



Hallazgos anatomopatológicos durante el desarrollo de la miocardiopatía diabética en la rata

RESUMEN

Antecedentes: la miocardiopatía diabética ocurre en ambos tipos de diabetes mellitus y en su patogenia intervienen la hiperglucemia y los cambios metabólicos asociados.

Objetivo: caracterizar los diferentes cambios patológicos que aparecen durante la evolución de la miocardiopatía diabética en la rata.

Material y métodos: estudio transversal comparativo en dos grupos de ratas diabéticas por la administración de estreptozotocina. A los 14, 21 y 30 días de la administración del tóxico se obtuvieron los corazones, que se colocaron en p-formaldehído al 4%. Se efectuaron cortes de 5 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina, tricrómica de Masson e inmunocitoquímica con anticuerpos anti β -tubulina.

Resultados: a los 14 días de la aplicación de la estreptozotocina se observaron en el miocardio sinusoides dilatadas y depósito de colágena entre las fibras de Purkinje e intersticio cardiaco. A los 21 días disminuyó la luz arteriolar por hiperplasia de la capa media. A los 30 días del estudio se hicieron más evidentes los sinusoides cardiacos y los depósitos de colágena y un importante desarreglo del sistema microtubular de los cardiomiocitos.

Conclusiones: los sinusoides cardiacos, que representan un patrón vascular fetal y la fibrosis intersticial en el miocardio y el desarreglo microtubular de los cardiomiocitos, apoyan el hecho de que el mecanismo fisiopatológico de la miocardiopatía diabética se inicia en la microcirculación coronaria debido a cambios en el metabolismo cardiaco que contribuyen a la disfunción miocárdica durante el estado diabético.

Palabras clave: miocardiopatía, diabetes mellitus, sinusoides cardiacos, colágena.

Anatomopathological findings during development of diabetic cardiomyopathy in rats

ABSTRACT

Background: The diabetic cardiomyopathy occurs in both type 1 and type 2 diabetes mellitus. Hyperglycemia and associated metabolic changes participate in the pathogenesis of this disease.

Gabriel Manjarrez-Gutiérrez¹
Victor Hernández-Chávez²
Teresa Neri-Gómez¹
Alfonso Boyzo-Montes de Oca³
José Antonio Mondragón-Herrera¹
Jorge Hernández-Rodríguez³

¹Unidad de Investigación Biomolecular del Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

²Departamento de Patología, Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social.

³Departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, Instituto Politécnico Nacional.

Recibido: 13 de junio 2013

Aceptado: 7 de octubre 2013

Correspondencia

Dr. Gabriel Manjarrez-Gutiérrez
Unidad de Investigación Biomolecular
Hospital de Cardiología
Centro Médico Nacional Siglo XXI
Av. Cuauhtémoc 330
06720 México DF
Tel.: (55) 56276900, Ext. 22156. Fax: (55) 55780240
willisga@prodigy.net.mx o gmanjarrezg@gmail.com

Objective: To characterize various pathological changes occurring during the development of diabetic cardiomyopathy in rats.

Methods: Diabetic rats were used for streptozotocin administration. At 7, 14, 21 and 30 days after toxic administration, the heart was obtained and placed in a Hartman solution and 4% p-formaldehyde. Five- μ m-thick sections were stained with hematoxylin-eosin, Masson trichrome and immunocytochemistry using anti- β -tubulin antibody.

Results: At 14 days after application of streptozotocin, dilated sinusoids with endothelial lining in the myocardium and collagen deposits in the cardiac interstitium and between the Purkinje fibers were observed. At 21 days there was a slight decrease of the arteriolar lumen due to hyperplasia of the medial layer. It is important to note that cardiac sinusoids as well as collagen deposits became more evident at 30 day of the study, as well as a major derangement of the microtubular system of the cardiomyocytes.

Conclusions: Cardiac sinusoids representing fetal vascular pattern and interstitial fibrosis in the myocardium and the microtubular derangement of cardiomyocytes support the fact that the pathophysiological mechanism of diabetic cardiomyopathy begins in the coronary microcirculation due to changes in cardiac metabolism, contributing to the development of myocardial dysfunction in diabetes.

Key words: Cardiomyopathy, diabetes mellitus, cardiac sinusoids, collagen.

ANTECEDENTES

En la actualidad, en los pacientes diabéticos la enfermedad cardiovascular es la principal causa de morbilidad y mortalidad. La diabetes tipo 2 aumenta el riesgo de enfermedad coronaria y es causa de 50% de las muertes en estos pacientes, y 25% en los diabéticos tipo 1.¹⁻³ Se ha observado en pacientes diabéticos normotensos y sin enfermedad arterial coronaria que, con frecuencia, tienen disfunción ventricular izquierda.⁴⁻⁹ Estos hallazgos han permitido plantear la existencia de miocardiopatía diabética o enfermedad muscular cardíaca diabética,⁴⁻⁹ lo que podría explicar la mayor incidencia de insuficiencia cardíaca en estos pacientes y peor pronóstico luego de un infarto agudo de miocardio.³

La miocardiopatía diabética ocurre en ambos tipos de diabetes mellitus; en la patogenia de esta enfermedad intervienen la hiperglucemia y los cambios metabólicos asociados. La ausencia de insulina en el corazón disminuye la utilización de glucosa por los cardiomiocitos, que se acompaña de menor producción de energía.⁴⁻¹¹ Esto desencadena el aumento del metabolismo de los cuerpos cetónicos y de los lípidos como mecanismos compensadores de la producción de energía para la función cardíaca. En la miocardiopatía diabética también se ha observado una acumulación intracelular de metabolitos de oxidación de los ácidos grasos y disminución del transporte de calcio extracelular y, consecuentemente, alteraciones en el proceso de acoplamiento electromecánico cardíaco.⁵⁻¹¹



La miocardiopatía diabética se define como la enfermedad del miocardio que se observa en los pacientes diabéticos no relacionada con la aterosclerosis de los grandes vasos coronarios y se caracteriza, fundamentalmente, por disfunción ventricular izquierda que afecta la función diastólica. A su aparición contribuyen la rigidez y pérdida del rendimiento ventricular, quizá debido al aumento de la fibrosis miocárdica, alteraciones de la microvasculatura coronaria, cambios estructurales de la colágena, y alteraciones en el sarcolema del retículo sarcoplásmico y en las miofibrillas del músculo cardíaco.⁴⁻⁹ La diabetes mellitus es un estímulo independiente para el inicio de la hipertrofia ventricular izquierda, efecto que se ve magnificado por la hipertensión arterial. Varios estudios epidemiológicos sugieren que la hipertrofia ventricular izquierda es un factor predictivo de eventos cardiovasculares en pacientes diabéticos.⁷ El objetivo de este estudio es: caracterizar los diferentes cambios anatómopatológicos que suceden durante la evolución de la miocardiopatía diabética en la rata a través de diferentes técnicas histológicas y determinar la citoarquitectura de los cardiomiocitos por medio de anticuerpos contra β -tubulina.

MATERIAL Y MÉTODOS

Estudio transversal comparativo efectuado en dos grupos de ratas macho, cepa Wistar de 250 ± 10 g. Las ratas se obtuvieron del bioterio del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (IPN) (CINVESTAV-IPN). El protocolo fue autorizado por el Comité de Investigación y de Ética del Hospital de Cardiología, Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social (CMN-SXXI, IMSS). El manejo general de los animales de experimentación se efectuó en la Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio (UPEAL) del CINVESTAV-IPN, siguiendo las normas sanitarias y de ética del Comité Interno para el Cuidado y Uso

de los Animales de Laboratorio (CICUAL), con apego a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999), publicada en el Diario Oficial de la Federación el 22 de agosto del 2001.

Las ratas permanecieron en condiciones ambientales estándar de bioterio durante dos semanas, con un clima controlado $22 \pm 2^\circ\text{C}$, periodos de luz y oscuridad de 12 horas, humedad relativa de 50 a 60% y la manipulación fue mínima. Durante este periodo las ratas se alimentaron con la dieta Lab Diet 5P14 para roedores (PMI Feeds Inc., Richmond, IN, U.S.A.) y agua *ad libitum*. La composición de la dieta es con 23% proteínas, 56.9% carbohidratos, 4.5% grasa, 6% fibra y 8% cenizas, levadura de caraccoria, vitaminas y minerales (lisina, tiamina, alfa-tocoferol, calcio, sulfato ferroso, manganeso, entre otros micro nutrientes), que proporciona una densidad calórica de 4.05 kcal/gramo de alimento.

En dos grupos de ratas se efectuó un estudio transversal comparativo, el primero fue el grupo con diabetes mellitus inducida en 50 ratas mediante la administración i.p de estreptozotocina (Sigma Chemical Co. St Louis, USA) a razón de 60 mg/kg de peso corporal diluida en una solución amortiguadora de citrato 0.1 M, pH 4.5 y 30 ratas controles (grupo C) a las que sólo se les efectuaron las mismas manipulaciones que a las ratas del grupo con diabetes mellitus. A los dos grupos se les alimentó con un régimen de nutrición y agua a libre demanda.

A los 14, 21 y 30 días después de la administración de estreptozotocina se sacrificaron los animales de ambos grupos por luxación cervical. Se disecaron los corazones, que se lavaron con una solución Hartman durante tres ocasiones. Después, los corazones se colocaron en una solución de p-formaldehído al 4% y una solución amortiguadora de fosfatos 0.1 M, pH 7.4 durante una semana. Además, se les tomó sangre para determinar las concentraciones de glucosa

plasmática. Para disminuir la variación circadiana, la obtención de la sangre y la disección del corazón siempre se realizaron entre las 9:00 y 11:00 horas. También se les determinó el peso corporal y la ingesta de alimento en 24 horas. Las interpretaciones microscópicas de los cortes histológicos de las ratas con diabetes mellitus y controles no se realizaron en forma cegada por el médico especialista en Patología cardiovascular

Ensayo bioquímico

La glucosa en el plasma se midió por el método espectrofotométrico de la glucosa oxidasa.¹²

Ensayos histológicos

Técnica de hematoxilina y eosina

Los cortes del corazón se desparafinaron e hidrataron y después se colocaron en hematoxilina de Meyer's durante 6 a 15 minutos. Enseguida, las laminillas con el tejido cardiaco se lavaron con agua durante 2 a 5 minutos. A continuación los cortes se colocaron en una solución de alcohol ácido al 1%, se lavaron con agua y luego se cambiaron a agua amoniacal. De nuevo, los cortes se lavaron con agua bidestilada y contrastaron con eosina Y dos veces. Las laminillas con los cortes del corazón se deshidrataron y aclararon. Al final, las laminillas se montaron con resina sintética.¹³ Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio Zeiss, adaptado con una cámara digital Coolpix 995, Nikon.

Técnica de tricómico de Masson

Los cortes del corazón se desparafinaron e hidrataron con agua bidestilada. Enseguida se colocaron en una solución de Bouin durante 30 minutos; al término, los cortes se lavaron con agua corriente hasta desaparecer el color amarillo. Después, los cortes se colocaron en una solución de hematoxilina de Weiger durante

10 minutos, y se lavaron con agua corriente hasta eliminar el exceso del colorante. Posteriormente se tiñeron con escarlata de Biebrich durante 15 minutos; al término, nuevamente se lavaron con agua para eliminar el exceso del colorante. Enseguida se colocaron en ácido fosfotúngstico y fosfomolibdico durante 15 minutos. A continuación se tiñeron con azul de anilina durante 10 minutos, se lavaron y deshidrataron para después montarlos con resina sintética.¹³ Las fotomicrografías se tomaron con un microscopio Zeiss adaptado con una cámara digital Coolpix 995, Nikon.

Inmunocitoquímica para β -tubulina

Los corazones se fijaron con p-formaldehído al 4% en una solución amortiguadora de fosfatos. Después, se deshidrataron y colocaron en parafina para obtener cortes de 5 μ m de grosor, a continuación los cortes se colocaron en portaobjetos cubiertos de poli L-lisina al 10%. Después de desparafinarlos se procedió al desmascaramiento antigénico por medio de una solución amortiguadora de citratos 0.1 M, pH 6.0 (DECLERE, Cell Marque) en un horno de microondas durante tres ciclos de 2 minutos. Enseguida, los cortes se lavaron con solución amortiguadora de fosfatos-salino durante 5 minutos. Después se colocaron en una solución de bloqueo constituida de suero de caballo al 5%, Tween 20 (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) al 0.1% diluidos en una solución amortiguadora de fosfatos-salino durante una hora a temperatura ambiente. Después de retirar la solución de bloqueo con el anticuerpo primario monoclonal específico para β -tubulina a una dilución de 1:500 (anti β -tubulina, Chemicon, USA) durante 18 horas a 4° C. Al día siguiente se lavaron e incubaron con el anticuerpo secundario anti-mouse Alexa 568 (Invitrogen, Eugene, Oregon, USA), en una dilución de 1:250 en una solución amortiguadora de fosfatos-salino, durante una hora a temperatura ambiente. Al término de la incubación se lavaron de nuevo con la solución



amortiguadora de fosfatos-salino tres ocasiones por espacio de 5 minutos. Al término del lavado se colocaron en un medio de montaje Vectashield con DAPI (Vector, Burlingame, USA).¹⁴ Las fotomicrográficas se tomaron con un microscopio de fluorescencia Zeiss Axiophot 2, equipado con un sistema de análisis LSMS imagen Browser.

Análisis estadístico

Para comparar los resultados de la concentración de glucosa en el plasma, peso corporal e ingestión de alimento en los diferentes tiempos después de la administración de estreptozotocina, primero se obtuvieron los promedios y las desviaciones estándar de cada uno de ellas. Después, se compararon con ANOVA de dos vías (tiempo de administración del tóxico y tratamiento) y para la significación entre los grupos se empleó la prueba *t* de Student porque los valores mostraron una distribución normal, se aceptó un nivel de significación de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Se confirmó que la administración de estreptozotocina a las ratas elevó significativamente la concentración de glucosa plasmática a partir del día 14 después de la aplicación del tóxico en comparación con las ratas que no recibieron el tóxico (grupo C) ($p < 0.001$) (Cuadro 1).

En relación con el peso corporal siempre fue significativamente menor en el grupo con diabetes mellitus a partir del día 14 de la aplicación de estreptozotocina ($p < 0.001$), el déficit fue de 37, 56 y 60% a los 14, 21 y 30 días, respectivamente, en comparación con el grupo C (Cuadro 2).

En el (Cuadro 3) se muestra la cantidad de alimento consumida por las ratas diabéticas en 24 horas. El grupo con diabetes mellitus consumió más alimento que el grupo C durante el periodo estudiado ($p < 0.001$).

Cuadro 1. Concentración de glucosa en el plasma de rata control (C) y diabética (D)

Días Post-administración de STZ	C	D
1	5.78 ± 0.15	5.60 ± 0.13
14	5.76 ± 0.47	35.00 ± 0.62
21	5.50 ± 0.36	35.44 ± 1.74
30	5.30 ± 0.15	37.14 ± 1.24

Cada punto corresponde a los valores promedio (mmol/L) ± desviación estándar de 16 ratas en cada uno de los días postadministración de STZ. Las muestras fueron efectuadas por duplicado. F= 196.1, DFn= 6, DFd= 36.

^d $p < 0.001$.

ANOVA y *t* de Student.

ZTZ = estreptozotocina

Cuadro 2. Peso corporal de rata control (C) y diabética (D)

Días Post-administración de STZ	C	D
1	255.0 ± 2.50	252.0 ± 250
14	302.5 ± 2.40	190.0 ± 3.80 ^d
21	333.8 ± 3.59	151.6 ± 4.20 ^d
30	363.8 ± 5.59	141.6 ± 5.10 ^d

Cada punto corresponde a los valores promedio (g) ± desviación estándar de 16 ratas en cada uno de los días postadministración de STZ. F= 15.82, DFn= 6, DFd= 36.

* $p < 0.001$.

ANOVA y *t* Student

STZ= estreptozotocina.

Cuadro 3. Ingesta de alimento en 24 horas en rata control (C) y diabética (D)

Días Post-administración de STZ	C	D
1	25.16 ± 0.44	25.50 ± 0.86
14	26.33 ± 0.33	45.10 ± 1.50*
21	26.50 ± 0.28	47.92 ± 1.42*
30	26.70 ± 0.40	46.76 ± 2.10*

Cada punto corresponde a los valores promedio (g) ± desviación estándar de 16 ratas en cada uno de los días postadministración de STZ. F= 15.82, DFn= 6, DFd= 36.

* $p < 0.001$.

ANOVA y *t* Student.

STZ: estreptozotocina.

En la (Figura 1) se muestra el miocardio de las ratas controles que se observa compactado al inicio de la administración de la estreptozotocina; sin embargo, a los 14 días de la administración del tóxico se observan hendiduras vasculares similares a los sinusoides, con revestimiento endotelial, ubicados en el miocardio. A los 30 días de evolución del cuadro diabético los sinusoides aumentaron en número y se observaron dilatados y congestionados (ver flechas).

En la Figura 2 se ve que a los 14 días después de la administración de estreptozotocina existió un mínimo y focal depósito de colágena en el intersticio del miocardio y entre las fibras de Purkinje.

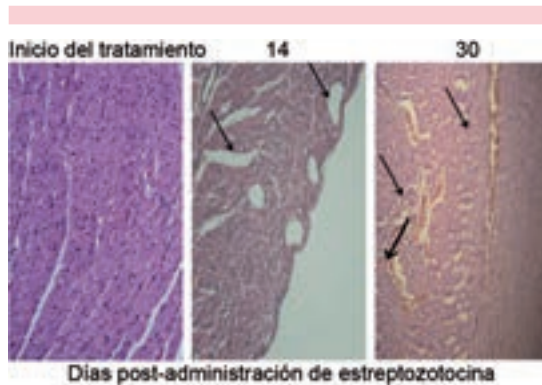


Figura 1. Microfotografías de cortes de corazón de ratas diabéticas teñidas con hematoxilina-eosina (10x).



Figura 2. Microfotografías de cortes de corazón de ratas diabéticas teñidos con la técnica de Masson (10x).

A los 21 días se observaron mínimos cambios histológicos de las arteriolas intracardiacas caracterizados por hiperplasia focal de la capa media. Es importante señalar que a los 30 días de evolución del cuadro diabético se observó un incremento difuso de las fibras de colágena en el intersticio del miocardio (ver flechas).

Para determinar si la diabetes mellitus origina cambios estructurales en el citoesqueleto de los cardiomiocitos se incubaron cortes de corazón con anticuerpos contra β -tubulina, componente mayor del sistema microtubular. La Figura 3 muestra un importante cambio del patrón de distribución de la β -tubulina en ratas diabéticas a los 30 días después de la administración de estreptozotocina (ver flechas).

DISCUSIÓN

Se confirma nuevamente que la administración de estreptozotocina produce diabetes mellitus

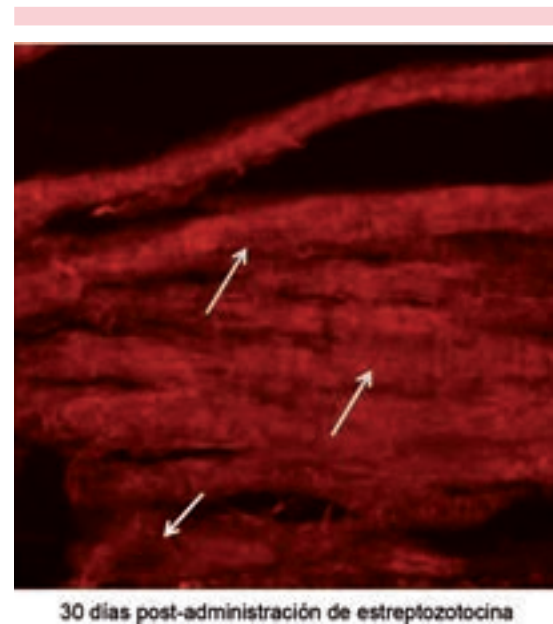


Figura 3. Inmunofluorescencia de β -tubulina en cortes del miocardio (100x).



debido a la ausencia de insulina circulante que, a su vez, es resultado de la destrucción de más de 80% de las células β de los islotes del páncreas.¹⁵⁻¹⁹ Además, los resultados del peso corporal observado en estos animales diabéticos apoyan el hecho de que durante la evolución del estado diabético se produce una desnutrición crónica, quizá debido a la disminución de los procesos anabólicos mediados por la insulina, independientemente de que los animales diabéticos tuvieron un alto consumo de alimento.¹⁷

Los hallazgos más importantes fueron los cambios en los pequeños vasos sanguíneos del miocardio que se demostraron desde etapas tempranas de la enfermedad, la existencia de un patrón vascular de tipo sinusoidal que se incrementó significativamente con la evolución del estado diabético. Los sinusoides cardiacos en el miocardio diabético representan un patrón vascular fetal, similar a lo que se observa durante el desarrollo temprano del corazón, donde la perfusión miocárdica se realiza directamente desde la cavidad ventricular y donde la sangre es enviada a un miocardio esponjoso formado por una red sinusoidal en contacto con los miocardiocitos.^{20,21} Una vez que se ha completado el proceso de vasculogénesis y la compactación del miocardio, los sinusoides fetales desaparecen.²⁰ La persistencia de estos sinusoides se ha descrito en neonatos humanos con cardiopatías congénitas complejas.^{22,23} Sin embargo, estos sinusoides en el corazón adulto normal son muy infrecuentes y su significado se desconoce.²¹ Así, pues, el patrón vascular fetal en el miocardio diabético podría ser la consecuencia de repetidos episodios de isquemia transitoria, como resultado de las anomalías funcionales de los pequeños vasos sanguíneos durante el incremento de las demandas energéticas de los cardiomiocitos a lo largo del estado diabético.^{24,25} Además, es importante hacer notar que no se observaron datos anatomopatológicos de microangiopatía en arteriolas, ni arterioesclerosis hialina. Por lo

tanto, las alteraciones estructurales de los pequeños vasos sanguíneos junto con los cambios en el sustrato metabólico del miocardio, juegan un papel principal en el desarrollo temprano de la miocardiopatía diabética.^{10,11,24-29}

En el miocardio de los animales diabéticos también se demostraron depósitos de fibras de colágena dispuestos como haces que cruzan el intersticio y se ubicaron alrededor de los vasos sanguíneos intramiocárdicos; además, en la pared del ventrículo izquierdo y en las fibras de Purkinje se encontraron acumulaciones de fibras de colágena (Figura 2). Asimismo, se observó que los depósitos de fibras de colágena se incrementaron significativamente durante la evolución de la miocardiopatía diabética. Estos hallazgos podrían ser resultado del incremento en la síntesis de colágena por los fibroblastos o miofibroblastos, o la disminución o ausencia de la degradación de la colágena por las metaloproteinasas de la matriz intersticial.³⁰⁻³² Durante la evolución de la diabetes mellitus se activan diferentes factores solubles localizados en el intersticio miocárdico, entre ellos el péptido natriurético tipo B, el sistema renina-angiotensina, que se asocian con el daño oxidativo a los cardiomiocitos que, de esta forma, contribuyen al aumento de la fibrosis intersticial miocárdica.³³⁻³⁶ Por lo tanto, la cantidad de depósito de fibras de colágena en el miocardio se relaciona inversamente con el número de cardiomiocitos y, directamente, con el tiempo de evolución de la miocardiopatía diabética.

La insulina es un importante regulador de la organización y función del citoesqueleto celular. La ausencia crónica de insulina desorganiza la red de los microfilamentos de actina y de los microtúbulos.^{9,36-39} En este trabajo los autores observamos que los cardiomiocitos de los animales diabéticos mostraron un importante desarreglo de la β -tubulina, componente principal del sistema microtubular del citoplasma (Figura 3).

Estos resultados son similares a lo reportado por otros autores.⁹

CONCLUSIONES

Los sinusoides cardiacos representan un patrón vascular fetal y la fibrosis intersticial en el miocardio y el desarreglo morfo-estructural de los cardiomiocitos apoyan el hecho de que el mecanismo fisiopatológico de la miocardiopatía diabética se inicia en la microcirculación coronaria debido a cambios en el metabolismo cardiaco que inducen una regresión en la estructura vascular del corazón a patrones fetales, lo que contribuye al inicio de la disfunción miocárdica durante el estado diabético.

Agradecimientos

Este trabajo se efectuó gracias al apoyo financiero otorgado por el Instituto Mexicano del Seguro Social (FIS/IMSS/PROT/G09/7755).

Referencias

1. Cases A. Enfermedad macro y microvascular en diabetes mellitus tipo 2. *Nefrología* 2002;22:406-411.
2. Taegtmeyer H, McNulty P, Young ME. Adaptation and Maladaptation of the Heart in Diabetes: Part I: General Concepts. *Circulation* 2002;105:1727-1733.
3. Thierer J. Insuficiencia cardiaca y diabetes. *Rev Argent Cardiol* 2006;74:60-67.
4. Frustaci A, Kajstura J, Chimenti C, Jakoniuk I, Leri A, Maseri A, et al. Myocardial Cell Death in Human Diabetes. *Cir Res* 2000;87:1123-1132.
5. Nessler J, Skrzypek A. Diabetic cardiomyopathy: current views on the diagnosis and treatment. *Folia Cardiol* 2006;13:550-556.
6. Bell DSH. Diabetic Cardiomyopathy. *Diabetes Care* 2003;26:2949-2951.
7. Galderisi M. Diastolic Dysfunction and Diabetes Cardiomyopathy. Evaluation by Doppler Echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1548-1551.
8. Batista Álvarez ME, Lice Puig M. Enfermedad Muscular Cardiaca Diabética. *Rev Cubana Endocrinol* 1988;9:132-148.
9. Shimoni Y, Rattner JB. Type 1 diabetes leads to cytoskeleton changes that are reflected in insulin action on rat cardiac K⁺ currents. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2001;281:E575-E585.
10. Ding An D, Brian Rodrigues. Role Changes in cardiac metabolism in development of diabetic cardiomyopathy. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;291:H1489-H1506.
11. van den Brom CE, Huisman MC, Vlasblom R, Boontje NM, Duijst S, Lubberink M, et al. Altered myocardial substrate metabolism is associated with myocardial dysfunction in early diabetic cardiomyopathy in rats: studies using positron emission tomography. *Cardiovascular Diabetology* 2009;8:1-12.
12. Bentley R. Glucose oxidase. In: Boyer PD, Lardy H, Myrback K. (eds). *The Enzymes*. 2nd ed. Vol 7. New York: Academic Press, 1963;567-586.
13. Prophet Edna. *Laboratory Methods in Histotechnology*. Armed Forces Institute of Pathology, USA 1992;53-57, 132-133.
14. Kumar LG, Rudbeck L. *Education Guide. Immunohistochemical Staining Methods*. Fifth Edition. Dako North America. Carpintería, California, USA, 2009;35-42 and 51-60.
15. Like AA, Rossine AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science* 1976;193:415-417.
16. Manjarrez GG, Herrera MR, Molina HA, Bueno SS, González RM, Hernandez RJ. Alteraciones en la síntesis de serotonina cerebral inducidas por diabetes mellitus insulino-dependiente. *Rev Invest Clin* 1999;51:293-302.
17. Manjarrez GG, Herrera MJR, Bueno SS, González RM, Hernández RJ. Cambios en la biosíntesis de serotonina cerebral en ratas con diabetes mellitus inducida por estreptozotocina: efecto del tratamiento. *Rev Invest Clin* 2000;52:509-516.
18. Herrera R, Manjarrez G, Hernández J. Inhibition and kinetic changes of brain tryptophan-5-hydroxylase during insulin-dependent diabetes mellitus in the rat. *Nutr Neurosci* 2005;8:57-62.
19. Vicario J, Licheri A, Gerardo L, Lofeudos C. Sinusoides y fistulas coronarias a cavidad ventricular izquierda. Presentación de un caso. *Rev Fed Arg Cardiol* 2004;33:236-239.
20. Reese DE, Mikawa T, Bader DM. Development of the Coronary Vessel System. *Circ Res* 2002;91:761-768.
21. Störk T, Möckel M, Eichstädt H. Persistent myocardial sinusoids of the left ventricle. *Am J Cardiol* 2002;89:489.
22. Pereira JR, Burgueros M, Esteban I, García-Guereta L, Rubio MD, Álvarez-Ferreira FJ. Atresia pulmonar con septo íntegro asociada a estenosis aórtica severa. *Rev Esp Cardiol* 2003;56:1235-1238.
23. Hausdorf G, Grävimphoff L, Keck EW. Effects of persisting myocardial sinusoids on left ventricular performance in pulmonary atresia with intact ventricular septum. *Eur Heart J* 1987;8:91-296.
24. Pitkänen OP, Nuutila P, Raitakari OT, Rönne T, Koskinen PJ, Lida H, et al. Coronary flow reserve is reduced in young men with IDDM. *Diabetes*. 1998;47:248-254.



25. Cosyns B, Droogmans S, Hernot S, Degallier C, Garbar C, Weytjens C, et al. Effect of streptozotocin-induced diabetes on myocardial blood flow reserve assessed by myocardial contrast echocardiography in rats. *Cardiovas Diabetol* 2008;7:26.doi:10.1186/1475-2840-7-26.
26. Frang ZY, Prins JB, Marwick TH. Diabetic cardiomyopathy: evidence, mechanisms, and therapeutic implications. *Endocr Rev* 2004;25:543-567.
27. Carly AN, Severson DL. Fatty acid metabolism is enhanced in type 2 diabetes hearts. *Biochim Biophys Acta* 2005;1734:112-126.
28. Bell DS. Diabetic cardiomyopathy: A unique entity or a complication of coronary artery disease? *Diabetes Care* 1995;18:708-714.
29. Spector KS. Diabetic Cardiomyopathy. *Clin Cardiol* 1998;21:885-887.
30. Codinach Huix P, Freixa Pamias R. Miocardiopatía diabética: concepto, función cardíaca y patogenia. *An Med Interna (Madrid)* 2002;19:313-320.
31. Clausell N, Kalil P, Biolo A, Molossi S, Azevedo M. Increased Expression of Tumor Necrosis factor- α in Diabetic Macrovascular Pathology. *Cardiovasc Pathol* 1999;8:145-151.
32. Shimizu M, Umeda K, Sugihara N, Yoshio H, Ino H, Takeda R, et al. Collagen remodelling in myocardia of patients with diabetes. *J Clin Pathol* 1993;46:32-36.
33. Boudina S, Abel ED. Diabetic Cardiomyopathy Revisited. *Circulation* 2007;115:3213-3223.
34. Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, et al. Attenuation by Metallothionein of Early Cardiac Cell Death via Suppression of Mitochondrial Oxidative Stress Results in a Prevention of Diabetic Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2006;48:1688-1697.
35. Christoffersen C, Hunter I, Jensen LA, Goetze PJ. Diabetes and the endocrine heart. *Eur Heart J* 2007;28:2427-2429.