En cambio, es mayor a la presentada en otros estudios en los que se emplearon ratones C57BL/6 de

mayor edad (Hartley et al. 2000). En medicina humana se han observado correlaciones entre PSV y la edad, el área de superficie corporal (BSA) y la frecuencia cardiaca del individuo, aunque sólo el BSA se relaciona mediante regresión múltiple con la PSV (Sohn y Kim 2001). En cambio, en otro estudio, se observó una relación inversa, estadísticamente significativa, entre la PSV y la edad y el área de superficie corporal en diferentes vasos evaluados, aunque en el caso de la aorta ascendente y descendente torácica, esta correlación era cercana a cero (Wilson et al. 1985). En otro estudio en el que se utilizaron ratones CD1 de diferentes edades, no se observaron diferencias significativas en la PSV entre el grupo de animales jóvenes (8 semanas) y el de animales viejos (52 semanas) (Stypmann et al. 2006), por lo que las diferencias respecto al estudio de Hartley et al. (2000) podrían deberse a la utilización de transductores diferentes o a una frecuencia cardiaca distinta (Tabla 153).

En nuestro estudio se ha visto que la PSV en la aorta ascendente murina es similar a la de la aorta ascendente humana (760-1550 mm/s en adultos, 980-1430 mm/s en niños) (Grenadier et al. 1984; Wilson et al. 1985; Poutanen et al. 2003).

PSV(mm/s)	Cepa	Edad	Sexo	Anestesia	Técnica	Referencia
892±58	C57BL/6	13	M	Isoflurano	Doppler, 10MHz	Hartley et al. 2000
927±25	NE	NE	NE	Isoflurano	Doppler, 20MHz	Reddy et al. 2005
774±89	NE	13m	NE	Ketamina-Xylacina	Doppler, 6-15MHz	Strauch et al. 2003
540±120	ICR (CD1)	2,5-6,2m	M/H	Halotano	Doppler, 5,5-7,5MHz	Fentzke et al. 1997
731,6±81,8	ICR (CD1)	2m	M/H	Ketamina-Xylacina	Doppler, 12MHz	Stypmann et al. 2006
~1100	ICR (CD1)	1,5-2m	H	Isoflurano	Doppler, 19MHz	Wong et al. 2002
<b>1085,69±191,42(H)</b> <b>1262,30±158,03(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>

Tabla 153. PSV de la aorta ascendente del ratón descrita en la bibliografía publicada hasta el momento. NE: no especificado; M macho; H: hembra; m: meses.

#### D.3.4.1.2 Velocidad diastólica mínima

Pese a que se ha descrito la existencia de flujo reverso al inicio de la diástole en la aorta ascendente, no se han publicado estudios en los que se describa el valor de su velocidad diastólica mínima (MDV) en ratones. Nuestro estudio es por tanto, la primera descripción de esta variable en la aorta ascendente de ratones (media ± SD: -187,02 ± 53,36 mm/s).

### D.3.4.1.3 Velocidad media

Los valores de velocidad media de la aorta ascendente en este trabajo son superiores a los descritos en estudios anteriores en ratones (Tabla 154) (Hartley et al. 2000; Wong et al. 2002; Reddy et al. 2005; Stypmann et al. 2006; Huo et al. 2008) y similares a los de la aorta ascendente humana (600-940 mm/s) (Grenadier et al. 1984; Wilson et al. 1985; Poutanen et al. 2003). Las diferencias pueden deberse al uso de cepas diferentes, de transductores de frecuencia diferente y, en el caso del estudio de Hartley et al. (2000), a la utilización de animales de mayor edad. En el estudio de Huo et al. (2008), además de utilizar una técnica distinta mediante ecografía Doppler y medidas realizadas en moldes de corrosión, la anestesia inyectable puede ser responsable de gran parte de las diferencias observadas. La combinación ketamina-xylacina tiene efectos cardiodepresores graves en los ratones, como disminución de la frecuencia cardiaca, de la fracción de acortamiento y del gasto cardiaco (Yang et al. 1999b; Janssen et al. 2004).

TAMX(mm/s)	Cepa	Edad	Sexo	Anestesia	Técnica	Referencia
231±80	NE	NE	NE	Isoflurano	Doppler, 20MHz	Reddy et al. 2005
220±16	C57BL/6	13m	M	Isoflurano	Doppler, 20MHz	Hartley et al. 2000
151	C57BL/6	2,1- 2,3m	M	Ketamina- Xylacina	Doppler, 20MHz, moldes de corrosión	Huo et al. 2008
370	ICR(CD1)	1,5-2m	H	Isoflurano	Doppler, 19MHz	Wong et al. 2002
<b>609±112(H)</b> <b>677±112(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>

Tabla 154. TAMX de la aorta ascendente del ratón descrita en la bibliografía publicada hasta el momento. NE: no especificado; M macho; H: hembra; m: meses.

### D.3.4.1.4 Aceleración y tiempo de aceleración

En ratones, la aceleración y el tiempo de aceleración del flujo sanguíneo en la aorta ascendente no se han estudiado en profundidad. En un trabajo realizado en ratones de cepa inespecifica, la aceleración obtenida es menor a la observada en el presente estudio (Reddy et al. 2005). En otros estudios, realizados en ratones CD1 de edad similar a la de este trabajo, la aceleración es parecida a la descrita (Wong et al. 2002) (Tabla 155).

En cualquier caso, nuestro valor de aceleración presenta una desviación estándar grande, ya que se trata de un parámetro difícil de medir con precisión sobre el espectro Doppler debido a las características del software empleado. El tiempo de aceleración de la aorta ascendente es similar al descrito por otros

autores, y es menor al observado en medicina humana (50-150ms) (Wilson et al. 1985; Reddy et al. 2005) (Tabla 155).

Variable	Valor	Cepa	Edad	Sexo	Anestesia	Técnica	Referencia
a (mm/s <sup>2</sup> )	80940±3190	NE	NE	NE	Isoflurano	Doppler, 20MHz	Reddy et al. 2005
	~170000	ICR(CD1)	1,5-2m	H	Isoflurano	Doppler, 19MHz	Wong et al. 2002
	<b>134423±54953(H)</b> <b>160611±41442(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>
t (ms)	11,7±0,2	NE	NE	NE	Isoflurano	Doppler 20MHz	Reddy et al. 2005
	<b>10±3,57(H)</b> <b>9,58±1,89(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>
F (mm <sup>3</sup> /s)	200,33	C57BL/6	2,1-2,3m	M	Ketamina-Xylacina	Doppler 20MHz, moldes de corrosión	Huo et al. 2008
	<b>1171±272(H)</b> <b>1286±311,66(M)</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>

Tabla 155 Aceleración, tiempo de aceleración y flujo de la aorta ascendente del ratón descritos en la bibliografía publicada hasta el momento. NE: no especificado; M macho; H: hembra; m: meses.

#### D.3.4.1.5 Flujo sanguíneo

En nuestro trabajo, el flujo sanguíneo en la aorta ascendente es superior al descrito por Huo et al. (2008). Parte de las diferencias puede deberse a que esta variable se ha calculado como el producto del área transversal de la luz de la aorta ascendente por la velocidad media de la sangre en este punto. El área luminal de la aorta ascendente en el estudio de Huo et al. (2008) no se especifica, pero se obtiene a partir del diámetro, que se ha calculado con moldes de corrosión vascular. Esto, sumado al hecho de que la velocidad media del flujo difiere considerablemente entre ambos estudios puede ser responsable de las diferencias.

#### D.3.5 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DEL ARCO AÓRTICO

Hasta el momento no se han publicado estudios ecográficos descriptivos de la anatomía y características hemodinámicas del arco aórtico murino, pese a ser una de las localizaciones en las que aparecen de forma más frecuente las lesiones causadas por aterosclerosis (Nakashima et al. 1994; Iiyama et al. 1999; Lee et al. 2005; Feintuch et al. 2007). Los datos publicados del diámetro del arco aórtico murino se han obtenido a partir de moldes de corrosión vascular en ratones C57BL/6. Sin embargo, no se especifican claramente los puntos donde se realizan las medidas. Por lo tanto, nuestro estudio es el primero en describir el diámetro y área del arco aórtico en cada uno de sus tres

orificios mediante ecografía (Feintuch et al. 2007; Maeda et al. 2007; Casteleyn et al. 2010).

En el hombre, no se han descrito diferencias significativas en las dimensiones del arco aórtico entre ambos sexos (medidas realizadas en aorta ascendente, orificio del tronco braquiocefálico, orificio de la arteria carótida común izquierda, orificio de la arteria subclavia izquierda y en el inicio de la aorta descendente torácica) (Wright 1969). En cambio, sí existen diferencias significativas en todas estas dimensiones según la edad del individuo. Las dimensiones del arco aórtico y de sus ramas principales son menores en individuos jóvenes, aunque estas diferencias son mayores en la aorta que en sus ramas (Wright 1969).

### **D.3.6 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DEL ARCO AÓRTICO**

Como se ha comentado en los resultados, el orificio del tronco braquiocefálico fue el punto más difícil de medir, tanto en modo bidimensional como con ecografía Doppler pulsado, debido a su curvatura. Hasta el momento, no se han publicado datos sobre las características de espectro Doppler del arco aórtico del ratón usando ecografía de alta frecuencia.

En un estudio previo (Feintuch et al. 2007) se describe cómo puede variar el perfil de velocidad de flujo de un vaso según dónde se coloca el volumen de muestra. Al colocar un volumen de muestra pequeño cerca de la curvatura mayor del arco aórtico se obtiene un perfil de velocidad como con resistencia intermedia. En cambio, al posicionar el volumen de muestra cerca de la curvatura menor del arco, el flujo es de tipo intermedio con resistencia alta. En nuestro caso, para evitar estas diferencias, se escogió el método de insonación uniforme (Szatmari et al. 2001), colocando el volumen de muestra dentro de la luz entera del vaso, de forma que en el arco aórtico se obtiene un perfil de velocidad de flujo mayoritariamente como o intermedio con resistencia alta.

### **D.3.7 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA DESCENDENTE TORÁCICA**

Tampoco se han publicado estudios ecográficos completos de la aorta descendente torácica del ratón. Los únicos datos disponibles sobre el diámetro de este vaso se basan en moldes de corrosión y microCT, y son similares a los obtenidos en el presente trabajo (1,09-1,29 mm) (Suo et al. 2007; Huo et al. 2008).

### **D.3.8 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DE LA AORTA DESCENDENTE TORÁCICA**

En esta localización, la mayor parte de los animales de nuestro estudio presentó un perfil de velocidad de flujo romo de resistencia alta, igual que en medicina humana.

Los parámetros hemodinámicos de esta porción de la aorta tampoco han sido descritos completamente en ratones. La PSV observada en nuestro trabajo es superior a la de Strauch et al. (2003) ( $60,1 \pm 7,8$  cm/s, media  $\pm$  SD). Esto puede deberse al hecho de estudiar individuos más jóvenes (2 meses versus 13 meses), a los efectos cardiodepresores del protocolo anestésico empleado en su estudio (ketamina-xylacina intraperitoneal) y a que en su caso ha utilizado un transductor de frecuencia más baja (6-15 MHz). La velocidad sistólica máxima en la aorta descendente torácica de los ratones de nuestro trabajo es muy parecida a la de los seres humanos (700-1600 mm/s en individuos adultos, 1090-1420 mm/s en niños y  $791,23 \pm 108,67$  mm/s en el ratón). En cambio, la velocidad media (640-1080 mm/s en el hombre vs  $423,47 \pm 63,17$  mm/s en el ratón) y el tiempo de aceleración son menores (50-190 ms en individuos adultos vs  $15,40 \pm 4,81$  ms en el ratón) (Grenadier et al. 1984; Wilson et al. 1985; Poutanen et al. 2003). Por lo que respecta al flujo sanguíneo, en nuestro estudio se han obtenido valores superiores a los descritos en el estudio de Huo et al. (2008) ( $453 \pm 158$  mm<sup>3</sup>/s versus  $128,83$  mm<sup>3</sup>/s respectivamente). Las diferencias pueden justificarse de la misma manera que en los vasos anteriormente descritos.

## **D.4 ECOGRAFÍA DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL**

Actualmente tampoco hay disponible en la literatura una descripción ecográfica, anatómica y hemodinámica, de la aorta descendente abdominal y de la arteria femoral del ratón.

### **D.4.1 ABORDAJE**

El abordaje ecográfico a estos vasos en el ratón es similar al que se utiliza en perros y gatos, pero deben considerarse una serie de factores importantes (Spaulding 1997; Nyland et al. 2002; d'Anjou 2008a; Spaulding 1997). La presencia de alimento o de gas en el tracto digestivo puede dar lugar a artefactos que dificulten la evaluación de los vasos en el abdomen. Además, debe evitarse al máximo ejercer presión excesiva sobre el tórax o el abdomen del ratón, debido a su pequeño tamaño, sobre todo al avanzar caudalmente, ya que la aorta es más superficial y su diámetro es significativamente menor al de los puntos más craneales. En el caso de la arteria femoral, al ser un vaso muy pequeño y superficial, debe ejercerse poca presión para evitar colapsarla. Con este fin en nuestro estudio aplicábamos una cantidad abundante de gel de ecografía sobre la cara medial del muslo, donde apoyábamos el transductor. El uso de almohadillas puede ser recomendable, siempre y cuando no añadan peso o un exceso de presión a la extremidad.

Otro factor importante es que, al estudiar el flujo de la aorta y de la arteria femoral mediante Doppler pulsado, es más difícil obtener ángulos de insonación menores a 60° debido a la disposición anatómica de estos vasos

### **D.4.2 ECOGRAFÍA BIDIMENSIONAL DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL**

La información disponible hasta el momento del diámetro de la aorta descendente abdominal del ratón se ha obtenido mediante ecografía transrectal en animales sanos o en modelos de enfermedades cardiovasculares (Chiou et al. 2000; Knipp et al. 2003; Barisione et al. 2006). El resto de información disponible de esta porción de la aorta en ratones sanos se ha obtenido

mediante estudios con MRI y moldes de corrosión (Choudhury et al. 2002; Huo et al. 2008; Amirbekian et al. 2009; Goergen et al. 2010).

En nuestro caso, el diámetro luminal medio de la aorta en sístole es similar al descrito mediante MRI en ratones de la misma cepa por Amirbekian et al. (2009), tanto en la aorta prerrenal ( $1,03 \pm 0,15$  mm vs 1,21-1,36 mm, respectivamente) como en la postrenal ( $0,77 \pm 0,11$  mm vs 0,84-0,93 mm, respectivamente). El diámetro de la aorta preiliaca obtenido en nuestro estudio ( $0,67 \pm 0,12$  mm, media  $\pm$  SD) sólo puede compararse con datos obtenidos a partir de moldes de corrosión vascular en ratones macho de la misma cepa y edad (0,719 mm) y con datos obtenidos mediante ecografía transrectal por (0,4-0,7 mm).(Chiou et al. 2000; Huo et al. 2008).

De forma similar a lo hallado en el estudio ecográfico vascular, en el estudio histológico se observó que el calibre de la aorta descendente abdominal disminuye caudalmente, y es mayor en conjunto al de la arteria femoral (Wolinsky y Glagov 1969).

Hasta este momento, no se han publicado datos del área luminal de la aorta descendente abdominal, medida mediante ecografía transabdominal, en ratones sanos, por lo que nuestro estudio es la primera descripción. Tampoco hay datos disponibles del diámetro ni del área de la arteria femoral del ratón.

#### **D.4.3 ESPECTRO DOPPLER PULSADO Y CARACTERÍSTICAS HEMODINÁMICAS DE LA AORTA DESCENDENTE ABDOMINAL Y DE LA ARTERIA FEMORAL**

En nuestro estudio, en las tres localizaciones descritas en la aorta descendente abdominal (prerrenal, postrenal y preiliaca), el perfil de velocidad de flujo de la aorta fue mayoritariamente de tipo intermedio en vez de romo, siendo el cambio progresivo a lo largo del vaso. En la aorta prerrenal, el 68% de animales presentó flujo intermedio. Este porcentaje crece hasta un 92% en la aorta postrenal y a un 96,20% en la aorta preiliaca. Esto difiere de lo observado en humanos y perros, en los que el flujo a lo largo de la aorta descendente abdominal es de tipo romo (Taylor et al. 1985; Taylor et al. 1999; Lee et al. 2004; Koma et al. 2005; Osada et al. 2007; Chavhan et al. 2008; Wood et al. 2010). Por lo que respecta a la resistencia del flujo, aunque a lo

largo de la aorta abdominal la tendencia predominante es que haya un flujo de resistencia intermedia, también se observaron animales con resistencia alta.

Según lo descrito por otros autores, en la aorta prerrenal murina se espera que no haya flujo reverso, igual que en medicina humana (Amirbekian et al. 2009). Sin embargo, en el presente trabajo, en un 24% (6/25) de los ratones se observó flujo reverso al inicio de la diástole (40% de los machos y 13,30% de las hembras).

En el caso de la aorta postrenal, en medicina humana se observa la presencia de flujo reverso, que se explica por la baja resistencia que ofrece el lecho renal y la alta impedancia a la que se enfrenta la aorta postrenal al irrigar las extremidades inferiores (Holenstein y Ku 1988; Moore et al. 1994; Taylor et al. 1999; Wood et al. 2010). En el estudio de Amirbekian et al. (2009), en la aorta postrenal murina no se observa flujo reverso, al igual que en la aorta prerrenal. En nuestro caso, en la aorta postrenal, un 28% de los animales presentó flujo reverso al inicio de la diástole (el 50% de los machos y el 13,30% de las hembras).

En cuanto a la aorta preiliaca, sólo se observó resistencia elevada al flujo en una hembra (3,80% de los animales), siendo el resto de tipo intermedio, al contrario de lo que ocurre en humanos y en perros (Taylor et al. 1985; Taylor et al. 1999; Lee et al. 2004; Koma et al. 2005; Osada et al. 2007; Chavhan et al. 2008; Miño et al. 2008; Wood et al. 2010).

Las diferencias descritas en este estudio respecto a los datos publicados por Amirbekian et al. (2009) pueden deberse a distintos factores. Aunque en ambos trabajos se utilizaron ratones de la misma cepa, en el de Amirbekian et al. (2009), no se especifica ni la edad ni el sexo de los mismos. En nuestro caso, tanto en la aorta prerrenal como en la postrenal, la aparición de flujo reverso parece más frecuente en machos que en hembras (en la aorta prerrenal el 40% de machos presentó flujo reverso en comparación con un 13,30% de las hembras y, en la aorta postrenal, la mitad de los machos presentó flujo reverso mientras que sólo un 13,30% de las hembras lo tuvo). Si en el estudio de Amirbekian et al. (2009) se hubieran utilizado ratones de ambos sexos, es posible que también observara estas diferencias.

Aunque en ambos trabajos los animales fueron anestesiados con isoflurano, en el de Amirbekian et al. (2009) no se especifica ni la duración de

la anestesia ni si los parámetros fisiológicos (gasto cardiaco, frecuencia cardiaca, temperatura corporal) se mantuvieron dentro de valores normales. En nuestro caso, las mediciones se realizaban en animales con gasto cardiaco normal (mayor a 20 ml/min), frecuencia cardiaca superior a 400 latidos por minuto y en los que se regulaba la temperatura corporal mediante sistemas de calefacción externos. En ratones, la variación en estos parámetros afecta de forma directa sus características hemodinámicas, por lo que deben tomarse en consideración (Chaves et al. 2001; Roth et al. 2002; Janssen et al. 2004).

Otra diferencia entre ambos estudios se debe a los puntos en los que se han efectuado las mediciones. En nuestro caso, las medidas en la aorta prerrenal se realizaron en un punto craneal al polo craneal del riñón derecho (al igual que en el suyo) y las medidas postrenales se hicieron caudales a la salida de la arteria renal izquierda, lo que difiere del otro trabajo, ya que en su caso se hicieron caudales al polo caudal del riñón izquierdo.

Otra diferencia radica en las técnicas empleadas en ambos casos. En el estudio de Amirbekian et al. (2009) se utilizó MRI de 4,7T, con *gating* cardiaco para adquirir 10 imágenes por ciclo cardiaco, a diferencia de nuestro estudio ecográfico, con una resolución temporal de 200 imágenes por segundo, lo que equivale a unas 27 imágenes por ciclo cardiaco en un ratón con frecuencia cardiaca de 450 latidos por minuto.

En nuestro trabajo, aunque la velocidad sistólica máxima y la velocidad media de la aorta prerrenal son superiores a las de Amirbekian et al. (2009) (PSV:  $635,31 \pm 186,03$  mm/s vs 563 mm/s; TAMX:  $345,70 \pm 100,88$  mm/s vs 172 mm/s, respectivamente), el flujo medio es similar ( $291,98 \pm 123,46$  mm<sup>3</sup>/s vs 255 mm<sup>3</sup>/s, respectivamente). Tampoco observamos diferencias en estos parámetros entre los animales que tenían flujos de resistencia alta o intermedia.

En el caso de la aorta postrenal, la velocidad sistólica máxima y la velocidad media también fueron superiores a las de Amirbekian et al. (2009) (PSV:  $574,06 \pm 277,55$  mm/s vs 499 mm/s; TAMX:  $303,47 \pm 127,14$  mm/s vs 189 mm/s, respectivamente), y el flujo medio también fue similar en ambos casos ( $142,07 \pm 64,70$  mm<sup>3</sup>/s vs 125 mm<sup>3</sup>/s, respectivamente). En esta localización se observaron diferencias en estos parámetros entre los animales que tenían flujos de resistencia elevada o intermedia respectivamente (PSV:

360,14 ± 87,06 mm/s vs 657,25 ± 205,96 mm/s; TAMX: 180,97 ± 54,55mm/s vs 349,67 ± 114,07 mm/s; F: 84,18 ± 53,33 vs 164,58 ± 54,68 mm<sup>3</sup>/s). En el caso de los vasos con resistencia intermedia, las desviaciones estándar son mayores porque se incluyen todos los animales que no presentaron flujo reverso (pudiendo abarcar cualquier valor superior a cero).

En medicina humana, las características hemodinámicas de la aorta postrenal en individuos en reposo se caracterizan por presentar regiones de recirculación compleja. Sin embargo, cuando los individuos se someten a ejercicio físico moderado, estas regiones dejan de observarse y desaparece el flujo reverso en la aorta postrenal (Bogren y Buonocore 1994; Moore y Ku 1994; Moore et al. 1994; Taylor et al. 1999). Así pues, el ejercicio físico, además de causar cambios cardiovasculares sistémicos, produce efectos locales en las arterias principales. Además, algunos autores han señalado que el efecto de la actividad física sobre las características hemodinámicas arteriales se perpetúa en el tiempo más allá del momento en el que se está realizando el ejercicio en sí. La acción directa de estos factores hemodinámicos positivos puede desencadenar fenómenos bioquímicos (como el aumento de liberación de óxido nítrico y prostaciclina por las células endoteliales, lo que da lugar a vasodilatación) que pueden actuar cuando el ejercicio ya ha cesado (Niebauer y Cooke 1996). En nuestro caso, la actividad física de los ratones antes de realizar las ecografías no se reguló. Es posible que en los animales en los que se observó flujo de resistencia intermedia en la aorta postrenal hubieran tenido mayor actividad física durante la noche, mientras que los ratones en los que se observó flujo reverso en esta localización hayan tenido menor actividad.

Otra posible causa de la existencia de flujo reverso en la aorta postrenal de algunos animales puede deberse a las necesidades de los lechos vasculares a los que irrigan. Las arterias que irrigan órganos internos, como las arterias carótidas internas, no presentan flujo reverso en diástole. En medicina humana se cree que el flujo retrógrado que se observa en la aorta y en las arterias de las extremidades contribuye sustancialmente en la perfusión diastólica de las vísceras como el corazón, el cerebro y los riñones (Bogren y Buonocore 1994). Así, en el caso de la aorta postrenal, la presencia de flujo reverso podría garantizar el aporte sanguíneo a los riñones y a las vísceras

irrigadas por las arterias celíaca y mesentérica craneal. Si se compara el flujo sanguíneo de la aorta postrenal entre los animales que presentaron flujo reverso y los que no, puede verse que el flujo en los primeros ( $84,18 \pm 53,33 \text{ mm}^3/\text{s}$ ) es menor que en los segundos ( $164,58 \pm 54,68 \text{ mm}^3/\text{s}$ ). Teniendo en cuenta que, en la aorta prerrenal el flujo fue similar en todos los animales ( $288,66 \pm 123,66$  vs  $293,03 \pm 126,76 \text{ mm}^3/\text{s}$ , en animales con resistencia alta vs intermedia respectivamente) se explica que la diferencia de volumen sanguíneo se localice en estas vísceras. Al tratarse de animales sanos y, teniendo en cuenta que el flujo arterial hacia los riñones debe mantenerse constante en la medida de lo posible, las diferencias observadas pueden estar causadas por cambios en el flujo hacia el tracto digestivo (arteria celíaca y mesentérica craneal) según si el animal estaba realizando la digestión o no. En nuestro estudio los ratones no fueron sometidos a ayuno para minimizar el estrés. Los animales podían alimentarse *ad libitum* la noche anterior al estudio, por lo que no es posible determinar si estos animales estaban haciendo la digestión o no en estos momentos. En humanos se ha visto que el flujo de la arteria mesentérica craneal durante el ayuno varía entre 378-692 ml/min. Después de comer, el flujo aumenta entre un 78 y 250%. Por el contrario, los cambios en la arteria celíaca son mínimos (Jager et al. 1986; Moneta et al. 1988). Los cambios observados en el flujo se explican sobre todo por un aumento significativo de la velocidad media en la arteria mesentérica craneal, que se incrementa entre un 78-164% después de comer. Sin embargo, en estos estudios el flujo en la aorta abdominal no se vio afectado por la digestión. En perros sucede algo parecido: el flujo en la arteria celíaca y mesentérica craneal aumenta postprandialmente (debido a la acción de diversas sustancias como gastrina, colecistoquinina, péptido intestinal vasoactivo, secretina, glucagón e histamina) y se caracteriza por una disminución significativa de los índices de pulsatilidad y de resistencia y un aumento significativo de la velocidad media, velocidad diastólica final y flujo sanguíneo. Sin embargo tampoco se han observado cambios en el flujo de la aorta prerrenal en periodo postprandial (Riesen et al. 2002). Hasta el momento, no se han publicado estudios sobre los efectos de la digestión en los flujos sanguíneos de la aorta, arteria celíaca y mesentérica craneal en ratones, por lo que no podemos saber

si esta circunstancia produce cambios hemodinámicos en esta especie ni de qué tipo serían.

En nuestro trabajo se ha visto que la velocidad sistólica máxima de la aorta postrenal en ratones con resistencia alta es menor a la de los que presentan resistencia intermedia. Esto es esperable ya que la amplitud del pulso en cualquier punto del árbol arterial es el resultado de la suma del flujo anterógrado y de las ondas reflejadas. Cuando aumenta la vasoconstricción, se refleja mayor cantidad de onda, lo que provoca una disminución de la amplitud del pulso (Delis et al. 2000). Por otro lado, la velocidad diastólica es más sensible que la velocidad sistólica a los cambios que se producen en la resistencia periférica, ya que es la porción de la onda arterial de baja presión. Un aumento de la velocidad diastólica produce un aumento en la velocidad media y una disminución de los índices de resistencia vasculares. Además, el aumento de la velocidad diastólica llevará a calcular valores mayores de flujo sanguíneo (Riesen et al. 2002).

La cuantificación del flujo arterial depende de la precisión de las mediciones (tanto del diámetro del vaso como de la velocidad media). Es posible que las diferencias observadas en la aorta postrenal entre animales con resistencia alta o intermedia se deban en parte a la dificultad de medir un vaso de dimensión menor que la aorta prerrenal y al hecho de que la velocidad media en los casos en los que la resistencia era alta, es menor.

En resumen, la presencia o ausencia de flujo reverso en la aorta postrenal de los ratones podría deberse a fenómenos fisiológicos normales, según la actividad física previa al estudio ecográfico y según si están haciendo la digestión o no. Teniendo en cuenta que el estudio histopatológico no revela la presencia de lesiones ni diferencias entre ambos casos, puede asumirse que ambos patrones pueden ser completamente normales en el ratón.

Los resultados obtenidos en la aorta preiliaca y arteria femoral difieren de los observados en medicina humana y canina (Taylor et al. 1985; Kohler et al. 1987; Taylor et al. 1999; Lee et al. 2004; Koma et al. 2005; Hirsch et al. 2006; Osada et al. 2007; Chavhan et al. 2008; Miño et al. 2008; Wood et al. 2010). Esto puede deberse a que de forma fisiológica, en el ratón, el perfil de velocidad de flujo y la resistencia de la aorta preiliaca sean intermedias y que la arteria femoral tenga un perfil de velocidad de flujo intermedio con resistencia

baja, mientras que en el hombre y en el perro, el flujo en estos vasos es de tipo romo con resistencia alta.

En medicina humana se ha visto que en condiciones normales, tanto el diámetro del vaso como la velocidad del flujo disminuyen a medida que se progresa por las piernas del paciente, y que existe gran variabilidad en el aspecto del espectro Doppler a lo largo de estos segmentos. Además, la magnitud del flujo diastólico reverso también depende de la resistencia arterial periférica y de la resistencia en las arteriolas (Polak 1993; de Smet et al. 1996). El patrón del flujo sanguíneo es fácilmente modificable, incluso estudiando un mismo punto en la arteria, debido a su elevada sensibilidad y respuesta a factores externos. Por ejemplo, existe una relación estrecha entre el patrón del flujo sanguíneo y la temperatura ambiental, que se debe a factores vasomotores (resistencia arterial periférica y resistencia en las arteriolas) que afectan la magnitud del flujo diastólico reverso (Nimura et al. 1974; Polak 1993; de Smet et al. 1996). Por lo tanto, la variabilidad del patrón de flujo en las arterias periféricas se considera una de sus características principales, por lo que no debe confundirse en todos los casos con patología. En condiciones normales, el espectro Doppler de la arteria femoral humana presenta flujo reverso y va cambiando a medida que se examina el vaso distalmente: la velocidad sistólica máxima y el flujo reverso disminuyen. Después de realizar ejercicio, de administrar fármacos vasodilatadores o en caso de que exista una lesión proximal que reduzca el flujo sanguíneo, el espectro Doppler pierde el flujo reverso, y la velocidad sistólica máxima puede aumentar (como sucede con los vasodilatadores) o disminuir (cuando existen lesiones proximales que disminuyen el flujo) (Polak 1993).

Es posible que lo mismo ocurra en los ratones. Que el flujo reverso que se observa en la aorta vaya desapareciendo poco a poco a medida que avanzamos hacia las extremidades, al mismo tiempo que disminuye el calibre del vaso y la velocidad de la sangre, y que la presencia de flujo de resistencia intermedia en la aorta preiliaca y baja en la arteria femoral, sea completamente normal en el ratón.

Otro factor que podría influir en la aparición de este tipo de flujos en la aorta preiliaca y en la arteria femoral, a diferencia del flujo de resistencia alta observado en ambos vasos en humanos, es la anestesia. Lamentablemente,

no hay datos disponibles en ratones conscientes para realizar comparaciones (Reddy et al. 2009).

En caballos anestesiados con isoflurano, el espectro Doppler de la arteria femoral presenta flujo anterógrado a lo largo de la diástole, sin flujo reverso (al contrario de lo que sucede en caballos conscientes) (Raisis et al. 2000). Como el diámetro del vaso se mantiene estable, se cree que este cambio se debe a un aumento de la velocidad sanguínea media, lo que produce un aumento en el flujo volumétrico hacia las extremidades. La desaparición del flujo reverso y la mayor cantidad de flujo anterógrado pueden deberse a vasodilatación periférica.

En humanos, el isoflurano produce un aumento del flujo hacia las extremidades inferiores y disminuye la resistencia vascular femoral (Raisis et al. 2000). También se ha observado que el isoflurano disminuye la resistencia periférica total y puede producir relajación muscular profunda (Eger 1984).

Si esto mismo ocurre en ratones, la disminución de la resistencia periférica durante la anestesia puede ser la responsable de la aparición de flujos de resistencia intermedia o baja en estos vasos.

En estudios realizados en humanos a lo largo de las arterias periféricas (por ejemplo siguiendo la arteria subclavia, braquial y radial), se ha visto que el flujo reverso aparece más frecuentemente en la parte media de la arteria que en la distal (por ejemplo, es más frecuente en la arteria braquial que en la radial). Parece que esto se debe a una mayor elasticidad de la pared arterial en los puntos más proximales que en los distales (Nimura et al. 1974). La transición desde una arteria elástica, como la aorta, a una muscular, como la femoral, es progresivo, igual que la desaparición del flujo reverso que se ha descrito a medida que se avanza por el árbol arterial (Young et al. 2006). Es posible que, debido a las pequeñas dimensiones de los ratones, este cambio hemodinámico se observe antes que en humanos (en la aorta preiliaca y en las arterias femorales), a pesar de que histológicamente, la aorta preiliaca siga siendo una arteria elástica, aunque contenga menos unidades lamelares que los segmentos aórticos anteriores.

Otra posible explicación puede deberse al cambio de posición de los animales, que pasan de una postura cuadrúpeda o bípeda, cuando están despiertos, a estar en decúbito dorsal durante el examen. En pacientes

humanos sanos y en pacientes con enfermedad vascular periférica, el flujo en las extremidades inferiores disminuye al pasar de estar recumbentes a estar de pie, y viceversa. Esta respuesta recibe el nombre de reflejo venoarteriolar, un reflejo simpático que hace aumentar la resistencia precapilar en respuesta al aumento de presión venosa, disminuyendo el flujo capilar (Wilkins et al. 1950; Gaskell y Burton 1953; Beaconsfield y Ginsburg 1955; Levick y Michel 1978). Se ha demostrado que el flujo de la arteria poplítea se ve afectado de forma marcada por la postura, siendo significativamente mayor cuando los pacientes están acostados que cuando están sentados (Delis et al. 2000).

El reflejo venoarteriolar puede desencadenarse en respuesta a estasis venosa, aplicación externa de presión negativa y al colocar las extremidades por debajo del nivel del corazón. Este reflejo minimiza el aumento de presión microvascular al aumentar la presión venosa (al estar de pie), protegiendo el lecho capilar de las consecuencias de tener un aumento de la carga hidrostática.

Finalmente, la ausencia de flujo reverso en la aorta preiliaca y en la arteria femoral podría deberse a la presencia de falsas estenosis proximales al punto de medición, debidas a compresión de los vasos durante el examen ecográfico. En la unión aortoiliaca humana y en las arterias femorales, la presencia de estenosis proximales o en el punto donde se están realizando las mediciones, se manifiesta, entre otras características, por la desaparición de flujo reverso en el espectro Doppler (de Smet et al. 1996). Cuando la estenosis afecta a más del 50% de la luz vascular aparecen flujos de resistencia intermedia en vez de alta en la arteria femoral y cuando la oclusión aortoiliaca o iliaca es completa, se observa un flujo femoral de resistencia baja (Shalan et al. 2003; Spronk et al. 2005). Las ondas anómalas que pueden verse distales a un punto de estenosis grave reciben el nombre de *tardus parvus*. Estas ondas se caracterizan por tener un tiempo de aceleración mayor al normal, por presentar picos sistólicos menores y redondeados y obliteración de la depresión sistólica temprana debido a disminución de flujo (Bude et al. 1994; Wood et al. 2010). En nuestro estudio de la arteria femoral se ejercía mínima presión sobre la región inguinal de los animales, por lo que consideramos que se trata del espectro Doppler normal de la arteria femoral de los ratones.

Como se ha descrito en estudios anteriores, en este trabajo se ha observado que el número de unidades lamelares de la túnica media de la aorta descendente abdominal disminuye progresivamente a medida que disminuye el diámetro del vaso (Wolinsky y Glagov 1969). Se ha descrito que el número total de unidades lamelares de la túnica media es casi proporcional al diámetro de la aorta y que la tensión total que soporta la pared de la aorta aumenta marcadamente al incrementarse el diámetro del vaso. En cambio, la tensión media por unidad lamelar se mantiene más o menos constante a lo largo de la aorta, con valores comprendidos entre 1090 y 3010 dinas/cm según la especie (Wolinsky y Glagov 1967a; Wolinsky y Glagov 1967b). De esta forma, mientras la tensión total que soporta la pared aumenta al aumentar el radio del vaso, la tensión por unidad lamelar se mantiene prácticamente constante. Parece que esto es una adaptación selectiva de los mamíferos, en los que a medida que aumenta el radio del vaso y, por tanto, la tensión total que soporta su pared, se han ido añadiendo unidades lamelares a la túnica media con el fin de mantener una tensión constante. Por ejemplo, la estructura de la túnica media de la arteria pulmonar principal de los mamíferos es diferente en el periodo prenatal y postnatal. Antes de nacer, presenta una estructura elástica similar a la de la aorta. Después del nacimiento, al disminuir la presión intraluminal que debe soportar, la estructura cambia y adquiere un aspecto musculofibrilar menos organizado. Sin embargo, si se mantiene una presión sistémica en la circulación pulmonar después del nacimiento, la estructura inicial de la pared no cambia (Wolinsky y Glagov 1967a). Esto podría explicar lo que sucede en la aorta murina: a medida que avanza caudalmente, la presión intraluminal que soporta la pared disminuye, por lo que el número de fibras elásticas de la túnica media disminuye también.

Estos cambios se ven reflejados en el espectro Doppler de la aorta, que pasa de tener un perfil de velocidad de flujo como con resistencia alta en el tórax, a tener otro de tipo intermedio con resistencia intermedia en el abdomen. Del mismo modo, dos segmentos relativamente cercanos como son la aorta descendente abdominal preiliaca y la arteria femoral presentan una estructura histológica completamente distinta y unas características hemodinámicas muy diferentes entre sí, que pueden reflejar las presiones relativas distintas a las que están sometidos ambos vasos.

En este estudio se ha visto que la túnica adventicia de la aorta postrenal es proporcionalmente más grande que la de la aorta prerenal y que la aorta preiliaca, por lo que será un segmento menos elástico que los otros dos. La proporción de colágeno, fibras elásticas y células musculares lisas de la pared de la aorta es óptima para soportar las fuerzas a las que se somete la arteria, ya que debe ser una pared con resistencia relativamente alta a la tracción, capacidad adecuada, aunque no excesiva de distensión, que distribuya correctamente la tensión en la pared y que tenga respuestas viscoelásticas apropiadas a la oscilación pulsátil del flujo. La relación entre el mayor contenido de colágeno de la túnica adventicia de la aorta postrenal y sus características hemodinámicas no es clara. Podría pensarse que en este segmento, al haber un 28% de ratones con flujo reverso, la pared soporta una mayor tensión por lo que el colágeno ayudaría a evitar una distensión excesiva. Sin embargo, no se observaron diferencias morfológicas entre los ratones con resistencia alta o intermedia en la aorta postrenal. Sería necesario realizar estudios comparativos más detallados de la estructura de la pared aórtica del ratón para explicar las diferencias observadas respecto al resto de la aorta descendente abdominal. Algo similar ocurre en medicina humana: se ha descrito que, en el tórax, la aorta tiene más elastina que colágeno, mientras que en el abdomen sucede justo al contrario. Sin embargo, se desconoce el significado funcional de estas diferencias regionales (Wolinsky y Glagov 1967a).

## **D.5 ESTADÍSTICA INFERENCIAL AORTA**

El estudio estadístico inferencial de la aorta permite deducir el comportamiento que tendrían las variables hemodinámicas de una población de ratones con características y circunstancias similares a las de la muestra de nuestro estudio.

Si se realizara de nuevo este trabajo, sería posible mantener la frecuencia cardíaca dentro de la normalidad ya que se ha visto que, durante la hora que dura el estudio, se conserva por encima de 400 latidos por minuto sin variaciones significativas entre un vaso y otro, lo que se considera normal en ratones anestesiados con isoflurano (Doevendans et al. 1998; Yang et al. 1999;

Janssen et al. 2004). Por lo tanto, el resto de variables hemodinámicas estudiadas no se vería afectado por cambios en la frecuencia cardíaca.

Aunque en medicina humana, la American Society of Echocardiography recomienda realizar las medidas del diámetro de la raíz de la aorta incluyendo tanto la pared anterior como la posterior, en este estudio no se ha hecho de esta manera ya que, debido al tamaño de la aorta murina puede ser difícil distinguir los límites externos de la misma, que se confunden con el tejido circundante. Además así se evita sobreestimar las dimensiones de la luz o considerarlas normales cuando hay un estrechamiento de la misma (Sahn et al. 1978).

El diámetro y el área luminal, así como el flujo sanguíneo, disminuyen progresivamente y de forma significativa, a lo largo de la aorta. Lo mismo ocurre en medicina humana, donde además se ha visto que las variables biológicas que influyen en el diámetro de la aorta (y en consecuencia, en el área de la luz) son la edad, el sexo, el índice de masa corporal, la presión arterial sistólica y diastólica y el volumen de eyección (Vasan et al. 1995; Morrison et al. 2009).

Al haber estudiado ratones de la misma edad no puede descartarse que ocurra lo mismo en esta especie. En futuros estudios, para poder hacer comparaciones con animales con patología vascular (por ejemplo modelos de aneurismas), sería recomendable tener valores de referencia específicos para cada grupo de edad (van Meurs-Van Woezik y Krediet 1982; Grimshaw y Thompson 1997; da Silva et al. 1999; Garcier et al. 2003; Daugherty y Cassis 2004; Mao et al. 2008).

Si se considera como único factor de variabilidad la diferencia de sexo (y todos los demás factores, como el peso, la superficie de área corporal u otros, se mantienen iguales o constantes), el diámetro de la aorta de las mujeres es menor que el de los hombres. Es decir, entre individuos de ambos sexos pero de edad, altura y peso similares, el diámetro de la raíz de la aorta será inferior en mujeres (Vasan et al. 1995). Lo mismo se ha observado en otras localizaciones de la aorta humana (Sonesson et al. 1994; Grimshaw y Thompson 1997; da Silva et al. 1999; Garcier et al. 2003; Mao et al. 2008; Wanhainen et al. 2008). Lamentablemente, no existe una explicación clara para estas diferencias. Por otro lado, al indexar el diámetro de la aorta según el área

de superficie corporal, los resultados obtenidos en diversos estudios son diferentes (Roman et al. 1989; Sonesson et al. 1993; Wanhainen et al. 2008).

En medicina humana se han estudiado las diferencias estructurales y ecocardiográficas existentes entre hombres y mujeres, sobre todo en lo que respecta a las dimensiones ventriculares (Lauer et al. 1995; Vasan et al. 1997; Vasan et al. 2000; Salton et al. 2002; Baumann et al. 2008). En general, incluso después de estandarizar las medidas según el peso corporal de los pacientes, los hombres tienen dimensiones ventriculares mayores que las mujeres y, parece ser, que las mujeres tienen mayor preservación de la función sistólica del ventrículo izquierdo cuando hay disfunción diastólica que los hombres (Hogg et al. 2004).

En ratones se han obtenido resultados similares. En algunos estudios no se han observado diferencias entre machos y hembras (Stypmann et al. 2006), en otros se ha observado una tendencia a que haya resultados diferentes según el género del animal, sin ser estadísticamente significativos (Rottman et al. 2007). En otros casos sí se han observado diferencias estadísticamente significativas entre machos y hembras en diversas variables ecocardiográficas. En algunos de estos estudios, no se ha considerado que las diferencias puedan deberse al peso corporal ya que no se observó una correlación clara entre éste y las variables ecocardiográficas (a pesar de que el peso entre ambos sexos fuera estadísticamente diferente). Aún así, en los casos en que la correlación fue mayor, realizaron la comparación entre variables ecocardiográficas normalizando los valores por el peso corporal del animal y observaron, por ejemplo que, las dimensiones del ventrículo izquierdo eran mayores en hembras que en machos de la misma cepa y edad, aunque las diferencias no fueran estadísticamente significativas (Baumann et al. 2008).

En nuestro trabajo se ha observado que en el ratón, de forma general y sin tener en cuenta el peso de los animales ni valorar interacciones entre variables, el diámetro y el área de la aorta en conjunto, sin especificar un punto concreto, no se ven influidos por el género. Al estudiar cada porción de la aorta por separado, inicialmente puede parecer que el diámetro y el área de la aorta prerrenal fueran mayores en machos. Sin embargo, al considerar la covariable peso, estas diferencias desaparecen. Esto sugiere que las diferencias encontradas no se expliquen en su totalidad por el género, sino por el hecho de

que los animales de diferente sexo tienen también un peso diferente. Es posible, por tanto, que si hubiésemos estudiado animales de distinto sexo pero de peso similar entre sí no se hubieran observado estas diferencias. En futuros estudios podría ser necesario utilizar cuatro grupos de animales (machos y hembras de pesos iguales y diferentes) en los que se pudiera comparar el efecto del género y el peso por separado. Sin embargo, es posible que se añadieran nuevos factores de variabilidad, como la edad, ya que para obtener hembras de peso similar a los machos sería necesario usar animales mayores.

Estos resultados se repiten en otras variables estudiadas y nos indican la importancia de tener en cuenta tanto la cepa como el peso y el sexo del ratón, para evitar concluir que existen diferencias entre animales cuando, posiblemente si fueran más homogéneos, no las habría. Esta observación es de vital importancia cuando se comparan animales sanos con animales modificados genéticamente que sirven de modelos de enfermedades cardiovasculares, ya que debe tenerse presente que diferencias de peso pueden ser responsables de los cambios que se observen.

Al comparar variables hemodinámicas entre machos y hembras de la misma cepa y edad, los datos deberían normalizarse por el peso del animal. Al realizar comparaciones entre animales de la misma cepa, sexo y edad puede no ser necesario realizar esta estandarización, ya que los pesos deberían ser similares. En el caso de que, a pesar de comparar resultados estandarizados por el peso del animal, se observaran diferencias según el género, podría tratarse de un reflejo de diferencias preexistentes que pueden predisponer a uno de los dos sexos a desarrollar determinadas patologías (Baumann et al. 2008).

Las dos técnicas no invasivas más precisas para medir el flujo sanguíneo de la aorta son la ecografía con Doppler pulsado y la resonancia magnética (Gatehouse et al. 2005). En el caso de la ecografía deben considerarse ciertos detalles técnicos, como tener un volumen de muestra adecuado a la luz del vaso y su posición dentro del mismo, los ajustes de ganancia y el ángulo de insonación. En la aorta, debido a su localización anatómica, algunos de estos factores, como el ángulo Doppler, pueden ser difíciles de optimizar. Además, es un sistema muy dependiente de la precisión de la medida de la sección transversa de la aorta, que se asume circular

cuando puede no serlo. Por ejemplo, en humanos se sabe que el tracto de salida del ventrículo izquierdo es excéntrico, no circular. Por estos motivos, para muchos médicos, la técnica óptima para realizar estas medidas es la ecografía 3D (Chirinos y Segers 2010).

En ratones, la medición del flujo sanguíneo a lo largo de la aorta tiene las mismas limitaciones. Algunos autores consideran que la tomografía computerizada es el método de elección para medir el diámetro de la aorta, sobre todo en patologías como aneurismas abdominales. Sin embargo, otros autores consideran que la ecografía es más fiable, ya que se puede obtener una sección transversa del vaso al evaluar a tiempo real el flujo sanguíneo, angulándose perpendicularmente al flujo (Jaakkola et al. 1996; Sprouse et al. 2004; Nagre et al. 2011). Por otro lado, medir la velocidad media de la aorta murina mediante técnicas como MRI es más complejo que con ecografía, aunque, en los casos en los que se ha hecho, los resultados son similares con ambas técnicas (Ruff et al. 2000; Wiesmann et al. 2003; Schneider et al. 2006; Amirbekian et al. 2009).

Hasta el momento no hay disponible información precisa sobre la distribución del flujo sanguíneo en el árbol arterial del ratón. Algunos estudios realizados mediante técnicas de dilución y microesferas han descrito que el flujo sanguíneo al cerebro representa sólo un 3% del gasto cardiaco, similar a lo que sucede en ratas, pero muy diferente de lo que pasa en humanos, en los que representa aproximadamente un 14% del flujo sanguíneo total (Ganong 2005). Al comparar con ratas y humanos se observa que el flujo sanguíneo renal y esplácnico es 1,5-2 veces menor en ratones. Esto puede ser un reflejo de las diferencias entre los pesos relativos de los diferentes tejidos en las diferentes especies (Taylor y Tukmachi 1985; Doevendans et al. 1998). Aunque el objetivo de nuestro estudio no era definir la distribución del flujo sanguíneo arterial, con los valores promedio de los resultados obtenidos se observa que aproximadamente un 18% del flujo que hay en la aorta ascendente sale por las 3 ramas del arco aórtico (9% por el tronco braquiocefálico, 4,61% por la arteria carótida común izquierda y 4,41% por la arteria subclavia izquierda). Estos resultados son menores a los utilizados por otros autores, quienes asumen que, si el flujo en la aorta ascendente representa el 100% del flujo arterial, el que sale por las tres ramas del arco aórtico representa el 26% (Suo et al.

2007). En nuestro trabajo, la mitad del flujo que sale por las ramas del arco aórtico lo hace por el tronco braquiocefálico y un cuarto por cada una de las otras dos arterias aproximadamente. Estas proporciones concuerdan con datos obtenidos por otros autores mediante el uso de MRI, microCT y moldes de corrosión vascular (Feintuch et al. 2007). Lamentablemente, con estos datos no es posible concluir qué proporción del flujo se dirige a irrigar el cerebro a través de las arterias carótidas internas.

Por otro lado, en humanos se calcula que el flujo sanguíneo de las dos arterias renales corresponde al 20% del gasto cardiaco aproximadamente. En este trabajo, el flujo a las arterias renales, considerando que la arteria renal izquierda tendrá el mismo flujo que la derecha, representa aproximadamente un 11,30% del flujo de la aorta ascendente. Lamentablemente, no hay datos ecográficos publicados sobre estos valores en ratones, por lo que no es posible realizar comparaciones, aunque los resultados obtenidos son menores a los descritos por otros autores que han calculado, mediante una combinación de ecografía Doppler con moldes de corrosión vascular, que un 9,2% y un 8,3% del flujo de la aorta ascendente se dirigen a la arteria renal derecha e izquierda respectivamente (Osada et al. 2007; Huo et al. 2008).

Como ocurre en medicina humana, la velocidad sistólica máxima y la velocidad media observadas en este trabajo, disminuyen progresivamente a lo largo de la aorta (Chavhan et al. 2008; Wood et al. 2010). Además, en ambas variables se observaron algunas diferencias según el género y/o peso del animal. Como se ha comentado anteriormente, en los vasos en los que se observa flujo reverso, tanto la PSV como la TAMX suelen ser menores que en los animales con flujos de resistencia intermedia. En nuestro estudio, 6 animales tenían ondas de resistencia alta en la aorta prerrenal (4 machos y dos hembras). Es posible que las diferencias observadas en la aorta prerrenal se expliquen por la presencia del flujo reverso, ya que hay más machos con flujos de resistencia alta. En la aorta descendente torácica y preiliaca, al encontrar diferencias según el género en la PSV y la TAMX sólo cuando se considera el peso como covariable, es probable que, si se estudiaran animales de un único sexo pero de pesos diferentes, también se observarían estas diferencias.

En medicina humana se han estudiado diversos factores (operario, paciente, ecógrafo) que pueden influir en la aparición de errores al medir la

velocidad sistólica máxima del flujo sanguíneo en un vaso (Lui et al. 2005). De entre los factores debidos al operario destacan la falta de experiencia o de entrenamiento suficiente, la colocación inadecuada del ángulo de insonación respecto al vector de velocidad de flujo, la colocación incorrecta del volumen de muestra dentro de la luz vascular o la selección inadecuada de la ganancia Doppler. De los factores debidos al paciente destacan la morfología del vaso (tamaño, localización y tortuosidad), el movimiento del paciente y la presencia de lesiones vasculares; y de los factores derivados del ecógrafo destacan la forma del volumen de muestra y la capacidad de adaptarla a cada vaso, el procesamiento de la señal y la capacidad de convertir la frecuencia del ultrasonido en velocidades, entre otras. Se ha visto que cuando el error en la colocación del ángulo de insonación es de  $5^\circ$ , el error de medición de la PSV puede llegar a ser de un 15% (Lui et al. 2005). Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* demuestran que al utilizar ángulos Doppler mayores a los adecuados aparecen errores sistemáticos de sobreestimación de la PSV. En nuestro caso, la PSV mayor de la aorta preiliaca en hembras podría explicarse porque verdaderamente existan diferencias en este punto según el género, por errores en la adecuación del ángulo de insonación Doppler (un 34,60% de los animales se estudió con ángulos mayores a  $60^\circ$  - un 20% de los machos y un 43,80% de las hembras) o por una colocación incorrecta del volumen de muestra en la luz de esta porción del vaso, que tiene un diámetro menor que otros puntos de la aorta y es, por tanto más difícil de adecuar (Lui et al. 2005). En el caso de la aorta descendente torácica y abdominal prerrenal, las diferencias según el género podrían ser reales o deberse a la mayor dificultad de realizar las medidas en una localización tan profunda, sobre todo en los machos, que tienen peso y masa corporal mayor que las hembras.

Otro factor que no se ha considerado en este estudio es la ganancia del Doppler. Se ha visto que al utilizar ganancias bajas, el valor de PSV obtenido es aproximadamente un 10% menor al real. Con un nivel de ganancia saturado, este error alcanza un 20%. En nuestro estudio, la ganancia se adecuaba al valor óptimo según la experiencia personal evitando espectros saturados, pero no se cuantificó ni se estandarizó un valor concreto por lo que puede haber variado en cada localización y en cada paciente y puede ser responsable, en parte, de los resultados obtenidos (Lui et al. 2005). Los mismos errores

observados en el caso de la PSV pueden hacerse extensibles a la medición de la TAMX.

A partir de los resultados de este trabajo se esperaría que, en una población de ratones con características y circunstancias similares a las de este trabajo, la aorta abdominal no presentara flujo reverso y que tuviera, por tanto un flujo de resistencia intermedia, no alta como en el tórax, lo que concuerda con los resultados de Amirbekian et al. (2009). La velocidad diastólica mínima es responsable, en gran parte, de la evolución que sufren los índices vasculares (PI y RI) a lo largo de la aorta. En la aorta, los índices vasculares varían según el sitio donde se realicen las medidas, lo que es predecible porque estos índices, además de depender de la resistencia y de la capacidad de distensión del vaso, dependen también del área de la sección transversal del lecho vascular que hay por debajo del sitio de medición (Bude y Rubin 1999a; Bude y Rubin 1999b). Los índices vasculares dan información hemodinámica con algunas ventajas respecto a la medición de la resistencia vascular periférica total: son variables más fáciles de obtener de forma menos invasiva y son más reproducibles.

Al analizar el comportamiento de los índices vasculares de la aorta se puede estimar la impedancia del árbol arterial entero ya que la impedancia de entrada de la aorta es la suma de la impedancia impuesta por el lecho vascular que queda por debajo del punto donde se realizan las medidas (Chirinos y Segers 2010). Por lo tanto, la impedancia de entrada de la aorta no es en sí una medida de las propiedades de la aorta sino que más bien refleja la impedancia en la aorta proximal y todos los segmentos arteriales distales a ella, incluidos los efectos de la reflexión de ondas. Al inicio de cada ciclo cardíaco, el corazón genera una energía de pulso que tiene como resultado un aumento de presión y un flujo anterógrado durante el inicio de la sístole. La onda de energía generada por el ventrículo izquierdo se transmite por vasos conductores y se refleja parcialmente en sitios donde hay cambios de impedancia, como ramas o puntos donde cambia el diámetro o las propiedades histológicas de la pared arterial. Múltiples reflexiones pequeñas, originadas en diversos puntos, se dirigen hacia el corazón formando una onda refleja. En nuestro estudio, en el cálculo de ambos índices se ha usado la velocidad diastólica mínima en vez de la final ya que de esta forma se puede evidenciar numéricamente la presencia

de flujo reverso al inicio de la diástole sin necesidad de ver una representación del espectro Doppler pulsado. Ambos índices disminuyen progresivamente a medida que avanza su recorrido, debido, básicamente, a un aumento de la MDV y a una disminución de la PSV. Lamentablemente, no se han publicado otros estudios que describan los valores de estos índices en la aorta del ratón, por lo que no es posible realizar comparaciones con otros trabajos, aunque sí se sabe que pueden ser útiles al realizar estudios longitudinales o comparaciones con modelos de enfermedad vascular (Stoyanova et al. 2007).

Finalmente, en nuestro estudio se ha visto que la aceleración del flujo sanguíneo, que es un reflejo de la capacidad de contractilidad cardiaca, disminuye progresivamente a lo largo de la aorta (Noble et al. 1966). Esto puede explicarse debido a que el área de la sección transversal del lecho arterial aumenta progresivamente a medida que los troncos arteriales principales se ramifican (se contrarresta la disminución del tamaño del vaso con el aumento del número de ramas). En el perro, por ejemplo, al pasar de una arteria de 4 mm a arteriolas de 100  $\mu\text{m}$ , el área de la sección transversal del lecho arterial aumenta de 3 a 5 veces. En el caso de las arterias que se dividen en dos, el área de las ramas es 1,26 veces mayor que el de la arteria principal. Seguramente, estos mismos cambios se dan en el ratón (Bude y Rubin 1999a). Se ha visto que el aumento del área del lecho vascular que tiene lugar a medida que el flujo progresa a través del árbol arterial, produce una disminución de la aceleración sistólica, independientemente de otros factores como la resistencia y la capacidad de distensión vascular (Bude y Rubin 1999a). Esto debe tenerse en cuenta porque la forma de la onda Doppler de una arteria en concreto, en la que influye la aceleración sistólica, puede verse modificada tanto debido a enfermedad como debido a cambios en el lugar donde se realiza la medición. Así, los criterios que se aplican para detectar una enfermedad, basándose en cambios en la aceleración del flujo en un punto determinado del árbol arterial, no necesariamente son aplicables en otro punto (Halpern et al. 1995; Bude y Rubin 1999a).

## D.6 VASOS PERIFÉRICOS

### D.6.1 TRONCO BRAQUIOCEFÁLICO, ARTERIA CARÓTIDA COMÚN IZQUIERDA Y ARTERIA SUBCLAVIA IZQUIERDA

Como en el caso de la aorta ascendente y el arco aórtico, el abordaje ecográfico utilizado en las tres ramas del arco aórtico fue similar al que se ha utilizado en ecocardiografía transtorácica en el ratón (Tanaka et al. 1996; Zhou et al. 2004). Sin embargo, en estas arterias tampoco es posible estandarizar un protocolo ecográfico ya que por lo general, fue necesario estudiar diversos abordajes, obtener imágenes en cada uno de ellos y seleccionar, con posterioridad, el mejor.

El diámetro luminal de las tres ramas del arco aórtico es similar al descrito por otros autores, obtenidos mediante ecografía de alta frecuencia u otras técnicas como microCT o moldes de corrosión vasculares (Tabla 156) (Zhou et al. 2002; Feintuch et al. 2007; Maeda et al. 2007; Suo et al. 2007; Huo et al. 2008). Como sucede en la aorta, el área luminal de estos vasos no ha sido descrita hasta el momento utilizando ecografía transtorácica en el ratón.

TB (D,mm)	Cepa	Edad	Sexo	Anestesia	Técnica	Referencia
0,63±0,03	C57BL/6	3m	NE	NE	MicroCT; Doppler, 14MHz	Suo et al. 2007
0,85	C57BL/6	2m	M	Ketamina-Xylacina	Moldes corrosión; Doppler, 20MHz	Huo et al. 2008
<b>0,73±0,16</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>
ACCI (D, mm)						
0,49±0,05	C57BL/6	3m	NE	NE	MicroCT; Doppler, 14MHz	Suo et al. 2007
0,64	C57BL/6	2m	M	Ketamina-Xylacina	Moldes corrosión; Doppler, 20MHz	Huo et al. 2008
0,5±0,049	C57BL/6	2m	M/H	Isoflurano	Doppler, 40MHz	Zhou et al. 2002
<b>0,6±0,12</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>
ASCI (D, mm)						
0,56±0,02	C57BL/6	3m	NE	NE	MicroCT; Doppler, 14MHz	Suo et al. 2007
0,64	C57BL/6	2m	M	Ketamina-Xylacina	Moldes corrosión; Doppler, 20MHz	Huo et al. 2008
<b>0,56±0,1</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>2m</b>	<b>M/H</b>	<b>Isoflurano</b>	<b>Doppler, 30MHZ</b>	<b>Estudio actual</b>

Tabla 156. Diámetro del tronco braquiocefálico, arteria carótida común izquierda y arteria subclavia izquierda del ratón descritos en la bibliografía publicada hasta el momento. NE: no especificado; M macho; H: hembra; m: meses.

Debido a la trayectoria de estas arterias, que se dirigen hacia el cuello y la cabeza, el ángulo obtenido entre el haz de ultrasonidos y el vaso en los estudios Doppler es prácticamente perpendicular. Por este motivo, el ángulo de

insonación Doppler en cada una de estas ramas fue mayor a 60° en casi una cuarta parte de los animales.

A diferencia de lo que se observa en medicina humana, el perfil de velocidad de flujo en el TB en nuestro estudio fue mayoritariamente de tipo intermedio, no romo (Rautenberg y Hennerici 1988; Chavhan et al. 2008). La resistencia vascular observada es alta, al igual que en medicina humana ya que en ambas especies el TB es una arteria que irriga dos lechos vasculares distintos: uno de resistencia baja (el cerebral) y otro de resistencia alta (músculos del cuello y de las extremidades anteriores).

En la arteria carótida común izquierda, el perfil de velocidad de flujo observado es intermedio, al igual que en el hombre, aunque en este caso también puede ser romo. La resistencia de las arterias carótidas comunes humanas es intermedia o baja. Sin embargo, ocasionalmente también es posible observar flujos reversos en personas sanas (Taylor y Tukmachi 1985; Rohren et al. 2003; Yazici et al. 2005). En nuestro estudio, un 92,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia alta en la arteria carótida común izquierda y el 8,00% restante mostró resistencia intermedia. Este resultado no es sorprendente ya que el flujo de la arteria carótida común izquierda se registró colocando el volumen de muestra cerca de la salida del arco aórtico, por lo que se espera que el vaso tenga un flujo pulsátil similar al de la aorta ascendente. Es probable que si se midiera cerca de la bifurcación en arterias carótidas internas y externas fuese de tipo intermedio (Stoyanova et al. 2007). En el ratón, el mayor aporte sanguíneo al cerebro proviene de dos fuentes: las arterias carótidas internas, que irrigan las regiones corticales y subcorticales, y las arterias vertebrales, que aportan sangre a las arterias del tronco cerebral y del cerebelo así como a la arteria cerebral posterior. Las arterias vertebrales se originan a partir de las arterias subclavias y las arterias carótidas internas a partir de las carótidas comunes (Cook 1965; Dorr et al. 2007). La red arterial cerebral humana difiere en numerosos aspectos de la del ratón. En ambas especies las mismas arterias (carótidas internas y vertebrales) son el principal suministro de sangre del círculo de Willis. Sin embargo, la mayor complejidad del cerebro humano da lugar a un patrón arterial diferente (Dorr et al. 2007).

En medicina humana se considera que las arterias carótidas comunes tienen un perfil de velocidad de flujo y resistencia similar al de las carótidas

internas ya que el 80% de su flujo se dirige a estas arterias (Taylor y Tukmachi 1985; Rohren et al. 2003; Yazici et al. 2005). En el perro se han observado patrones de resistencia vascular similares a los del ratón. Se ha visto que la impedancia de entrada de las arterias carótidas internas es baja, como ocurre en humanos, y la impedancia de las arterias carótidas comunes alta. Las causas de estas diferencias pueden explicarse, en parte, por el peso relativo de los tejidos irrigados por cada vaso. El perro tiene mayor masa de tejido blando en la cabeza y en el cuello en relación a la masa del cerebro. El cerebro del perro representa sólo un 14% del tejido perfundido por estas arterias, al contrario de lo que ocurre en humanos. Además, del flujo cerebral total, aproximadamente dos tercios provienen de la arteria vertebral y un tercio de las arterias carótidas internas (Taylor y Tukmachi 1985). Sin embargo, aunque la arteria carótida interna transporta menos sangre por minuto que la externa, el flujo relativo por peso tisular es mayor en la arteria carótida interna que en la externa. Cuando en un circuito en paralelo hay dos impedancias diferentes, la impedancia quedará determinada principalmente por la menor, y será inferior a ella. Debido a las diferencias en la masa de tejido irrigado, la arteria carótida interna del perro tienen una impedancia mayor, en términos absolutos, que la externa, por lo que en consecuencia, la impedancia de entrada de la arteria carótida común quedará determinada por el patrón de impedancia de la arteria carótida externa, que es también de resistencia alta (Taylor y Tukmachi 1985). Esto explicaría por qué en las arterias carótidas comunes el patrón de resistencia se parecería más al de las arterias carótidas externas.

En el presente trabajo, todos los ratones tuvieron un perfil de velocidad de flujo intermedio en la arteria subclavia izquierda. En este vaso, un 68,00% de los ratones presentó ondas Doppler de resistencia alta y un 32,00% ondas de resistencia intermedia. En medicina humana, las arterias subclavias tienen un perfil de velocidad de flujo como con resistencia alta, ya que irrigan un lecho vascular de resistencia alta (Tola et al. 2003; Kalaria et al. 2005; Chavhan et al. 2008; Duan et al. 2008). Aunque, a diferencia de lo que sucede en la arteria femoral, la arteria subclavia izquierda está muy cerca del corazón y por tanto se esperaría un perfil de velocidad de flujo similar al de la aorta ascendente, la presencia de animales con flujos de resistencia intermedia podrían explicarse por los mismos motivos que los cambios observados en la arteria femoral

(efecto de la anestesia, posición del ratón durante el estudio, compresión vascular iatrogénica).

En cuanto a las variables hemodinámicas estudiadas mediante ecografía en cada una de las tres ramas del arco aórtico, no hay disponible información detallada para poder realizar comparaciones con otros estudios. La velocidad media y el flujo sanguíneo del tronco braquiocefálico en nuestro trabajo son superiores a los descritos por Huo et al. (2008) (velocidad media:  $268,36 \pm 82,90$  mm/s vs  $55$  mm/s respectivamente; flujo sanguíneo:  $119,14 \pm 43,29$  mm<sup>3</sup>/s vs  $31,16$  mm<sup>3</sup>/s, respectivamente), pero se debe recordar que, como se ha mencionado anteriormente, las técnicas utilizadas en ambos estudios son diferentes. En el estudio inferencial se han visto diferencias debidas al género en el índice de pulsatilidad en el tronco braquiocefálico. El hecho de que el PI sea estadísticamente mayor en las hembras puede deberse a que uno de los machos presentó flujo de resistencia intermedia en vez de alta en el TB, por lo que al realizar los cálculos, la ausencia de flujo reverso en este caso puede hacer disminuir el valor de PI.

La velocidad media de la sangre en la arteria carótida común izquierda en nuestro trabajo también es superior a la descrita por Huo et al. (2008) ( $191,70 \pm 58,34$  mm/s vs  $70$  mm/s, respectivamente). Lo mismo ocurre con el flujo sanguíneo ( $56,14 \pm 25,70$  mm<sup>3</sup>/s vs  $22,50$  mm<sup>3</sup>/s, respectivamente). Sin embargo, los valores de la velocidad sistólica máxima son inferiores a los descritos por Ni et al. (2008) ( $366,50 \pm 106,54$  mm/s vs  $660 \pm 90$  mm/s, respectivamente), que realizó los cálculos más cerca de la bifurcación que de la salida del arco aórtico, donde no se observa flujo reverso. En nuestro caso, como ya se ha comentado, el 92% de los ratones presentaba flujos de resistencia alta, por lo que la velocidad sistólica máxima será inferior (Delis et al. 2000). La misma explicación se aplica a la obtención de índices de pulsatilidad mayores a los descritos por (Stoyanova et al. 2007) ( $2,20 \pm 0,23$  vs  $0,832 \pm 0,007$ , respectivamente). El hecho de que el PI de las hembras sea mayor al de los machos, puede deberse a que se estudiaron más hembras que machos y el porcentaje de animales con resistencia intermedia es mayor en estos últimos.

Finalmente, la velocidad media en la arteria subclavia izquierda en nuestro trabajo es superior a la descrita por Huo et al. (2008) ( $210,42 \pm 62,09$

mm/s vs 55 mm/s, respectivamente). Lo mismo ocurre, como en los dos casos anteriores, con el flujo sanguíneo ( $53,70 \pm 21,58 \text{ mm}^3/\text{s}$  vs  $17,66 \text{ mm}^3/\text{s}$ , respectivamente).

#### **D.6.2 ARTERIA RENAL DERECHA**

Se estudió sólo una de las dos arterias renales en cada animal por diversos motivos. La duración total del estudio estaba limitada por la anestesia, por lo que examinar ambas arterias hubiera supuesto aumentar el tiempo de exploración y por tanto las posibles variaciones debidas a la anestesia. En otras especies no se han observado diferencias en las características hemodinámicas de ambas arterias renales, a no ser que exista una patología con afectación unilateral (Keogan et al. 1996). Se escogió la arteria renal derecha debido a que su abordaje es más complejo que el de la izquierda. De esta forma, al ser capaces de obtener toda la información requerida en el lado derecho es de suponer que también será posible obtenerlo en el izquierdo.

El abordaje a la arteria renal derecha del ratón es similar al que se utiliza para abordar el hilio renal o las glándulas adrenales en otras especies animales (d'Anjou 2008b; Graham 2008).

El diámetro medio de la arteria renal derecha obtenido en este estudio es similar al descrito por Huo et al. (2008) en moldes de corrosión vascular ( $0,51 \pm 0,12 \text{ mm}$  vs  $0,58 \text{ mm}$ , respectivamente). Actualmente no hay información disponible del área luminal de esta arteria medido mediante ecografía en ratones, por lo que no es posible realizar comparaciones.

En nuestro estudio la mayoría de los animales presentó un perfil de velocidad de flujo parabólico con resistencia baja. Un 14,80% de los ratones tuvo perfiles de resistencia intermedia, siendo todos ellos hembras. Al mismo tiempo, la velocidad diastólica mínima registrada en nuestro trabajo resultó ser significativamente menor en las hembras que en los machos, y los índices de resistencia vascular fueron mayores en las hembras. Los índices vasculares de la arteria renal del ratón obtenidos en este trabajo son más altos que los descritos en medicina humana (PI: 1,01-1,61 vs 0,7-1,4 ; RI: 0,67-0,89 vs 0,56-0,70 respectivamente) (Keogan et al. 1996; Chavhan et al. 2008; Wood et al. 2010).

Los ratones presentan dimorfismo sexual extragenital en cerebro, riñones y músculo esquelético (Bardin y Catterall 1981; Deschepper et al. 2004). En ratones CD1 se ha demostrado la existencia de dimorfismo sexual marcado en las glándulas adrenales, que afecta no sólo al peso y al tamaño de las glándulas, sino también a la secreción de corticosterona y aldosterona, hormonas esteroideas reguladas principalmente por la secreción de ACTH y por el eje renina-angiotensina y la concentración de potasio respectivamente. El dimorfismo en las concentraciones de corticosterona y de aldosterona también se ha descrito en ratas y humanos (Atkinson y Waddell 1997; Traustadottir et al. 2003) y se considera un factor importante al explicar las diferencias sexuales en la prevalencia de ciertas enfermedades asociadas al eje hipotálamo-pituitaria-adrenal, como las enfermedades cardiovasculares, diabetes e hipertensión (Bastida et al. 2007).

En ratones C57BL/6 no se han llevado a cabo estos estudios, pero es posible que se observen las mismas diferencias debidas al género. Una concentración mayor de aldosterona podría justificar las diferencias observadas en los índices vasculares de las arterias renales entre machos y hembras de este estudio.

En ratones se han descrito distintos sistemas para medir la presión arterial sistémica. La radiotelemedría de la presión sanguínea permite monitorizar con precisión la presión sistólica y diastólica, pero requiere implantación quirúrgica. Los métodos no invasivos para medir indirectamente la presión sistólica en ratones (*tail-cuff*) tienen una fiabilidad que depende del entrenamiento del ratón y del manipulador y, aunque los resultados de las medidas pueden ser similares a los obtenidos mediante telemetría, su reproducibilidad es menor (Krege et al. 1995; Li et al. 1999; Butz y Davisson 2001; Whitesall et al. 2004). En nuestro estudio no fue posible medir la presión arterial sistémica de los ratones al no disponer del material apropiado para hacerlo. Además, debido a las condiciones de estabulación, no es posible entrenar a los animales ni realizar medidas repetidas en el mismo ratón en días consecutivos. En ratones C57BL/6 conscientes en los que se han realizado estudios comparativos de la presión arterial sistólica sistémica, mediante un sistema no invasivo *tail-cuff* computerizado, se ha demostrado que existe dimorfismo sexual en esta variable según el género, siendo mayor la presión

arterial sistólica en hembras que en machos (Krege et al. 1995; Deschepper et al. 2004). Esta podría ser otra explicación para las diferencias observadas en nuestro estudio, sin embargo, también es posible que en ratones, al igual que ocurre en otras especies animales, no haya correlación entre el aumento de la presión arterial sistémica y la renal (Pontremoli et al. 1999; Galesic et al. 2000; Novellas et al. 2010).

Por lo que respecta a otras variables hemodinámicas objeto de estudio, la velocidad sistólica máxima y mínima son parecidas a las descritas por Bonnin et al. (2008), quien estudió ratones machos de 8 meses de edad con un transductor de 12MHz (PSV:  $552,38 \pm 255,64$  mm/s vs  $533 \pm 122$  mm/s; MDV:  $115,49 \pm 79,36$  mm/s vs  $157,7 \pm 38$  mm/s, respectivamente). El flujo sanguíneo en las arterias renales es mayor al descrito por Huo et al. (2008) ( $68,75 \pm 44,95$  mm<sup>3</sup>/s vs  $18,5$  mm<sup>3</sup>/s respectivamente).

## **D.7 IMPLICACIONES DE SIRT1 SOBRE LA MORFOLOGÍA CARDIACA**

SIRT1 es una proteína que se expresa en todas las células de los mamíferos y que fue inicialmente identificada como proteína nuclear. Sin embargo, en estudios recientes se ha demostrado que la localización subcelular de SIRT1 difiere según el tipo celular, pudiendo expresarse a nivel nuclear, citoplasmático o en ambos (Michishita et al. 2005; Rahman y Islam 2011). En el corazón, la localización de SIRT1 a nivel nuclear y citoplasmático se regula durante el desarrollo y cuando existe lesión cardiaca (Tanno et al. 2007; Tanno et al. 2010). Así por ejemplo, en el corazón de los embriones de ratón de 10,5 días se pueden encontrar niveles elevados de SIRT1 en el núcleo de los cardiomiocitos atriales y ventriculares. En los corazones de ratones adultos, SIRT1 se localiza sobre todo en el citoplasma, y se desplaza al núcleo en situaciones de daño cardiaco (Tanno et al. 2010). El desplazamiento de SIRT1 hacia el núcleo es fundamental para que ejerza su poder citoprotector contra el estrés oxidativo (Tanno et al. 2010).

En estudios previos en los que se ha analizado el efecto de la sobreexpresión de SIRT1 en los cardiomiocitos, se ha visto que esta proteína protege contra la muerte celular, aunque al mismo tiempo produce un aumento

generalizado del tamaño de los cardiomiocitos (Alcendor et al. 2004). Estos hallazgos se han visto reforzados por otros estudios en los que se han encontrado niveles aumentados de SIRT1 en corazones hipertrofiados o con fallo cardiaco (Vahtola et al. 2008; Li et al. 2009; Li et al. 2011a). Otros estudios realizados con ratones transgénicos para *Sirt1* indican que SIRT1 exhibe hormesis, es decir, según la magnitud de su expresión puede ser una proteína beneficiosa o todo lo contrario. Así, la expresión baja o moderada de *Sirt1* actúa de forma protectora contra la hipertrofia cardiaca, apoptosis y fallo cardiaco ligado a la edad, mientras que una expresión elevada de *Sirt1* induce dilatación, hipertrofia y fallo cardiaco (Alcendor et al. 2007; Kawashima et al. 2011).

Estos resultados indican que SIRT1 es una molécula importante en el desarrollo y en la supervivencia de los cardiomiocitos y que su expresión debe ser controlada de forma minuciosa para obtener los efectos deseables.

Hasta el momento no se han publicado estudios que describan el fenotipo cardiaco de los ratones adultos mutantes homocigotos para *Sirt1*. Sundaresan et al. (2011) menciona, basándose en datos aún no publicados, que los ratones KO homocigotos para *Sirt1* tienen el corazón más pequeño que sus hermanos silvestres y que son resistentes al desarrollo de hipertrofia cardiaca inducida por agonistas de la hipertrofia. Esto concuerda con otros resultados en los que se describe el efecto protector de SIRT1 contra la hipertrofia cardiaca (Planavila et al. 2011).

La cardiomiopatía hipertrófica se caracteriza por la presencia de hipertrofia cardiaca patológica del ventrículo izquierdo y/o derecho, que suele englobar el septo interventricular. Generalmente, el volumen del ventrículo izquierdo es normal o está disminuido. Los cambios morfológicos que se observan en esta patología incluyen hipertrofia de los cardiomiocitos, presencia de desorden en la distribución de las miofibrillas de los cardiomiocitos (*myofibrillar disarray*) y fibrosis cardiaca (Richardson et al. 1996). Generalmente, la función sistólica se conserva o puede incluso verse potenciada. Sin embargo, la relajación ventricular se altera debido a que las paredes ventriculares están engrosadas y fibróticas (Richardson et al. 1996; Thiene et al. 2005).

La cardiomiopatía dilatada se caracteriza por dilatación del ventrículo izquierdo o de ambos ventrículos, acompañada de una contracción cardiaca ineficaz. Se trata de la cardiomiopatía más frecuente en humanos, en los que se han descrito diversas etiologías: idiopática, familiar/genética, vírica, inmune, tóxica o asociada a otras enfermedades cardiovasculares (problemas isquémicos, de sobrecarga cardiaca u otros). Las características histológicas de la cardiomiopatía dilatada son inespecíficas (Richardson et al. 1996), por lo que su diagnóstico se establece por la presencia de los signos siguientes (Cheitlin et al. 1997; Recchia y Lionetti 2007):

- Aumento de tamaño del ventrículo izquierdo. Este cambio se evalúa generalmente *in vivo* mediante ecocardiografía bidimensional y con modo-M.
- Disfunción sistólica, que consiste en una reducción de la fuerza de contracción del miocardio. La medida de disfunción sistólica más usada en clínica es la fracción de eyección del ventrículo izquierdo, que suele obtenerse mediante ecocardiografía bidimensional o mediante otros estudios no invasivos, como resonancia magnética o medicina nuclear. Una fracción de eyección menor al 50% se considera compatible con disfunción sistólica. Otro parámetro clínico útil para evaluar la función sistólica es la fracción de acortamiento. Una fracción de acortamiento menor a 25-30% es compatible con disfunción sistólica.

En nuestro estudio, hemos observado que los ratones adultos mutantes para *Sirt1* presentan cardiomegalia, dilatación de las cavidades ventriculares y adelgazamiento de las paredes de los ventrículos y del septo interventricular. Esto, acompañado de los resultados del estudio morfométrico, en el que se vio que los ratones mutantes adultos para *Sirt1* no presentan hipertrofia en los cardiomiocitos, descarta la presencia de hipertrofia cardiaca. Por el contrario, los resultados obtenidos parecen indicar que los ratones mutantes adultos presentan dilatación cardiaca, que no es secundaria a otros procesos como hipertensión pulmonar o valvulopatía. Sin embargo, una de las limitaciones de este estudio es la falta de pruebas de funcionalidad cardiaca que pudieran demostrar la existencia de alteración sistólica y el posible fallo cardiaco asociado. Esto se debe a que, en la instalación donde se realizaron los estudios, no está permitido introducir animales vivos de origen externo, por lo

que no es posible hacer un estudio ecográfico de los corazones de los ratones mutantes para *Sirt1*. El uso de resonancia magnética de alto campo en la evaluación morfológica y funcional del corazón del ratón ha sido descrita con anterioridad por otros autores (Berr et al. 2005; Schneider et al. 2006; Epstein 2007; Stuckey et al. 2008). En este caso, es necesario obtener las secuencias con *gating* fisiológico, tanto respiratorio como cardiaco, para evitar la aparición de artefactos o de errores en el cálculo de los parámetros funcionales. En nuestro caso, tampoco fue posible hacer un estudio cardiaco funcional mediante MRI porque la sincronización con el electrocardiograma no estaba puesta a punto en el momento de hacer el estudio. Además, debido a la esperanza de vida corta de los ratones mutantes para *Sirt1*, no fue posible posponer los exámenes con MRI.

Por este motivo, se ha evaluado otra variable, la relación h/R, que se ha usado en la diferenciación entre cardiomiopatía hipertrófica y dilatada. En el caso de la hipertrofia cardiaca, cuando ésta es secundaria a una sobrecarga de presión, se observa engrosamiento de la pared ventricular e hipertrofia concéntrica, y la relación h/R aumenta. Cuando la hipertrofia del corazón es debida a una sobrecarga de volumen, se observa un agrandamiento de las cavidades ventriculares e hipertrofia excéntrica, y la relación h/R se mantiene normal, ya que se produce un agrandamiento similar de la cavidad y de la pared (Grossman et al. 1975; Muhl et al. 2008). En cambio, cuando existe cardiomiopatía dilatada, la relación h/R disminuye ya que se produce un agrandamiento de las cavidades ventriculares y un adelgazamiento de la pared (Douglas et al. 1987).

En nuestro estudio, las diferencias observadas en los resultados morfológicos y en el valor de la relación h/R entre ratones silvestres y ratones mutantes para *Sirt1* indican el efecto protector de SIRT1 sobre la dilatación cardíaca.

El estudio histológico descarta la existencia de fibrosis cardiaca, que puede observarse en casos de apoptosis y de necrosis de miocardio. Por otro lado, el estudio inmunohistoquímico con el marcador de estrés cardiaco ANP, demuestra la expresión de esta proteína en el miocardio de los ventrículos de los ratones mutantes para *Sirt1*.

En el estudio ultraestructural de los cardiomiocitos se han observado alteraciones en las mitocondrias de los ratones mutantes adultos. Esta alteración mitocondrial también ha sido descrita por Lee et al. (2008). Este hallazgo podría explicar la aparición de la dilatación cardiaca ya que estudios recientes en ratones (Li et al. 2001) han demostrado que alteraciones mitocondriales, y en concreto, mutaciones en el DNA mitocondrial (mtDNA), pueden contribuir al desarrollo de cardiomiopatía dilatada.

El corazón es un órgano que, debido a su actividad contráctil, necesita oxígeno y nutrientes de forma continua para producir energía y, de esta forma, mantener el ciclo cardiaco. El factor limitante para que el corazón funcione es el oxígeno, ya que las reservas intracelulares de oxígeno solo pueden mantener el corazón latiendo unos segundos y las reservas de carbohidratos y de lípidos sólo pueden mantener la contractilidad cardiaca durante una hora aproximadamente. Por lo tanto, el metabolismo del corazón es de tipo aeróbico, y es muy dependiente de la disponibilidad de oxígeno, como lo confirma la abundancia de mitocondrias en los cardiomiocitos (un 30% del volumen total). Las elevadas necesidades energéticas del corazón son cubiertas casi en su totalidad por fosforilación oxidativa mitocondrial. Esto explica la elevada sensibilidad de las células cardiacas a los déficits de oxígeno y la importancia que tienen las mitocondrias en el daño tisular del miocardio (Ferrari 2002).

En medicina humana se han descrito las cardiomiopatías mitocondriales (Marian y Roberts 1994), en las que se observa cardiomiopatía dilatada y/o hipertrófica debida a mutaciones en el DNA mitocondrial. Estas patologías, que tienen transmisión materna, suelen ir acompañadas de otros procesos sistémicos y suelen producir la muerte de los individuos afectados a edad temprana. Por otro lado, también se ha observado que la respiración mitocondrial en el miocardio de individuos con fallo cardiaco está alterada, por lo que la producción de energía, vía fosforilación oxidativa, está disminuida en estos pacientes (Sharov et al. 2000).

Li et al. (2001) estudiaron los mecanismos de reparación del mtDNA, el daño en el mtDNA y la estructura y función de las mitocondrias en un ratón con fallo cardiaco secundario a sobreexpresión de factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Los resultados de su estudio demuestran que mutaciones en el mtDNA y alteraciones estructurales y funcionales de las mitocondrias se

asocian a una reducción en la reparación del mtDNA, y que parte de los efectos fisiopatológicos de TNF- $\alpha$  en el corazón pueden estar mediados por cambios en las mitocondrias. Los cambios ultraestructurales encontrados en su modelo animal son parecidos a los observados en este estudio (mitocondrias con forma irregular, disminución del número de crestas y desorganización y rotura de las mismas). Es posible que en el caso de los ratones mutantes para *Sirt1*, el daño mitocondrial sea también responsable del desarrollo de cardiomiopatía dilatada. Será necesario realizar más estudios para conocer la relación entre ambos procesos.



## **E. CONCLUSIONES**



## CONCLUSIONES

1. La ecografía de alta frecuencia es un método útil para estudiar la morfología y las características hemodinámicas de la aorta y de sus ramas principales en el ratón C57BL/6 adulto.
2. En el ratón C57BL/6 el diámetro, área luminal, velocidad sistólica máxima y media, aceleración, índices vasculares y flujo sanguíneo de la aorta disminuyen en sentido caudal.
3. El perfil de velocidad de flujo de la aorta en el ratón C57BL/6 adulto evoluciona de romo a intermedio en sentido caudal. La resistencia vascular de la aorta en el tórax es alta y en el abdomen es intermedia.
4. En el ratón C57BL/6 adulto el perfil de velocidad de flujo de las tres ramas del arco aórtico es mayoritariamente intermedio de resistencia alta, mientras que en la arteria renal y en la arteria femoral, es mayoritariamente parabólico de resistencia baja.
5. Los valores de referencia de los parámetros hemodinámicos arteriales del ratón deben establecerse en relación al sexo y al peso de los individuos.
6. La aorta descendente abdominal del ratón C57BL/6 es de tipo elástica y la arteria femoral es muscular. El número de unidades lamelares de la túnica media de la aorta disminuye caudalmente. La túnica adventicia en la aorta descendente abdominal de localización postrenal es, en proporción, más grande que en la aorta descendente abdominal de localización prerrenal y preiliaca.
7. Los ratones adultos mutantes para *Sirt1* presentan cardiomegalia, dilatación de las cavidades ventriculares y adelgazamiento de las paredes ventriculares y del septo interventricular.
8. Los resultados del cálculo de la relación h/R, obtenidos *in vivo* mediante MRI, confirman la dilatación de las cavidades y el adelgazamiento de las paredes ventriculares en los ratones adultos mutantes para *Sirt1*.
9. El área de los cardiomiocitos de los ratones adultos silvestres varía según la región miocárdica examinada (pared del ventrículo derecho, pared del ventrículo izquierdo o septo interventricular) y según la zona examinada dentro de cada región (basal, intermedia o apical).

## CONCLUSIONES

10. El área de los cardiomiocitos ventriculares y del septo es menor en los ratones mutantes para *Sirt1*, lo que demuestra que no están hipertrofiados.

11. No se ha detectado fibrosis, ni infiltración macrofágica en el miocardio ventricular de los ratones adultos mutantes para *Sirt1*.

12. ANP se expresa en el miocardio ventricular de los ratones adultos mutantes para *Sirt1*, indicando lesión miocárdica.

13. Las mitocondrias de los cardiomiocitos de los ratones adultos mutantes *Sirt1* están dilatadas y presentan destrucción parcial de sus crestas.

14. No se ha observado dilatación de las cavidades, ni adelgazamiento de las paredes de los ratones recién nacidos (P0) mutantes *Sirt1*.

15. No se ha detectado lesión mitocondrial en los cardiomiocitos de los ratones P0 mutantes para *Sirt1*.

## **F. BIBLIOGRAFÍA**



## BIBLIOGRAFÍA

ALCENDOR R. R., GAO S., ZHAI P., ZABLOCKI D., HOLLE E., YU X., TIAN B., WAGNER T., VATNER S. F. & SADOSHIMA J. (2007) *Sirt1* regulates aging and resistance to oxidative stress in the heart. *Circulation Research* 100, 1512-1521

ALCENDOR R. R., KIRSHENBAUM L. A., IMAI S., VATNER S. F. & SADOSHIMA J. (2004) Silent information regulator 2 $\alpha$ , a longevity factor and class III histone deacetylase, is an essential endogenous apoptosis inhibitor in cardiac myocytes. *Circulation Research* 95, 971-980

AMIRBEKIAN S., LONG R. C., JR, CONSOLINI M. A., SUO J., WILLETT N. J., FIELDEN S. W., GIDDENS D. P., TAYLOR W. R. & OSHINSKI J. N. (2009) In vivo assessment of blood flow patterns in abdominal aorta of mice with MRI: Implications for AAA localization. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 297, H1290-5

ASHER G., GATFIELD D., STRATMANN M., REINKE H., DIBNER C., KREPPEL F., MOSTOSLAVSKY R., ALT F. W. & SCHIBLER U. (2008) SIRT1 regulates circadian clock gene expression through PER2 deacetylation. *Cell* 134, 317-328

ATKINSON H. C. & WADDELL B. J. (1997) Circadian variation in basal plasma corticosterone and adrenocorticotropin in the rat: Sexual dimorphism and changes across the estrous cycle. *Endocrinology* 138, 3842-3848

BARDIN C. W. & CATTERALL J. F. (1981) Testosterone: A major determinant of extragenital sexual dimorphism. *Science (New York, N.Y.)* 211, 1285-1294

BARISIONE C., CHARNIGO R., HOWATT D. A., MOORLEGHEN J. J., RATERI D. L. & DAUGHERTY A. (2006) Rapid dilation of the abdominal aorta during infusion of angiotensin II detected by noninvasive high-frequency ultrasonography. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 44, 372-376

## BIBLIOGRAFÍA

BASTIDA C. M., CREMADES A., CASTELLS M. T., LOPEZ-CONTRERAS A. J., LOPEZ-GARCIA C., SANCHEZ-MAS J. & PEÑAFIEL R. (2007) Sexual dimorphism of ornithine decarboxylase in the mouse adrenal: Influence of polyamine deprivation on catecholamine and corticoid levels. *American Journal of Physiology. Endocrinology and Metabolism* 292, E1010-7

BAUMANN P. Q., SOBEL B. E., TARIKUZ ZAMAN A. K. & SCHNEIDER D. J. (2008) Gender-dependent differences in echocardiographic characteristics of murine hearts. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 25, 739-748

BEACONSFIELD P. & GINSBURG J. (1955) Effect of changes in limb posture on peripheral blood flow. *Circulation Research* 3, 478-482

BERR S. S., ROY R. J., FRENCH B. A., YANG Z., GILSON W., KRAMER C. M. & EPSTEIN F. H. (2005) Black blood gradient echo cine magnetic resonance imaging of the mouse heart. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine* 53, 1074-1079

BLACKSHEAR W. M., PHILLIPS D. J., CHIKOS P. M., HARLEY J. D., THIELE B. L. & STRANDNESS D. E.,JR. (1980) Carotid artery velocity patterns in normal and stenotic vessels. *Stroke: a Journal of Cerebral Circulation* 11, 67-71

BOGREN H. G. & BUONOCORE M. H. (1994) Blood flow measurements in the aorta and major arteries with MR velocity mapping. *Journal of Magnetic Resonance Imaging: JMRI* 4, 119-130

BONNIN P. & FRESSONNET R. (2005) Principles of hemodynamics and sonographic techniques for the evaluation of arteries. *Journal De Radiologie* 86, 615-627

BONNIN P., SABAA N., FLAMANT M., DEBBABI H. & THARAUX P. L. (2008) Ultrasound imaging of renal vaso-occlusive events in transgenic sickle mice exposed to hypoxic stress. *Ultrasound in Medicine & Biology* 34, 1076-1084

BONTHU S., HEISTAD D. D., CHAPPELL D. A., LAMPING K. G. & FARACI F. M. (1997) Atherosclerosis, vascular remodeling, and impairment of

endothelium-dependent relaxation in genetically altered hyperlipidemic mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17, 2333-2340

BORGARELLI M., TARDUCCI A., ZANATTA R. & HAGGSTROM J. (2007) Decreased systolic function and inadequate hypertrophy in large and small breed dogs with chronic mitral valve insufficiency. *Journal of Veterinary Internal Medicine/American College of Veterinary Internal Medicine* 21, 61-67

BRESLOW J. L. (1996) Mouse models of atherosclerosis. *Science (New York, N.Y.)* 272, 685-688

BUDE R. O. & RUBIN J. M. (1999a) Effect of downstream cross-sectional area of an arterial bed on the resistive index and the early systolic acceleration. *Radiology* 212, 732-738

BUDE R. O. & RUBIN J. M. (1999b) Relationship between the resistive index and vascular compliance and resistance. *Radiology* 211, 411-417

BUDE R. O., RUBIN J. M., PLATT J. F., FECHNER K. P. & ADLER R. S. (1994) Pulsus tardus: Its cause and potential limitations in detection of arterial stenosis. *Radiology* 190, 779-784

BUTZ G. M. & DAVISSON R. L. (2001) Long-term telemetric measurement of cardiovascular parameters in awake mice: A physiological genomics tool. *Physiological Genomics* 5, 89-97

CAMPBELL S., DIAZ-RECASENS J., GRIFFIN D. R., COHEN-OVERBEEK T. E., PEARCE J. M., WILLSON K. & TEAGUE M. J. (1983) New Doppler technique for assessing uteroplacental blood flow. *Lancet* 1, 675-677

CAMPBELL S. E., KORECKY B. & RAKUSAN K. (1991) Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. *Circulation Research* 68, 984-996

CARLSON S. H. & WYSS J. M. (2000) Long-term telemetric recording of arterial pressure and heart rate in mice fed basal and high NaCl diets. *Hypertension* 35, E1-5

CASTELEYN C., TRACHET B., VAN LOO D., DEVOS D. G., VAN DEN BROECK W., SIMOENS P. & CORNILLIE P. (2010) Validation of the murine aortic arch as a model to study human vascular diseases. *Journal of Anatomy* 216, 563-571

CHALOTHORN D. & FABER J. E. (2010) Strain-dependent variation in collateral circulatory function in mouse hindlimb. *Physiological Genomics* 42, 469-479

CHAVES A. A., WEINSTEIN D. M. & BAUER J. A. (2001) Non-invasive echocardiographic studies in mice: Influence of anesthetic regimen. *Life Sciences* 69, 213-222

CHAVHAN G. B., PARRA D. A., MANN A. & NAVARRO O. M. (2008) Normal Doppler spectral waveforms of major pediatric vessels: Specific patterns. *Radiographics : A Review Publication of the Radiological Society of North America, Inc* 28, 691-706

CHEITLIN M. D., ALPERT J. S., ARMSTRONG W. F., AURIGEMMA G. P., BELLER G. A., BIERMAN F. Z., DAVIDSON T. W., DAVIS J. L., DOUGLAS P. S. & GILLAM L. D. (1997) ACC/AHA guidelines for the clinical application of echocardiography. A report of the american college of Cardiology/American heart association task force on practice guidelines (committee on clinical application of echocardiography). *Circulation* 95, 1686-1744

CHENG H. L., MOSTOSLAVSKY R., SAITO S., MANIS J. P., GU Y., PATEL P., BRONSON R., APPELLA E., ALT F. W. & CHUA K. F. (2003) Developmental defects and p53 hyperacetylation in Sir2 homolog (SIRT1)-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 10794-10799

CHIOU A. C., CHIU B., OPPAT W. F., MATSUMURA J. S., CHISHOLM R. L. & PEARCE W. H. (2000) Transrectal ultrasound assessment of murine aorta and iliac arteries. *The Journal of Surgical Research* 88, 193-199

CHIRINOS J. A. & SEGERS P. (2010) Noninvasive evaluation of left ventricular afterload: Part 1: Pressure and flow measurements and basic principles of wave conduction and reflection. *Hypertension* 56, 555-562

CHOUHDURY R. P., AGUINALDO J. G., RONG J. X., KULAK J. L., KULAK A. R., REIS E. D., FALLON J. T., FUSTER V., FISHER E. A. & FAYAD Z. A. (2002) Atherosclerotic lesions in genetically modified mice quantified in vivo by non-invasive high-resolution magnetic resonance microscopy. *Atherosclerosis* 162, 315-321

CHOW L. H., HUH S., JIANG J., ZHONG R. & PICKERING J. G. (1996) Intimal thickening develops without humoral immunity in a mouse aortic allograft model of chronic vascular rejection. *Circulation* 94, 3079-3082

CLERICO A., GIANNONI A., VITTORINI S. & PASSINO C. (2011) Thirty years of the heart as an endocrine organ: Physiological role and clinical utility of cardiac natriuretic hormones. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 301, H12-20

COATNEY R. W. (2001) Ultrasound imaging: Principles and applications in rodent research. *ILAR Journal / National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 42, 233-247

COLLINS K. A., KORCARZ C. E. & LANG R. M. (2003) Use of echocardiography for the phenotypic assessment of genetically altered mice. *Physiological Genomics* 13, 227-239

CONTRERAS S., VAZQUEZ J. M., MIGUEL A. D., MORALES M., GIL F., LOPEZ O. & ARENCIBIA A. (2008) Magnetic resonance angiography of the normal canine heart and associated blood vessels. *Veterinary Journal (London, England : 1997)* 178, 130-132

CONTRERAS S., VAZQUEZ J. M., MORALES M., RIVERO M. A., GIL F., LATORRE R. & ARENCIBIA A. (2010) Three-dimensional MRA study of the normal canine thorax: MIP sections and volume rendering. *Anatomia, Histologia, Embryologia*

CONWAY R. M., CHEW T., GOLCHET P., DESAI K., LIN S. & O'BRIEN J. (2005) Ultrasound biomicroscopy: Role in diagnosis and management in 130 consecutive patients evaluated for anterior segment tumours. *The British Journal of Ophthalmology* 89, 950-955

COOK M. J. (1965) *The anatomy of the laboratory mouse*. London, UK, Academic Press INC

DA SILVA E. S., RODRIGUES A. J., JR, CASTRO DE TOLOSA E. M., BUENO PEREIRA P. R., ZANOTO A. & MARTINS J. (1999) Variation of infrarenal aortic diameter: A necropsy study. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 29, 920-927

DAIMON M., WATANABE H., ABE Y., HIRATA K., HOZUMI T., ISHII K., ITO H., IWAKURA K., IZUMI C., MATSUZAKI M., MINAGOE S., ABE H., MURATA K., NAKATANI S., NEGISHI K., YOSHIDA K., TANABE K., TANAKA N., TOKAI K., YOSHIKAWA J. & JAMP STUDY INVESTIGATORS. (2008) Normal values of echocardiographic parameters in relation to age in a healthy Japanese population: The JAMP study. *Circulation Journal : Official Journal of the Japanese Circulation Society* 72, 1859-1866

D'ANJOU M. A. (2008a) Abdominal cavity, lymph nodes, and great vessels. In *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. 1st edn. Eds D. Pennick, M. A. d'Anjou. USA, Blackwell Publishing. pp 445

D'ANJOU M. A. (2008b) Kidneys and ureters. In *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. 1st edn. Eds D. Pennick, M. A. d'Anjou. Iowa, USA, Blackwell Publishing. pp 339

DAUGHERTY A. (2002) Mouse models of atherosclerosis. *The American Journal of the Medical Sciences* 323, 3-10

DAUGHERTY A. & CASSIS L. A. (2004) Mouse models of abdominal aortic aneurysms. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 24, 429-434

## BIBLIOGRAFÍA

DE BOLD A. J. (1985) Atrial natriuretic factor: A hormone produced by the heart. *Science* (New York, N.Y.) 230, 767-770

DE GARIS C. F., BLACK I. H. & RIEMENSCHNEIDER E. A. (1933) Patterns of the aortic arch in american white and negro stocks, with comparative notes on certain other mammals. *Journal of Anatomy* 67, 599-619

DE SMET A. A., ERMERS E. J. & KITSLAAR P. J. (1996) Duplex velocity characteristics of aortoiliac stenoses. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 23, 628-636

DELIS K. T., NICOLAIDES A. N. & STANSBY G. (2000) Effect of posture on popliteal artery hemodynamics. *Archives of Surgery* (Chicago, Ill.: 1960) 135, 265-269

DENU J. M. (2003) Linking chromatin function with metabolic networks: Sir2 family of NAD(+)-dependent deacetylases. *Trends in Biochemical Sciences* 28, 41-48

DESCHEPPER C. F., OLSON J. L., OTIS M. & GALLO-PAYET N. (2004) Characterization of blood pressure and morphological traits in cardiovascular-related organs in 13 different inbred mouse strains. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 97, 369-376

DOEVENDANS P. A., DAEMEN M. J., DE MUINCK E. D. & SMITS J. F. (1998) Cardiovascular phenotyping in mice. *Cardiovascular Research* 39, 34-49

DORR A., SLED J. G. & KABANI N. (2007) Three-dimensional cerebral vasculature of the CBA mouse brain: A magnetic resonance imaging and micro computed tomography study. *NeuroImage* 35, 1409-1423

DOUGLAS P. S., REICHEK N., HACKNEY K., IOLI A. & SUTTON M. G. (1987) Contribution of afterload, hypertrophy and geometry to left ventricular ejection fraction in aortic valve stenosis, pure aortic regurgitation and idiopathic dilated cardiomyopathy. *The American Journal of Cardiology* 59, 1398-1404

DUAN Y. Y., YUAN L. J., DING K., LIU X., LV F. Q. & CAO T. S. (2008) "Tardus and parvus" phenomenon in upper limb arteries for identifying subclavian arterial stenosis. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 25, 504-510

EGER E. I., 2ND. (1984) The pharmacology of isoflurane. *British Journal of Anaesthesia* 56 Suppl 1, 71S-99S

EPSTEIN F. H. (2007) MR in mouse models of cardiac disease. *NMR in Biomedicine* 20, 238-255

EURELL J. A. & FRAPPIER B. L. (2006) *Dellmann's textbook of veterinary histology*. 6th edn. Oxford, UK, Blackwell Publishing Ltd

EVANS H. E. (1993) The heart and arteries. In *Miller's Anatomy of the Dog*. 3th edn. Ed H. E. Evans. Philadelphia, USA, Saunders Elsevier. pp 586-681

EVANS D. H., BARRIE W. W., ASHER M. J., BENTLEY S. & BELL P. R. (1980) The relationship between ultrasonic pulsatility index and proximal arterial stenosis in a canine model. *Circulation Research* 46, 470-475

FABRIZIO P., GATTAZZO C., BATTISTELLA L., WEI M., CHENG C., MCGREW K. & LONGO V. D. (2005) Sir2 blocks extreme life-span extension. *Cell* 123, 655-667

FARACI F. M. & SIGMUND C. D. (1999) Vascular biology in genetically altered mice: Smaller vessels, bigger insight. *Circulation Research* 85, 1214-1225

FEINTUCH A., RUENGSAKULRACH P., LIN A., ZHANG J., ZHOU Y. Q., BISHOP J., DAVIDSON L., COURTMAN D., FOSTER F. S., STEINMAN D. A., HENKELMAN R. M. & ETHIER C. R. (2007) Hemodynamics in the mouse aortic arch as assessed by MRI, ultrasound, and numerical modeling. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 292, H884-92

FENTZKE R. C., KORCARZ C. E., SHROFF S. G., LIN H., SANDELSKI J., LEIDEN J. M. & LANG R. M. (1997) Evaluation of ventricular and arterial hemodynamics in anesthetized closed-chest mice. *Journal of the American*

Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography 10, 915-925

FERNANDEZ B., DURAN A. C., FERNANDEZ M. C., FERNANDEZ-GALLEGO T., ICARDO J. M. & SANS-COMA V. (2008) The coronary arteries of the C57BL/6 mouse strains: Implications for comparison with mutant models. *Journal of Anatomy* 212, 12-18

FERRARI R. (2002) Healthy versus sick myocytes: Metabolism, structure and function. *European Heart Journal Supplements* 4, G1-G12

FINN-BODNER S. T. & HUDSON J. A. (1998) Abdominal vascular sonography. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 28, 887-942

FOSTER F. S., ZHANG M. Y., ZHOU Y. Q., LIU G., MEHI J., CHERIN E., HARASIEWICZ K. A., STARKOSKI B. G., ZAN L., KNAPIK D. A. & ADAMSON S. L. (2002) A new ultrasound instrument for in vivo microimaging of mice. *Ultrasound in Medicine & Biology* 28, 1165-1172

FOX J. G., STEPHEN W. B., DAVISSON M. T., NEWCOMER C. E., QUIMBY F. W. & SMITH A. L. (2007) *The mouse in biomedical research*. 2nd edn. US, Elsevier

FRYE R. A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 273, 793-798

FULCO M., CEN Y., ZHAO P., HOFFMAN E. P., MCBURNEY M. W., SAUVE A. A. & SARTORELLI V. (2008) Glucose restriction inhibits skeletal myoblast differentiation by activating SIRT1 through AMPK-mediated regulation of Nampt. *Developmental Cell* 14, 661-673

GALESIC K., BRKLJACIC B., SABLJAR-MATOVINOVIC M., MOROVIC-VERGLES J., CVITKOVIC-KUZMIC A. & BOZIKOV V. (2000) Renal vascular resistance in essential hypertension: Duplex-Doppler ultrasonographic evaluation. *Angiology* 51, 667-675

## BIBLIOGRAFÍA

GAN L. M., GRONROS J., HAGG U., WIKSTROM J., THEODOROPOULOS C., FRIBERG P. & FRITSCHÉ-DANIELSON R. (2007) Non-invasive real-time imaging of atherosclerosis in mice using ultrasound biomicroscopy. *Atherosclerosis* 190, 313-320

GANONG W. F. (2005) Circulation through special regions. In *Review of Medical Physiology*. 22nd edn. USA, McGraw-Hill. pp 611

GARCIER J. M., PETITCOLIN V., FILAIRE M., MOFID R., AZARNOUCH K., RAVEL A., VANNEUVILLE G. & BOYER L. (2003) Normal diameter of the thoracic aorta in adults: A magnetic resonance imaging study. *Surgical and Radiologic Anatomy* : SRA 25, 322-329

GASKELL P. & BURTON A. C. (1953) Local postural vasomotor reflexes arising from the limb veins. *Circulation Research* 1, 27-39

GASSER S. M. (2001) Positions of potential: Nuclear organization and gene expression. *Cell* 104, 639-642

GASSER S. M. & COCKELL M. M. (2001) The molecular biology of the SIR proteins. *Gene* 279, 1-16

GATEHOUSE P. D., KEEGAN J., CROWE L. A., MASOOD S., MOHIADDIN R. H., KREITNER K. F. & FIRMIN D. N. (2005) Applications of phase-contrast flow and velocity imaging in cardiovascular MRI. *European Radiology* 15, 2172-2184

GOERGEN C. J., BARR K. N., HUYNH D. T., EASTHAM-ANDERSON J. R., CHOI G., HEDEHUS M., DALMAN R. L., CONNOLLY A. J., TAYLOR C. A., TSAO P. S. & GREVE J. M. (2010) In vivo quantification of murine aortic cyclic strain, motion, and curvature: Implications for abdominal aortic aneurysm growth. *Journal of Magnetic Resonance Imaging* : JMRI 32, 847-858

GRAHAM J. (2008) Adrenal gland. In *Atlas of Small Animal Ultrasonography*. 1st edn. Eds D. Pennick, M. A. d'Anjou, USA, Blackwell Publishing. pp 385

GREEN E. L. (1968) *Biology of the laboratory mouse*. 2nd edn. New York, Dover Publications, INC.

GRENADIER E., OLIVEIRA LIMA C., ALLEN H. D., SAHN D. J., VARGAS BARRON J., VALDES-CRUZ L. M. & GOLDBERG S. J. (1984) Normal intracardiac and great vessel Doppler flow velocities in infants and children. *Journal of the American College of Cardiology* 4, 343-350

GRIMSHAW G. M. & THOMPSON J. M. (1997) Changes in diameter of the abdominal aorta with age: An epidemiological study. *Journal of Clinical Ultrasound* : JCU 25, 7-13

GROSS V., LIPPOLDT A., BOHLENDER J., BADER M., HANSSON A. & LUFT F. C. (1998) Cortical and medullary hemodynamics in deoxycorticosterone acetate-salt hypertensive mice. *Journal of the American Society of Nephrology* : JASN 9, 346-354

GROSSMAN W., JONES D. & MCLAURIN L. P. (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *The Journal of Clinical Investigation* 56, 56-64

GRUNSTEIN M. (1998) Yeast heterochromatin: Regulation of its assembly and inheritance by histones. *Cell* 93, 325-328

GYETVAI T. & KOLOZSVARI L. (2005) Ultrasound biomicroscopy examination of tumors of the iris and ciliary body. *Magyar Onkologia* 49, 43-46

HAIGIS M. C. & SINCLAIR D. A. (2010) Mammalian sirtuins: Biological insights and disease relevance. *Annual Review of Pathology* 5, 253-295

HALPERN E. J., DEANE C. R., NEEDLEMAN L., MERTON D. A. & EAST S. A. (1995) Normal renal artery spectral Doppler waveform: A closer look. *Radiology* 196, 667-673

HARTLEY C. J., REDDY A. K., MADALA S., MARTIN-MCNULTY B., VERGONA R., SULLIVAN M. E., HALKS-MILLER M., TAFFET G. E., MICHAEL L. H., ENTMAN M. L. & WANG Y. X. (2000) Hemodynamic changes in apolipoprotein E-knockout mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 279, H2326-34

HARTLEY C. J., TAFFET G. E., REDDY A. K., ENTMAN M. L. & MICHAEL L. H. (2002) Noninvasive cardiovascular phenotyping in mice. *ILAR Journal/National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources* 43, 147-158

HERRANZ D. & SERRANO M. (2010) Impact of Sirt1 on mammalian aging. *Aging* 2, 315-316

HIRSCH A. T., HASKAL Z. J., HERTZER N. R., BAKAL C. W., CREAGER M. A., HALPERIN J. L., HIRATZKA L. F., MURPHY W. R., OLIN J. W., PUSCHETT J. B., ROSENFELD K. A., SACKS D., STANLEY J. C., TAYLOR L. M., JR, WHITE C. J., WHITE J., WHITE R. A., ANTMAN E. M., SMITH S. C., JR, ADAMS C. D., ANDERSON J. L., FAXON D. P., FUSTER V., GIBBONS R. J., HUNT S. A., JACOBS A. K., NISHIMURA R., ORNATO J. P., PAGE R. L., RIEGEL B. (2006) ACC/AHA 2005 practice guidelines for the management of patients with peripheral arterial disease (lower extremity, renal, mesenteric, and abdominal aortic). *Circulation* 113, e463-654

HOGG K., SWEDBERG K. & MCMURRAY J. (2004) Heart failure with preserved left ventricular systolic function; epidemiology, clinical characteristics, and prognosis. *Journal of the American College of Cardiology* 43, 317-327

HOLENSTEIN R. & KU D. N. (1988) Reverse flow in the major infrarenal vessels: a capacitive phenomenon. *Biorheology* 25, 835-842

HSU C. P., ODEWALE I., ALCENDOR R. R. & SADOSHIMA J. (2008) Sirt1 protects the heart from aging and stress. *Biological Chemistry* 389, 221-231

HUO Y., GUO X. & KASSAB G. S. (2008) The flow field along the entire length of mouse aorta and primary branches. *Annals of Biomedical Engineering* 36, 685-699

IYAMA K., HAJRA L., IYAMA M., LI H., DICHIARA M., MEDOFF B. D. & CYBULSKY M. I. (1999) Patterns of vascular cell adhesion molecule-1 and intercellular adhesion molecule-1 expression in rabbit and mouse

atherosclerotic lesions and at sites predisposed to lesion formation. *Circulation Research* 85, 199-207

IMAI S., ARMSTRONG C. M., KAEBERLEIN M. & GUARENTE L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature* 403, 795-800

JAAKKOLA P., HIPPELAINEN M., FARIN P., RYTKONEN H., KAINULAINEN S. & PARTANEN K. (1996) Interobserver variability in measuring the dimensions of the abdominal aorta: Comparison of ultrasound and computed tomography. *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery : The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 12, 230-237

JAGER K., BOLLINGER A., VALLI C. & AMMANN R. (1986) Measurement of mesenteric blood flow by duplex scanning. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 3, 462-469

JANSSEN B., DEBETS J., LEENDERS P. & SMITS J. (2002) Chronic measurement of cardiac output in conscious mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, R928-35

JANSSEN B. J., DE CELLE T., DEBETS J. J., BROUNS A. E., CALLAHAN M. F. & SMITH T. L. (2004) Effects of anesthetics on systemic hemodynamics in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 287, H1618-24

JASAITIENE D., VALIUKEVICIENE S., LINKEVICIUTE G., RAISUTIS R., JASIUNIENE E. & KAZYS R. (2010) Principles of high-frequency ultrasonography for investigation of skin pathology. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*

JEMEC G. B., GNIADOCKA M. & ULRICH J. (2000) Ultrasound in dermatology. Part I. High frequency ultrasound. *European Journal of Dermatology : EJD* 10, 492-497

JONES G. T., JIANG F., MCCORMICK S. P. & DUSTING G. J. (2005) Elastic lamina defects are an early feature of aortic lesions in the apolipoprotein E knockout mouse. *Journal of Vascular Research* 42, 237-246

KAEBERLEIN M., KIRKLAND K. T., FIELDS S. & KENNEDY B. K. (2004) Sir2-independent life span extension by calorie restriction in yeast. *PLoS Biology* 2, E296

KAEBERLEIN M., MCVEY M. & GUARENTE L. (1999) The SIR2/3/4 complex and SIR2 alone promote longevity in *Saccharomyces cerevisiae* by two different mechanisms. *Genes & Development* 13, 2570-2580

KALARIA V. G., JACOB S., IRWIN W. & SCHAINFELD R. M. (2005) Duplex ultrasonography of vertebral and subclavian arteries. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 18, 1107-1111

KAMPSCHULTE M., BRINKMANN A., STIEGER P., SEDDING D. G., DIERKES C., BOHLE R. M., KROMBACH G., RITMAN E. L. & LANGHEINRICH A. C. (2010) Quantitative CT imaging of the spatio-temporal distribution patterns of vasa vasorum in aortas of apoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 212, 444-450

KATZ J. C., CHAKRAVARTI S., KO H. H., LYTRIVI I. D., SRIVASTAVA S., LAI W. W., PARNES I. A., NGUYEN K. & NIELSEN J. C. (2006) Common origin of the innominate and carotid arteries: Prevalence, nomenclature, and surgical implications. *Journal of the American Society of Echocardiography: Official Publication of the American Society of Echocardiography* 19, 1446-1448

KAWASHIMA T., INUZUKA Y., OKUDA J., KATO T., NIIZUMA S., TAMAKI Y., IWANAGA Y., KAWAMOTO A., NARAZAKI M., MATSUDA T., ADACHI S., TAKEMURA G., KITA T., KIMURA T. & SHIOI T. (2011) Constitutive SIRT1 overexpression impairs mitochondria and reduces cardiac function in mice. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 51, 1026-1036

## BIBLIOGRAFÍA

KEOGAN M. T., KLIEWER M. A., HERTZBERG B. S., DELONG D. M., TUPLER R. H. & CARROLL B. A. (1996) Renal resistive indexes: Variability in Doppler US measurement in a healthy population. *Radiology* 199, 165-169

KIERSZENBAUM A. L. (2007) *Histology and cell biology. an introduction to pathology*. 2nd edn. Philadelphia, USA, Mosby Elsevier

KIM E. J. & UM S. J. (2008) SIRT1: Roles in aging and cancer. *BMB Reports* 41, 751-756

KLAR A. J., FOGEL S. & LUSNAK K. (1979) Gene conversion of the mating-type locus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 92, 777-782

KNIPP B. S., AILAWADI G., SULLIVAN V. V., ROELOFS K. J., HENKE P. K., STANLEY J. C. & UPCHURCH G. R., JR. (2003) Ultrasound measurement of aortic diameters in rodent models of aneurysm disease. *The Journal of Surgical Research* 112, 97-101

KOHLER T. R., NANCE D. R., CRAMER M. M., VANDENBURGHE N. & STRANDNESS D. E., JR. (1987) Duplex scanning for diagnosis of aortoiliac and femoropopliteal disease: A prospective study. *Circulation* 76, 1074-1080

KOMA L. M., SPOTSWOOD T. C., KIRBERGER R. M. & BECKER P. J. (2005) Influence of normovolemic anemia on Doppler characteristics of the abdominal aorta and splanchnic vessels in beagles. *American Journal of Veterinary Research* 66, 187-195

KREGE J. H., HODGIN J. B., HAGAMAN J. R. & SMITHIES O. (1995) A noninvasive computerized tail-cuff system for measuring blood pressure in mice. *Hypertension* 25, 1111-1115

LAKOWSKI B. & HEKIMI S. (1998) The genetics of caloric restriction in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, 13091-13096

LANGHEINRICH A. C., MICHNIEWICZ A., BOHLE R. M. & RITMAN E. L. (2007) Vasa vasorum neovascularization and lesion distribution among different

vascular beds in ApoE<sup>-/-</sup>/LDL<sup>-/-</sup> double knockout mice. *Atherosclerosis* 191, 73-81

LANGHEINRICH A. C., MICHNIEWICZ A., SEDDING D. G., WALKER G., BEIGHLEY P. E., RAU W. S., BOHLE R. M. & RITMAN E. L. (2006) Correlation of vasa vasorum neovascularization and plaque progression in aortas of apolipoprotein E<sup>(-/-)</sup>/low-density lipoprotein<sup>(-/-)</sup> double knockout mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 26, 347-352

LAUER M. S., LARSON M. G. & LEVY D. (1995) Gender-specific reference M-mode values in adults: Population-derived values with consideration of the impact of height. *Journal of the American College of Cardiology* 26, 1039-1046

LAYTON K. F., KALLMES D. F., CLOFT H. J., LINDELL E. P. & COX V. S. (2006) Bovine aortic arch variant in humans: Clarification of a common misnomer. *AJNR. American Journal of Neuroradiology* 27, 1541-1542

LEE I. H., CAO L., MOSTOSLAVSKY R., LOMBARD D. B., LIU J., BRUNS N. E., TSOKOS M., ALT F. W. & FINKEL T. (2008) A role for the NAD-dependent deacetylase *Sirt1* in the regulation of autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 3374-3379

LEE K., CHOI M., YOON J. & JUNG J. (2004) Spectral waveform analysis of major arteries in conscious dogs by Doppler ultrasonography. *Veterinary Radiology & Ultrasound : The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 45, 166-171

LEE K., FORUDI F., SAIDEL G. M. & PENN M. S. (2005) Alterations in internal elastic lamina permeability as a function of age and anatomical site precede lesion development in apolipoprotein E-null mice. *Circulation Research* 97, 450-456

LEVICK J. R. & MICHEL C. C. (1978) The effects of position and skin temperature on the capillary pressures in the fingers and toes. *The Journal of Physiology* 274, 97-109

LI L., GAO P., ZHANG H., CHEN H., ZHENG W., LV X., XU T., WEI Y., LIU D. & LIANG C. (2011a) SIRT1 inhibits angiotensin II-induced vascular smooth muscle cell hypertrophy. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* 43, 103-109

LI L., PAN R., LI R., NIEMANN B., AURICH A. C., CHEN Y. & ROHRBACH S. (2011b) Mitochondrial biogenesis and peroxisome proliferator-activated receptor-gamma coactivator-1alpha (PGC-1alpha) deacetylation by physical activity: Intact adipocytokine signaling is required. *Diabetes* 60, 157-167

LI L., ZHAO L., YI-MING W., YU Y. S., XIA C. Y., DUAN J. L. & SU D. F. (2009) *Sirt1* hyperexpression in SHR heart related to left ventricular hypertrophy. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* 87, 56-62

LI P., SUR S. H., MISTLBERGER R. E. & MORRIS M. (1999) Circadian blood pressure and heart rate rhythms in mice. *The American Journal of Physiology* 276, R500-4

LI Y. Y., CHEN D., WATKINS S. C. & FELDMAN A. M. (2001) Mitochondrial abnormalities in tumor necrosis factor-alpha-induced heart failure are associated with impaired DNA repair activity. *Circulation* 104, 2492-2497

LINGMAN G., LEGARTH J., RAHMAN F. & STANGENBERG M. (1991) Myocardial contractility in the anemic human fetus. *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology : The Official Journal of the International Society of Ultrasound in Obstetrics and Gynecology* 1, 266-268

LLOYD-JONES D., ADAMS R., CARNETHON M., DE SIMONE G., FERGUSON T. B., FLEGAL K., FORD E., FURIE K., GO A., GREENLUND K., HAASE N., HAILPERN S., HO M., HOWARD V., KISSELA B., KITTNER S., LACKLAND D., LISABETH L., MARELLI A., MCDERMOTT M., MEIGS J., MOZAFFARIAN D., NICHOL G., O'DONNELL C., ROGER V., ROSAMOND W., SACCO R., SORLIE P., STAFFORD R., STEINBERGER J., THOM T., WASSERTHIEL-SMOLLER S., WONG N., WYLIE-ROSETT J., HONG Y. & AMERICAN HEART ASSOCIATION STATISTICS COMMITTEE AND STROKE STATISTICS SUBCOMMITTEE. (2009) Heart disease and stroke statistics--

2009 update: A report from the American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee. *Circulation* 119, e21-181

LUI E. Y., STEINMAN A. H., COBBOLD R. S. & JOHNSTON K. W. (2005) Human factors as a source of error in peak Doppler velocity measurement. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 42, 972-979

LUO J., NIKOLAEV A. Y., IMAI S., CHEN D., SU F., SHILOH A., GUARENTE L. & GU W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* 107, 137-148

MAEDA N., HAGIHARA H., NAKATA Y., HILLER S., WILDER J. & REDDICK R. (2000) Aortic wall damage in mice unable to synthesize ascorbic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 841-846

MAEDA N., JOHNSON L., KIM S., HAGAMAN J., FRIEDMAN M. & REDDICK R. (2007) Anatomical differences and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice with 129/SvEv and C57BL/6 genetic backgrounds. *Atherosclerosis* 195, 75-82

MAI W., LE FLOC'H J., VRAY D., SAMARUT J., BARTHEZ P. & JANIER M. (2004) Evaluation of cardiovascular flow characteristics in the 129Sv mouse fetus using color-Doppler-guided spectral Doppler ultrasound. *Veterinary Radiology & Ultrasound : The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 45, 568-573

MAIR W., GOYMER P., PLETCHER S. D. & PARTRIDGE L. (2003) Demography of dietary restriction and death in *Drosophila*. *Science (New York, N.Y.)* 301, 1731-1733

MALAKOFF D. (2000) The rise of the mouse, biomedicine's model mammal. *Science (New York, N.Y.)* 288, 248-253

MAO S. S., AHMADI N., SHAH B., BECKMANN D., CHEN A., NGO L., FLORES F. R., GAO Y. L. & BUDOFF M. J. (2008) Normal thoracic aorta diameter on cardiac computed tomography in healthy asymptomatic adults: Impact of age and gender. *Academic Radiology* 15, 827-834

MARIAN A. J. & ROBERTS R. (1994) Molecular basis of hypertrophic and dilated cardiomyopathy. *Texas Heart Institute Journal/from the Texas Heart Institute of St.Luke's Episcopal Hospital, Texas Children's Hospital* 21, 6-15

MATSUMORI A. & KAWAI C. (1982) An animal model of congestive (dilated) cardiomyopathy: Dilatation and hypertrophy of the heart in the chronic stage in DBA/2 mice with myocarditis caused by encephalomyocarditis virus. *Circulation* 66, 355-360

MCBURNEY M. W., YANG X., JARDINE K., HIXON M., BOEKELHEIDE K., WEBB J. R., LANSDORP P. M. & LEMIEUX M. (2003) The mammalian SIR2alpha protein has a role in embryogenesis and gametogenesis. *Molecular and Cellular Biology* 23, 38-54

MCVEIGH E. R. (2006) Emerging imaging techniques. *Circulation Research* 98, 879-886

MICHAN S. & SINCLAIR D. (2007) Sirtuins in mammals: Insights into their biological function. *The Biochemical Journal* 404, 1-13

MICHISHITA E., PARK J. Y., BURNESKIS J. M., BARRETT J. C. & HORIKAWA I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Molecular Biology of the Cell* 16, 4623-4635

MIHL C., DASSEN W. R. & KUIPERS H. (2008) Cardiac remodelling: Concentric versus eccentric hypertrophy in strength and endurance athletes. *Netherlands Heart Journal : Monthly Journal of the Netherlands Society of Cardiology and the Netherlands Heart Foundation* 16, 129-133

MIÑO N., ESPINO L. & BARREIRO A. (2008) Effects of medetomidine on Doppler variables of major abdominal arteries in normal dogs. *Veterinary Research Communications* 32, 175-186

MONETA G. L., TAYLOR D. C., HELTON W. S., MULHOLLAND M. W. & STRANDNESS D. E.,JR. (1988) Duplex ultrasound measurement of postprandial intestinal blood flow: Effect of meal composition. *Gastroenterology* 95, 1294-1301

MOORE J. E.,JR & KU D. N. (1994) Pulsatile velocity measurements in a model of the human abdominal aorta under simulated exercise and postprandial conditions. *Journal of Biomechanical Engineering* 116, 107-111

MOORE J. E.,JR, MAIER S. E., KU D. N. & BOESIGER P. (1994) Hemodynamics in the abdominal aorta: A comparison of in vitro and in vivo measurements. *Journal of Applied Physiology* (Bethesda, Md.: 1985) 76, 1520-1527

MORRISON T. M., CHOI G., ZARINS C. K. & TAYLOR C. A. (2009) Circumferential and longitudinal cyclic strain of the human thoracic aorta: Age-related changes. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery [and] International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 49, 1029-1036

NAGRE S. B., TAYLOR S. M., PASSMAN M. A., PATTERSON M. A., COMBS B. R., LOWMAN B. G. & JORDAN W. D.,JR. (2011) Evaluating outcomes of endoleak discrepancies between computed tomography scan and ultrasound imaging after endovascular abdominal aneurysm repair. *Annals of Vascular Surgery* 25, 94-100

NAKASHIMA Y., PLUMP A. S., RAINES E. W., BRESLOW J. L. & ROSS R. (1994) ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology/American Heart Association* 14, 133-140

NATSIS K. I., TSITOURIDIS I. A., DIDAGELOS M. V., FILLIPIDIS A. A., VLASIS K. G. & TSIKARAS P. D. (2009) Anatomical variations in the branches of the human aortic arch in 633 angiographies: Clinical significance and literature review. *Surgical and Radiologic Anatomy* : SRA 31, 319-323

NELSON T. R. & PRETORIUS D. H. (1988) The Doppler signal: Where does it come from and what does it mean? *AJR.American Journal of Roentgenology* 151, 439-447

NI M., ZHANG M., DING S. F., CHEN W. Q. & ZHANG Y. (2008) Micro-ultrasound imaging assessment of carotid plaque characteristics in apolipoprotein-E knockout mice. *Atherosclerosis* 197, 64-71

NIEBAUER J. & COOKE J. P. (1996) Cardiovascular effects of exercise: Role of endothelial shear stress. *Journal of the American College of Cardiology* 28, 1652-1660

NIEMAN B. J., BOCK N. A., BISHOP J., CHEN X. J., SLED J. G., ROSSANT J. & HENKELMAN R. M. (2005) Magnetic resonance imaging for detection and analysis of mouse phenotypes. *NMR in Biomedicine* 18, 447-468

NIMURA Y., MATSUO H., HAYASHI T., KITABATAKE A. & MOCHIZUKI S. (1974) Studies on arterial flow patients - instantaneous velocity spectrums and their phasic changes - with directional ultrasonic Doppler technique. *British Heart Journal* 36, 899-907

NISHIKAWA T., UTO K., KANAI S., ODA H., KAWAMURA S., NAKANISHI T., HAGIWARA N. & MORIMOTO S. (2011) Histopathological aspects of cardiac biopsy in pediatric patients with dilated cardiomyopathy. *Pediatrics International: Official Journal of the Japan Pediatric Society* 53, 350-353

NOBLE M. I. M., TRENCHARD D. & GUZ A. (1966) Left ventricular ejection in conscious dogs I. Measurement and significance of the maximum acceleration of blood from the left ventricle. *Circulation Research* 19, 139-147

NOVELLAS R., RUIZ DE GOPEGUI R. & ESPADA Y. (2010) Assessment of renal vascular resistance and blood pressure in dogs and cats with renal disease. *The Veterinary Record* 166, 618-623

NYLAND T. G., MATTOON J. S., HERRGESELL E. J. & WISNER E. R. (2002) Physical principles, instrumentation, and safety of the diagnostic ultrasound. In *Small Animal Diagnostic Ultrasound*, 2nd Ed.. WB Saunders.

O'GRADY M. R. & O'SULLIVAN M. L. (2004) Dilated cardiomyopathy: An update. *The Veterinary Clinics of North America. Small Animal Practice* 34, 1187-1207

ORR H. E. (2002) Rats and mice. In *BSAVA Manual of Exotic Pets*. 4th edn. Eds A. Meredith, S. Redrobe. UK, BSAVA. pp 13

OSADA T., MURASE N., KIME R., SHIROISHI K., SHIMOMURA K., NAGATA H. & KATSUMURA T. (2007) Arterial blood flow of all abdominal-pelvic organs using Doppler ultrasound: Range, variability and physiological impact. *Physiological Measurement* 28, 1303-1316

PAIGEN K. (1995) A miracle enough: The power of mice. *Nature Medicine* 1, 215-220

PEARCE W. H., SLAUGHTER M. S., LEMAIRE S., SALYAPONGSE A. N., FEINGLASS J., MCCARTHY W. J. & YAO J. S. (1993) Aortic diameter as a function of age, gender, and body surface area. *Surgery* 114, 691-697

PHOON C. K. (2006) Imaging tools for the developmental biologist: Ultrasound biomicroscopy of mouse embryonic development. *Pediatric Research* 60, 14-21

PICARD F., KURTEV M., CHUNG N., TOPARK-NGARM A., SENAWONG T., MACHADO DE OLIVEIRA R., LEID M., MCBURNEY M. W. & GUARENTE L. (2004) *Sirt1* promotes fat mobilization in white adipocytes by repressing PPAR- $\gamma$ . *Nature* 429, 771-776

PICCIOTTO M. R. & WICKMAN K. (1998) Using knockout and transgenic mice to study neurophysiology and behavior. *Physiological Reviews* 78, 1131-1163

PILLAI J. B., ISBATAN A., IMAI S. & GUPTA M. P. (2005) Poly(ADP-ribose) polymerase-1-dependent cardiac myocyte cell death during heart failure is mediated by NAD<sup>+</sup> depletion and reduced Sir2 $\alpha$  deacetylase activity. *The Journal of Biological Chemistry* 280, 43121-43130

PLANAVILA A., IGLESIAS R., GIRALT M. & VILLARROYA F. (2011) *Sirt1* acts in association with PPAR $\alpha$  to protect the heart from hypertrophy, metabolic dysregulation, and inflammation. *Cardiovascular Research* 90, 276-284

POLAK J. F. (1993) Arterial sonography: Efficacy for the diagnosis of arterial disease of the lower extremity. *AJR.American Journal of Roentgenology* 161, 235-243

PONTREMOLI R., VIAZZI F., MARTINOLI C., RAVERA M., NICOLELLA C., BERRUTI V., LEONCINI G., RUELLO N., ZAGAMI P., BEZANTE G. P., DERCHI L. E. & DEFERRARI G. (1999) Increased renal resistive index in patients with essential hypertension: A marker of target organ damage. *Nephrology, Dialysis, Transplantation: Official Publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 14, 360-365

POPESKO P., RAJTOVÁ V. & HORÁK J. (1992) A colour atlas of anatomy of small laboratory animals. volume two: Rat, mouse, golden hamster. London, UK, Wolfe Publishing Ltd

POUTANEN T., TIKANOJA T., SAIRANEN H. & JOKINEN E. (2003) Normal aortic dimensions and flow in 168 children and young adults. *Clinical Physiology and Functional Imaging* 23, 224-229

RAHMAN S. & ISLAM R. (2011) Mammalian *Sirt1*: Insights on its biological functions. *Cell Communication and Signaling : CCS* 9, 11

RAISIS A. L., YOUNG L. E., BLISSITT K. J., BREARLEY J. C., MEIRE H. B., TAYLOR P. M. & LEKEUX P. (2000) A comparison of the haemodynamic effects of isoflurane and halothane anaesthesia in horses. *Equine Veterinary Journal* 32, 318-326

RAUTENBERG W. & HENNERICI M. (1988) Pulsed Doppler assessment of innominate artery obstructive diseases. *Stroke: a Journal of Cerebral Circulation* 19, 1514-1520

RECCHIA F. A. & LIONETTI V. (2007) Animal models of dilated cardiomyopathy for translational research. *Veterinary Research Communications* 31 Suppl 1, 35-41

REDDICK R. L., ZHANG S. H. & MAEDA N. (1994) Atherosclerosis in mice lacking apo E. Evaluation of lesional development and progression. *Arteriosclerosis and Thrombosis: A Journal of Vascular Biology / American Heart Association* 14, 141-147

REDDY A. K., NAMIRANIAN K., LLOYD E. E., BRYAN R. M., TAFFET G. E. & HARTLEY C. J. (2009) Effect of isoflurane on aortic impedance in mice. *Conference Proceedings: Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. Conference 2009*, 1104-1105

REDDY A. K., TAFFET G. E., LI Y. H., LIM S. W., PHAM T. T., POCIUS J. S., ENTMAN M. L., MICHAEL L. H. & HARTLEY C. J. (2005) Pulsed Doppler signal processing for use in mice: Applications. *IEEE Transactions on Bio-Medical Engineering* 52, 1771-1783

RICHARDSON P., MCKENNA W., BRISTOW M., MAISCH B., MAUTNER B., O'CONNELL J., OLSEN E., THIENE G., GOODWIN J., GYARFAS I., MARTIN I. & NORDET P. (1996) Report of the 1995 World Health Organization/International Society and Federation of Cardiology task force on the definition and classification of cardiomyopathies. *Circulation* 93, 841-842

RIESEN S., SCHMID V., GASCHEN L., BUSATO A. & LANG J. (2002) Doppler measurement of splanchnic blood flow during digestion in unsedated normal dogs. *Veterinary Radiology & Ultrasound : The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 43, 554-560

## BIBLIOGRAFÍA

RIGSBY C. M., TAYLOR K. J., WELTIN G., BURNS P. N., BIA M., PRINCENTHAL R. A., KASHGARIAN M. & FLYE M. W. (1986) Renal allografts in acute rejection: Evaluation using duplex sonography. *Radiology* 158, 375-378

RIVERO M. A., RAMIREZ J. A., VAZQUEZ J. M., GIL F., RAMIREZ G. & ARENCIBIA A. (2005) Normal anatomical imaging of the thorax in three dogs: Computed tomography and macroscopic cross sections with vascular injection. *Anatomia, Histologia, Embryologia* 34, 215-219

ROGINA B. & HELFAND S. L. (2004) Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 15998-16003

ROHREN E. M., KLIEWER M. A., CARROLL B. A. & HERTZBERG B. S. (2003) A spectrum of Doppler waveforms in the carotid and vertebral arteries. *AJR.American Journal of Roentgenology* 181, 1695-1704

ROMAN M. J., DEVEREUX R. B., KRAMER-FOX R. & O'LOUGHLIN J. (1989) Two-dimensional echocardiographic aortic root dimensions in normal children and adults. *The American Journal of Cardiology* 64, 507-512

ROSENFELD M. E., POLINSKY P., VIRMANI R., KAUSER K., RUBANYI G. & SCHWARTZ S. M. (2000) Advanced atherosclerotic lesions in the innominate artery of the ApoE knockout mouse. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 20, 2587-2592

ROSS M. H. & PAWLINA W. (2006) *Histology. A text and atlas with correlated cell and molecular biology*. 5th edn. USA, Lippincott Williams & Wilkins, INC

ROTH D. M., SWANEY J. S., DALTON N. D., GILPIN E. A. & ROSS J.,JR. (2002) Impact of anesthesia on cardiac function during echocardiography in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 282, H2134-40

ROTTMAN J. N., NI G. & BROWN M. (2007) Echocardiographic evaluation of ventricular function in mice. *Echocardiography (Mount Kisco, N.Y.)* 24, 83-89

RUFF J., WIESMANN F., LANZ T. & HAASE A. (2000) Magnetic resonance imaging of coronary arteries and heart valves in a living mouse: Techniques and preliminary results. *Journal of Magnetic Resonance (San Diego, Calif. 1997)* 146, 290-296

SAHN D. J., DEMARIA A., KISSLO J. & WEYMAN A. (1978) Recommendations regarding quantitation in M-mode echocardiography: Results of a survey of echocardiographic measurements. *Circulation* 58, 1072-1083

SALTON C. J., CHUANG M. L., O'DONNELL C. J., KUPKA M. J., LARSON M. G., KISSINGER K. V., EDELMAN R. R., LEVY D. & MANNING W. J. (2002) Gender differences and normal left ventricular anatomy in an adult population free of hypertension. A cardiovascular magnetic resonance study of the Framingham Heart Study offspring cohort. *Journal of the American College of Cardiology* 39, 1055-1060

SATO S., OHNISHI K., SUGITA S. & OKUDA K. (1987) Splenic artery and superior mesenteric artery blood flow: Nonsurgical Doppler US measurement in healthy subjects and patients with chronic liver disease. *Radiology* 164, 347-352

SCHNEIDER J. E., WIESMANN F., LYGATE C. A. & NEUBAUER S. (2006) How to perform an accurate assessment of cardiac function in mice using high-resolution magnetic resonance imaging. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance: Official Journal of the Society for Cardiovascular Magnetic Resonance* 8, 693-701

SCHOENHAGEN P. & NISSEN S. (2002) Understanding coronary artery disease: Tomographic imaging with intravascular ultrasound. *Heart (British Cardiac Society)* 88, 91-96

SCISSONS R. P. (2009) Confusion of peripheral arterial Doppler waveform terminology. *Journal of Diagnostic Medical Sonography* 25, 185-194

SCISSONS R. P. (2008a) Characterizing triphasic, biphasic, and monophasic Doppler waveforms ,Should a simple task be so difficult?. *Journal of Diagnostic Medical Sonography* 24, 269-376

SCISSONS R. P. (2008b) Peripheral arterial Doppler waveform descriptors: Absent, vague and contradictory. What's all the confusion? VEITH Symposium 2010

SEO H. S., LOMBARDI D. M., POLINSKY P., POWELL-BRAXTON L., BUNTING S., SCHWARTZ S. M. & ROSENFELD M. E. (1997) Peripheral vascular stenosis in apolipoprotein E-deficient mice. Potential roles of lipid deposition, medial atrophy, and adventitial inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 17, 3593-3601

SHAALAN W. E., FRENCH-SHERRY E., CASTILLA M., LOZANSKI L. & BASSIOUNY H. S. (2003) Reliability of common femoral artery hemodynamics in assessing the severity of aortoiliac inflow disease. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 37, 960-969

SHAROV V. G., TODOR A. V., SILVERMAN N., GOLDSTEIN S. & SABBAH H. N. (2000) Abnormal mitochondrial respiration in failed human myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 32, 2361-2367

SIGEL B., MACHI J., BEITLER J. C. & JUSTIN J. R. (1983) Red cell aggregation as a cause of blood-flow echogenicity. *Radiology* 148, 799-802

SINCLAIR D. A., LIN S. J. & GUARENTE L. (2006) Life-span extension in yeast. *Science (New York, N.Y.)* 312, 195-7; author reply 195-7

SINCLAIR D. A., MILLS K. & GUARENTE L. (1997) Accelerated aging and nucleolar fragmentation in yeast *sgs1* mutants. *Science (New York, N.Y.)* 277, 1313-1316

SMITHIES O., GREGG R. G., BOGGS S. S., KORALEWSKI M. A. & KUCHERLAPATI R. S. (1985) Insertion of DNA sequences into the human

chromosomal beta-globin *locus* by homologous recombination. *Nature* 317, 230-234

SOHN S. & KIM H. S. (2001) Doppler aortic flow velocity measurement in healthy children. *Journal of Korean Medical Science* 16, 140-144

SONESSON B., HANSEN F., STALE H. & LANNE T. (1993) Compliance and diameter in the human abdominal aorta: The influence of age and sex. *European Journal of Vascular Surgery* 7, 690-697

SONESSON B., LANNE T., HANSEN F. & SANDGREN T. (1994) Infrarenal aortic diameter in the healthy person. *European Journal of Vascular Surgery* 8, 89-95

SPAULDING K. A. (1997) A review of sonographic identification of abdominal blood vessels and juxtavascular organs. *Veterinary Radiology & Ultrasound : The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 38, 4-23

SPRONK S., DEN HOED P. T., DE JONGE L. C., VAN DIJK L. C. & PATTYNAMA P. M. (2005) Value of the duplex waveform at the common femoral artery for diagnosing obstructive aortoiliac disease. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 42, 236-42; discussion 242

SPROUSE L. R., 2ND, MEIER G. H., 3RD, PARENT F. N., DEMASI R. J., GLICKMAN M. H. & BARBER G. A. (2004) Is ultrasound more accurate than axial computed tomography for determination of maximal abdominal aortic aneurysm diameter? *European Journal of Vascular and Endovascular Surgery : The Official Journal of the European Society for Vascular Surgery* 28, 28-35

STEINER M. K., SYRKINA O. L., KOLLIPUTI N., MARK E. J., HALES C. A. & WAXMAN A. B. (2009) Interleukin-6 overexpression induces pulmonary hypertension. *Circulation Research* 104, 236-44, 28p following 244

STENMARK K. R., MEYRICK B., GALIE N., MOOI W. J. & MCMURTRY I. F. (2009) Animal models of pulmonary arterial hypertension: The hope for etiological discovery and pharmacological cure. *American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology* 297, L1013-32

STOYANOVA E., TRUDEL M., FELFLY H., GARCIA D. & CLOUTIER G. (2007) Characterization of circulatory disorders in  $\beta$ -thalassemic mice by noninvasive ultrasound biomicroscopy. *Physiological Genomics* 29, 84-90

STRAUCH O. F., STYPMANN J., REINHECKEL T., MARTINEZ E., HAVERKAMP W. & PETERS C. (2003) Cardiac and ocular pathologies in a mouse model of mucopolysaccharidosis type VI. *Pediatric Research* 54, 701-708

STUART B., DRUMM J., FITZGERALD D. E. & DUGNAN N. M. (1980) Fetal blood velocity waveforms in normal pregnancy. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 87, 780-785

STUCKEY D. J., CARR C. A., TYLER D. J., AASUM E. & CLARKE K. (2008) Novel MRI method to detect altered left ventricular ejection and filling patterns in rodent models of disease. *Magnetic Resonance in Medicine: Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine* 60, 582-587

STYPMANN J., ENGELEN M. A., EPPING C., VAN RIJEN H. V., MILBERG P., BRUCH C., BREITHARDT G., TIEMANN K. & ECKARDT L. (2006) Age and gender related reference values for transthoracic Doppler-echocardiography in the anesthetized CD1 mouse. *The International Journal of Cardiovascular Imaging* 22, 353-362

SUCKOW M. A., DANNEMAN P. & BRAYTON C. (2001) *The laboratory mouse*. 1st edn. Florida, US, CRC Press

SUNDARESAN N. R., PILLAI V. B. & GUPTA M. P. (2011) Emerging roles of SIRT1 deacetylase in regulating cardiomyocyte survival and hypertrophy. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 27, 614-618

SUO J., FERRARA D. E., SORESCU D., GULDBERG R. E., TAYLOR W. R. & GIDDENS D. P. (2007) Hemodynamic shear stresses in mouse aortas: Implications for atherogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 346-351

SZATMARI V., SOTONYI P. & VOROS K. (2001) Normal duplex Doppler waveforms of major abdominal blood vessels in dogs: A review. *Veterinary Radiology & Ultrasound: The Official Journal of the American College of Veterinary Radiology and the International Veterinary Radiology Association* 42, 93-107

TANAKA N., DALTON N., MAO L., ROCKMAN H. A., PETERSON K. L., GOTTSALL K. R., HUNTER J. J., CHIEN K. R. & ROSS J., JR. (1996) Transthoracic echocardiography in models of cardiac disease in the mouse. *Circulation* 94, 1109-1117

TANNO M., KUNO A., YANO T., MIURA T., HISAHARA S., ISHIKAWA S., SHIMAMOTO K. & HORIO Y. (2010) Induction of manganese superoxide dismutase by nuclear translocation and activation of SIRT1 promotes cell survival in chronic heart failure. *The Journal of Biological Chemistry* 285, 8375-8382

TANNO M., SAKAMOTO J., MIURA T., SHIMAMOTO K. & HORIO Y. (2007) Nucleocytoplasmic shuttling of the NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase SIRT1. *The Journal of Biological Chemistry* 282, 6823-6832

TAYLOR C. A., HUGHES T. J. & ZARINS C. K. (1999) Effect of exercise on hemodynamic conditions in the abdominal aorta. *Journal of Vascular Surgery : Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North American Chapter* 29, 1077-1089

TAYLOR D. E. & TUKMACHI E. S. (1985) Contribution of internal and external carotid beds to common carotid artery input impedance in the dog. *Quarterly Journal of Experimental Physiology (Cambridge, England)* 70, 177-187

TAYLOR K. J., BURNS P. N., WOODCOCK J. P. & WELLS P. N. (1985) Blood flow in deep abdominal and pelvic vessels: Ultrasonic pulsed-Doppler analysis. *Radiology* 154, 487-493

TAYLOR K. J. & HOLLAND S. (1990) Doppler US. part I. basic principles, instrumentation, and pitfalls. *Radiology* 174, 297-307

THIENE G., BASSO C., CALABRESE F., ANGELINI A. & VALENTE M. (2005) Twenty years of progress and beckoning frontiers in cardiovascular pathology: Cardiomyopathies. *Cardiovascular Pathology : The Official Journal of the Society for Cardiovascular Pathology* 14, 165-169

THOMPSON S., CLARKE A. R., POW A. M., HOOPER M. L. & MELTON D. W. (1989) Germ line transmission and expression of a corrected HPRT gene produced by gene targeting in embryonic stem cells. *Cell* 56, 313-321

TISSENBAUM H. A. & GUARENTE L. (2001) Increased dosage of a Sir2 gene extends lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 410, 227-230

TOLA M., YURDAKUL M., OKTEN S., OZDEMIR E. & CUMHUR T. (2003) Diagnosis of arterial occlusive disease of the upper extremities: Comparison of color duplex sonography and angiography. *Journal of Clinical Ultrasound : JCU* 31, 407-411

TRAUSTADOTTIR T., BOSCH P. R. & MATT K. S. (2003) Gender differences in cardiovascular and hypothalamic-pituitary-adrenal axis responses to psychological stress in healthy older adult men and women. *Stress (Amsterdam, Netherlands)* 6, 133-140

UECHI M., ASAI K., OSAKA M., SMITH A., SATO N., WAGNER T. E., ISHIKAWA Y., HAYAKAWA H., VATNER D. E., SHANNON R. P., HOMCY C. J. & VATNER S. F. (1998) Depressed heart rate variability and arterial baroreflex in conscious transgenic mice with overexpression of cardiac G $\alpha$ . *Circulation Research* 82, 416-423

USHIKI T. (2002) Collagen fibers, reticular fibers and elastic fibers. A comprehensive understanding from a morphological viewpoint. *Archives of Histology and Cytology* 65, 109-126

VAHTOLA E., LOUHELAINEN M., MERASTO S., MARTONEN E., PENTTINEN S., AAHOS I., KYTO V., VIRTANEN I. & MERVAALA E. (2008) Forkhead class O transcription factor 3a activation and Sirtuin1 overexpression in the hypertrophied myocardium of the diabetic Goto-Kakizaki rat. *Journal of Hypertension* 26, 334-344

VAN MEURS-VAN WOEZIK H. & KREDIET P. (1982) Measurements of the descending aorta in infants and children: Comparison with other aortic dimensions. *Journal of Anatomy* 135, 273-279

VASAN R. S., LARSON M. G. & LEVY D. (1995) Determinants of echocardiographic aortic root size. The Framingham Heart Study. *Circulation* 91, 734-740

VASAN R. S., LARSON M. G., LEVY D., EVANS J. C. & BENJAMIN E. J. (1997) Distribution and categorization of echocardiographic measurements in relation to reference limits: The Framingham Heart Study: Formulation of a height- and sex-specific classification and its prospective validation. *Circulation* 96, 1863-1873

VASAN R. S., LEVY D., LARSON M. G. & BENJAMIN E. J. (2000) Interpretation of echocardiographic measurements: A call for standardization. *American Heart Journal* 139, 412-422

VILAHUR G., PADRO T. & BADIMON L. (2011) Atherosclerosis and thrombosis: Insights from large animal models. *Journal of Biomedicine & Biotechnology* 2011, 907575

WAGENSEIL J. E., CILIBERTO C. H., KNUTSEN R. H., LEVY M. A., KOVACS A. & MECHAM R. P. (2009) Reduced vessel elasticity alters cardiovascular structure and function in newborn mice. *Circulation Research* 104, 1217-1224

WAGENSEIL J. E. & MECHAM R. P. (2009) Vascular extracellular matrix and arterial mechanics. *Physiological Reviews* 89, 957-989

WALLACE D. C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annual Review of Genetics* 39, 359-407

WANHAINEN A., THEMUDO R., AHLSTROM H., LIND L. & JOHANSSON L. (2008) Thoracic and abdominal aortic dimension in 70-year-old men and women: a population-based whole-body magnetic resonance imaging (MRI) study. *Journal of Vascular Surgery: Official Publication, the Society for Vascular Surgery and International Society for Cardiovascular Surgery, North America* 47, 504-512

WARWICK R. & WILLIAMS P. L. (1973) *Gray's anatomy*. 36th ed. , Longman Group Ltd

WEBB R. C., VANDER A. J. & HENRY J. P. (1987) Increased vasodilator responses to acetylcholine in psychosocial hypertensive mice. *Hypertension* 9, 268-276

WEINDRUCH R. & WALFORD R. L. (1982) Dietary restriction in mice beginning at 1 year of age: Effect on life-span and spontaneous cancer incidence. *Science (New York, N.Y.)* 215, 1415-1418

WESTRICK R. J., WINN M. E. & EITZMAN D. T. (2007) Murine models of vascular thrombosis (eitzman series). *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 27, 2079-2093

WHITESALL S. E., HOFF J. B., VOLLMER A. P. & D'ALECY L. G. (2004) Comparison of simultaneous measurement of mouse systolic arterial blood pressure by radiotelemetry and tail-cuff methods. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 286, H2408-15

WIESMANN F., SZIMTENINGS M., FRYDRYCHOWICZ A., ILLINGER R., HUNECKE A., ROMMEL E., NEUBAUER S. & HAASE A. (2003) High-

resolution MRI with cardiac and respiratory gating allows for accurate in vivo atherosclerotic plaque visualization in the murine aortic arch. *Magnetic Resonance in Medicine : Official Journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine* 50, 69-74

WILKINS R. W., HALPERIN M. H. & LITTER J. (1950) The effect of the dependent position upon blood flow in the limbs. *Circulation* 2, 373-379

WILLIAMS T. D., CHAMBERS J. B., HENDERSON R. P., RASHOTTE M. E. & OVERTON J. M. (2002) Cardiovascular responses to caloric restriction and thermoneutrality in C57BL/6J mice. *American Journal of Physiology. Regulatory, Integrative and Comparative Physiology* 282, R1459-67

WILSON N., GOLDBERG S. J., DICKINSON D. F. & SCOTT O. (1985) Normal intracardiac and great artery blood velocity measurements by pulsed Doppler echocardiography. *British Heart Journal* 53, 451-458

WOLAK A., GRANSAR H., THOMSON L. E., FRIEDMAN J. D., HACHAMOVITCH R., GUTSTEIN A., SHAW L. J., POLK D., WONG N. D., SAOUAF R., HAYES S. W., ROZANSKI A., SLOMKA P. J., GERMANO G. & BERMAN D. S. (2008) Aortic size assessment by noncontrast cardiac computed tomography: Normal limits by age, gender, and body surface area. *JACC. Cardiovascular Imaging* 1, 200-209

WOLINSKY H. & GLAGOV S. (1969) Comparison of abdominal and thoracic aortic medial structure in mammals. deviation of man from the usual pattern. *Circulation Research* 25, 677-686

WOLINSKY H. & GLAGOV S. (1967a) A lamellar unit of aortic medial structure and function in mammals. *Circulation Research* 20, 99-111

WOLINSKY H. & GLAGOV S. (1967b) Nature of species differences in the medial distribution of aortic *vasa vasorum* in mammals. *Circulation Research* 20, 409-421

WONG A. Y., KULANDAVELU S., WHITELEY K. J., QU D., LANGILLE B. L. & ADAMSON S. L. (2002) Maternal cardiovascular changes during pregnancy and postpartum in mice. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology* 282, H918-25

WOOD M. M., ROMINE L. E., LEE Y. K., RICHMAN K. M., O'BOYLE M. K., PAZ D. A., CHU P. K. & PRETORIUS D. H. (2010) Spectral Doppler signature waveforms in ultrasonography: A review of normal and abnormal waveforms. *Ultrasound Quarterly* 26, 83-99

WRIGHT N. L. (1969) Dissection study and menstruation of the human aortic arch. *Journal of Anatomy* 104, 377-385

YANG X. P., LIU Y. H., RHALEB N. E., KURIHARA N., KIM H. E. & CARRETERO O. A. (1999) Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice. *The American Journal of Physiology* 277, H1967-74

YAZICI B., ERDOGMUS B. & TUGAY A. (2005) Cerebral blood flow measurements of the extracranial carotid and vertebral arteries with Doppler ultrasonography in healthy adults. *Diagnostic and Interventional Radiology (Ankara, Turkey)* 11, 195-198

YOUNG B., LOWE J. S., STEVENS A. & HEATH J. W. (2006) *Wheater's functional histology. A text and colour atlas. 5th edition edn.* Philadelphia, USA, Churchill Livingstone Elsevier

ZEGER S. L. & LIANG K. Y. (1986) Longitudinal data analysis for discrete and continuous outcomes. *Biometrics* 42, 121-130

ZHOU M., XU G., BOJANOWSKI C. M., SONG Y., CHEN R., SUN X., WANG W. & CHAN C. C. (2006) Differential diagnosis of anterior chamber cysts with ultrasound biomicroscopy: Ciliary body medulloepithelioma. *Acta Ophthalmologica Scandinavica* 84, 137-139

ZHOU Y. Q., FOSTER F. S., NIEMAN B. J., DAVIDSON L., CHEN X. J. & HENKELMAN R. M. (2004) Comprehensive transthoracic cardiac imaging in mice using ultrasound biomicroscopy with anatomical confirmation by magnetic resonance imaging. *Physiological Genomics* 18, 232-244

ZHOU Y. Q., FOSTER F. S., QU D. W., ZHANG M., HARASIEWICZ K. A. & ADAMSON S. L. (2002) Applications for multifrequency ultrasound biomicroscopy in mice from implantation to adulthood. *Physiological Genomics* 10, 113-126

ZWIEBEL W. J., MOUNTFORD R. A., HALLIWELL M. J. & WELLS P. N. (1995) Splanchnic blood flow in patients with cirrhosis and portal hypertension: Investigation with duplex Doppler US. *Radiology* 194, 807-812

### **Enlaces web**

Centers for Disease Control and Prevention. USA Government:  
<http://wonder.cdc.gov/mortSQL.html>

European Cardiovascular Disease Statistics 2005 edition:  
[http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/excelencia/cancer-cardiopatia/CARDIOPATIA/opsc\\_est3.pdf.pdf](http://www.msc.es/organizacion/sns/planCalidadSNS/pdf/excelencia/cancer-cardiopatia/CARDIOPATIA/opsc_est3.pdf.pdf)

Instituto Nacional de Estadística, Gobierno de España. Defunciones según la causa de muerte 2008:  
<http://www.ine.es/jaxi/tabla.do?path=/t15/p417/a2008/l0/&file=01004.px&type=pcaxis&L=0>

NCHS U.S. Decennial Life Tables for 1989-91:  
[http://www.cdc.gov/nchs/data/lifetables/life89\\_1\\_4.pdf](http://www.cdc.gov/nchs/data/lifetables/life89_1_4.pdf)