

1. Hipótesis.

La constatación en trabajos previos de una reducción en el contenido miocárdico de GMPc tras la reperfusión(147), así como la evidencia de que la estimulación de la síntesis de GMPc tiene efectos inhibitorios de la contractilidad, reduciéndose el grado de desarrollo de hipercontractura en miocitos aislados sometidos a anoxia y reoxigenación(98), hizo que nos planteásemos que la estimulación de la síntesis de GMPc *in vivo* podría, al atenuar la depleción del contenido miocárdico de GMPc en la reperfusión inicial, conseguir una reducción del tamaño del infarto tras isquemia transitoria, y que este efecto sería independiente de la actividad de los PMN en el miocardio reperfundido.

2. Objetivos.

Con estas premisas, se planificaron una serie de experimentos, fundamentalmente en un modelo de corazón porcino *in situ*, en los que se potenciaría la síntesis de GMPc mediante la estimulación de la guanilil-ciclasa soluble y particulada, al tiempo que se sometería a los animales a un protocolo de isquemia y reperfusión regional del miocardio. Los objetivos principales serían los siguientes:

- a) Confirmar en un modelo de corazón porcino *in situ* sometido a isquemia y reperfusión, que existe una depleción en el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido, como se había observado previamente en modelos de corazón aislado de rata (147).
- b) Documentar si maniobras dirigidas a evitar esta depleción del contenido miocárdico de GMPc en la reperfusión inicial, consiguen disminuir el tamaño del infarto en un modelo de corazón porcino *in situ* sometido a isquemia miocárdica transitoria.

Para contestar a estas preguntas, en los experimentos a realizar se pretendería:

- Observar el efecto que sobre el tamaño del infarto tendría la administración de L-arginina (precursor del óxido nítrico), cuando ésta se administra antes de un período de isquemia

transitoria, confirmando así los resultados previamente obtenidos por L.Agulló et al en otro modelo(102).

- Intentar discernir si el posible efecto protector de la administración de L-arginina frente al daño por reperfusión en nuestro modelo de corazón porcino *in situ*, dependía del acúmulo de PMN o, por el contrario, se debía a efectos directos sobre los cardiomiocitos.
- Observar si era igualmente posible estimular la síntesis de GMPc directamente (de forma independiente del óxido nítrico) mediante la estimulación de la guanilil-ciclasa particulada, en un modelo de corazón porcino *in situ* sometido a isquemia miocárdica transitoria. Para ello se administraría el péptido natriurético atrial urodilatina, que previamente había mostrado efectos beneficiosos en el corazón aislado de rata cuando se administraba durante la reperfusión(147).
- Correlacionar el efecto de la administración de urodilatina en cuanto a su capacidad para modificar el tamaño del infarto, con sus efectos sobre las concentraciones de GMPc miocárdico, tanto en el modelo de corazón porcino *in situ* sometido a isquemia regional y reperfusión, como en un modelo de corazón aislado de rata sometido a isquemia global y reperfusión.
- Finalmente, si estas dos estrategias de estimulación de la síntesis de GMPc en el miocardio reperfundido (administración de L-arginina como precursor del óxido nítrico, y administración de urodilatina) eran eficaces reduciendo el tamaño del infarto que sigue a una oclusión coronaria transitoria, se podría revisar en este mismo modelo la controversia, no cerrada, sobre el uso de nitratos en la fase aguda del infarto de miocardio. Éste es, además, un punto de un interés clínico importante, ya que parte de la población de pacientes que sufre un infarto agudo de miocardio se encuentra bajo tratamiento con nitratos previo, o los recibe en fase aguda, ya sea por seguir una práctica muy extendida, o como tratamiento antianginoso o antihipertensivo. Así pues, en último término, se estudiaría en el modelo de corazón porcino *in situ*, sometido a isquemia regional transitoria,

el efecto que sobre el tamaño del infarto puede tener la administración de 5-mononitrato de isosorbide (fármaco utilizado en los estudios multicéntricos ISIS-4(146) y GISSI-3(145)).

Métodos

1. Animales.

Los animales se manejaron de acuerdo con las “*Guías para el cuidado y uso de los animales de laboratorio*” publicadas por la “US National Institutes of Health” (NIH *Publication* No. 85-23, *revised* 1996). Todos los procedimientos experimentales fueron aprobados por la Comisión de Investigación de los Hospitales Vall d’Hebron.

En el conjunto de experimentos correspondientes al modelo de corazón porcino *in situ* se utilizaron un total de 108 cerdos de granja (Large White) con una edad media de 15 semanas, y con un peso que estaba comprendido entre los 30 y 45 Kg. Para el estudio de los efectos de la administración de urodilatina a diferentes concentraciones, se practicaron experimentos en corazón aislado de rata suspendidos en un sistema de Langendorff. Para estos experimentos se utilizaron 58 ratas (Sprague-Dawley) macho con un peso comprendido entre los 300 y 350 gramos.

2. Instrumentación y monitorización.

2.1. Modelo de corazón aislado de rata.

Los animales eran anestesiados profundamente mediante una inyección intraperitoneal de tiopental sódico (150 mg/Kg). Inmediatamente después se practicaba una toracotomía amplia que exponía el corazón y ambos pulmones. Los corazones se extraían del tórax y se suspendían en un sistema de Langendorff, siendo perfundidos retrógradamente, a través de la aorta, con una solución tampón bicarbonatada Krebs-Henseleit (KHB) a 37 °C con una presión constante de 60 mmHg. La presión del VI se monitorizó a través de un balón de látex lleno de suero fisiológico, que se conectaba al extremo de un catéter de coronaria Williams 5F (Cordis, Roden, The Netherlands) y se introducía en el ventrículo izquierdo, a través de una incisión en la aurícula izquierda. El sistema se conectaba a un transductor de presión (PX600F, Baxter Healthcare Corp., CA, USA) y su señal se amplificaba y digitalizaba a 100 Hz por canal mediante un procesador de señales *PowerLab* (SP16 Hardward, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Las señales se monitorizaban de forma continua y quedaban almacenadas digitalmente para su posterior análisis, gracias al software comercial Chart for Windows v3.4.6

(ADInstruments Pty Ltd). Se definía la presión desarrollada del VI (PdVI) como la diferencia entre la presión pico del VI y la presión telediastólica del VI.

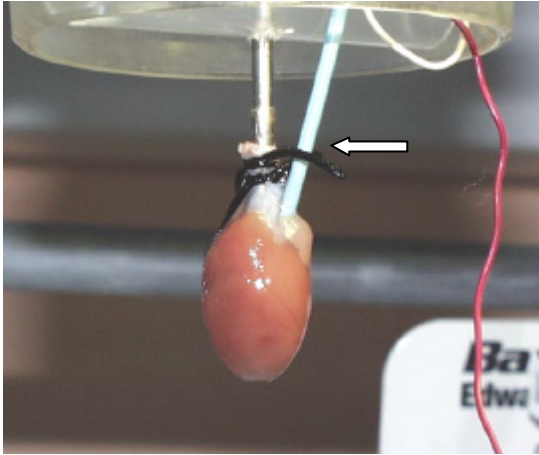


Figura 9. Imagen de un corazón aislado de rata en la preparación de Langendorff. Está suspendido por la Aorta. La flecha blanca señala un catéter 5F que se introduce en el ventrículo izquierdo a través de la aurícula izquierda y en cuyo extremo tiene un balón con suero fisiológico, que se conectará a un transductor de presión.

2.2. Modelo de corazón porcino *in situ*.

Los animales se mantenían en ayunas las 12 horas previas a la intervención. El día de la intervención, se premedicaban con 10 mg/Kg de peso de azaperona (Stresnil®, Janssen Pharmaceutica) administrada vía intramuscular 30 minutos antes de entrar el animal al quirófano(162). Una vez en el quirófano se cateterizó una vena del pabellón auricular de los animales para administrar tiopental (Tiobarbital®, Braun Medical) 30 mg/Kg en bolo, induciendo anestesia(162). Los animales eran intubados orotraquealmente y ventilados mecánicamente a aire ambiente mediante un respirador mecánico (Bennet MA-1B, Bennet Respiration Products Inc., Santa Monica, CA., EEUU). La vena mamaria derecha se disecó y cateterizó con un catéter venoso (Abbocath® 20G, Abbott, Sligo, Irlanda). A través de este catéter, y para mantener la anestesia, se infundió una solución de tiopental al 0.2 %, a dosis de 0.30 a 0.45 mg/Kg/min. Seguidamente se procedió a cateterizar una arteria y vena femorales del animal percutáneamente mediante técnica de Seldinger, utilizando para ello introductores del 5F (Fast-Cath, Daig Corporation, Minnetonka, MN, EEUU). Para cateterizar la arteria se puncionaba por debajo del ligamento inguinal, en dirección a la línea media, en el punto de máxima palpación de la arteria. La punción de la vena se practicaba de 3 a 8 mm hacia la línea media desde el punto de punción arterial. En ningún caso existieron complicaciones vasculares y no fue necesario el abordaje quirúrgico del paquete vascular. El acceso arterial fue utilizado para monitorizar la presión arterial y obtener muestras de sangre arterial.

Se obtuvo registro electrocardiográfico de tres derivaciones mediante colocación de electrodos adhesivos a nivel de las dos axilas y en la pared costal izquierda del animal, conectados a un monitor-desfibrilador (M1723B, Hewlett-Packard Co., EEUU). A continuación se procedió a la práctica de una esternotomía media reglada que siguió los siguientes pasos: incisión cutánea mediante bisturí en la línea media, desde la orquilla esternal hasta la apófisis xifoides; disección del tejido subcutáneo mediante bisturí eléctrico (Coagulasem®); esternotomía media mediante cincel de Lebsche; apertura del tórax y exposición del pericardio anterior; sellado con cera de los bordes del esternón para limitar el sangrado de la médula ósea; incisión en el pericardio anterior y apertura manual del mismo con exposición de la cara anterior de ambos ventrículos y la arteria descendente anterior y sus ramas en el surco interventricular (**figura 10A**).

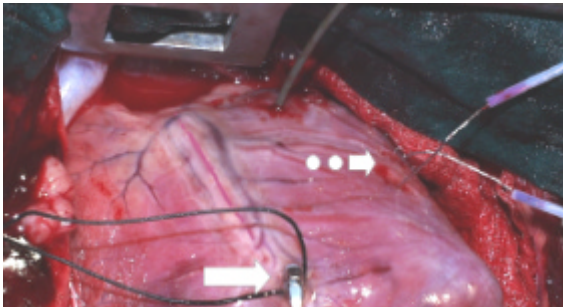


Figura 10A

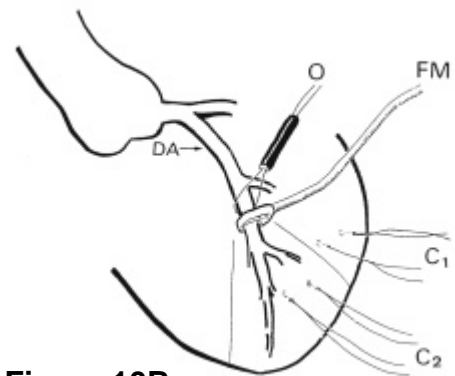


Figura 10B

Figura 10. A) Imagen del campo operatorio tras colocar un lazo rodeando la arteria descendente anterior y el fluxómetro a este nivel (flecha mayor). Dos pares de cristales piezoeléctricos están colocados en la zona en riesgo (flecha triangular) y en la zona control (flecha discontinua), respectivamente. B) Esquema de la preparación, con el lazo oclusivo (O), el fluxómetro (FM) y los dos pares de cristales (C1 en zona control y C2 en la zona en riesgo), modificado de E. Sanz, Tesis doctoral, U.A.B., 1994.

La arteria coronaria descendente anterior se disecó en su tercio medio y se pasó una seda del número 2 (Braun-Dexon®, Braun-Surgical, S.A) alrededor del punto de disección para proceder posteriormente a la oclusión externa de la misma en ese punto.

Con intención de monitorizar la contractilidad regional segmentaria del miocardio se procedió a la colocación en la pared ventricular izquierda de dos pares de cristales piezoeléctricos: uno en el miocardio dependiente de la coronaria descendente anterior más allá del punto de disección (en el área en riesgo), y otro en el miocardio dependiente de la arteria

coronaria circunfleja, como se describió previamente(34). Cada par de cristales estaba separado entre sí por 1 cm aproximadamente, y se procedía a su inserción en el tercio interno de la pared ventricular tras practicar una mínima incisión en la superficie del ventrículo izquierdo con la punta de un bisturí. Una vez colocados, los cristales se estimulaban con un microsonómetro (System 6, Triton Technology, San Diego, CA, EEUU), y su señal se monitorizaba mediante un osciloscopio HM 205-3 (Hameg Instruments, Frankfurt Main, Germany). Un esquema de la preparación del campo queda reflejado en la **figura 10B**.

La presión del ventrículo izquierdo se registraba mediante la introducción de un catéter transductor de presión (Micro-tip, Millar Instruments, TX, EEUU) en la cavidad ventricular izquierda, a través de una mínima incisión practicada en la pared libre alta del ventrículo izquierdo. El catéter, una vez en la cavidad ventricular, se alojaba con su extremo distal orientado hacia el ápex ventricular.

Con intención de registrar el flujo coronárico a nivel del punto de disección de la arteria coronaria descendente anterior (DA), ésta se rodeaba con una sonda doppler transductora de flujo (T-106, Transonic Systems, NY, EEUU), capaz de registrar el flujo máximo en cada instante e integrar el flujo medio desde la curva primaria de flujo.

La temperatura corporal se obtenía mediante colocación de un termómetro de mercurio a nivel de la orofaringe del animal, mientras que la temperatura en el miocardio en riesgo, se medía mediante inserción, a 3 mm de profundidad, de una sonda intramiocárdica en el ápex del ventrículo izquierdo (Digi-Sense, Cole-Parmer Instrument Co., Niles, Illinois, USA).

2.2.1. Cateterización del seno coronario. Se disecaba la vena yugular interna mediante una incisión longitudinal, craneocaudal, de 6-7 cm, en la cara lateral de la zona cervical. Tras disecar el tejido celular subcutáneo, se reclinaba el vientre del esternocleidomastoideo, abordando el paquete vascular compuesto por arteria carótida interna y vena yugular interna. La vena yugular se aislaba de la arteria y se pasaba un lazo elástico (*vessel loop*) a su alrededor con el fin de poder ligarla parcialmente y sin traumatismo en el momento de la incisión. Tras ligar la vena cranealmente, 1 cm por encima del punto de incisión, mediante una seda del nº 3, se procedía a practicar una incisión con bisturí en la pared de la vena yugular y a avanzar a través de la misma un catéter multiuso 5F (Cordis, Roden, The Netherlands) que se

dirigía hacia las cavidades derechas. Una vez se localizaba el catéter, mediante palpación directa con la mano derecha del operador, en cavidades cardíacas derechas, se giraba el catéter, con la mano izquierda, hasta introducirlo en el seno coronario. Posteriormente se hacía avanzar por el surco aurículoventricular hasta alcanzar la gran vena coronárica en el surco interventricular anterior, identificando en este momento el catéter mediante visión directa. El catéter se lavaba con suero heparinizado para evitar su coagulación y se mantenía en la gran vena coronárica para la obtención de muestras sanguíneas a lo largo del experimento.

2.2.2. Cateterización de la coronaria izquierda. Realización de daño intimal. Mediante una incisión en la cara lateral cervical del animal, como la descrita anteriormente, se localizaba el paquete vascular compuesto por la vena yugular interna y la arteria carótida interna. Se disecaba y aislaba la arteria carótida interna, rodeando su extremo distal con una seda del nº 3, y la porción proximal con un lazo elástico. Hasta el momento de la cateterización de la arteria, la zona quedaba protegida con gasas humedecidas en suero salino. La arteria se cateterizaba unos minutos antes de iniciar el protocolo de isquemia y reperfusión (como se detallará más adelante). Se utilizaba un catéter Judkins 7F de coronaria derecha (Cordis, Roden, Holanda), que se conectaba a una llave hemostática y ésta, a su vez, a una jeringa con 10 cc de suero fisiológico heparinizado (1000 UI de heparina / 100 mL de suero fisiológico) con la que se lavaba el sistema. A continuación se introducía por el catéter guía un catéter de infusión Cordis 2.5F, lavado con heparina al 1%, de forma que su extremo distal coincidía con el catéter guía. Tras ligar el extremo distal de la carótida derecha, ésta era traccionada por su porción distal gracias al lazo elástico. Se realizaba una mínima incisión en la pared arterial, punto por el que se introducía el catéter guía (con el catéter de infusión en su interior). El catéter se hacía avanzar hasta introducirlo en el ostium de la coronaria izquierda, maniobra que se realizaba mediante palpación con el dedo índice de la mano derecha del operador, al tiempo que se rotaba el catéter en sentido antihorario con la mano izquierda. Una vez cateterizada la coronaria izquierda se hacía avanzar el catéter de infusión por la descendente anterior hasta su porción distal. En este momento, se procedía a ocluir la arteria anudando el lazo ocluidor sobre la misma, al tiempo que se retiraba el catéter con intención de provocar desendotelización en el

punto de oclusión de la arteria, como se ha descrito en otros experimentos de nuestro grupo(59;62).

2.2.3. Monitorización durante el estudio en el modelo de corazón porcino in situ.

Durante el estudio se obtenía una gasometría arterial (a través del introductor arterial femoral) previa a la oclusión, que se utilizaba para ajustar los parámetros del ventilador en función de los valores de pH, pO₂ y pCO₂. Mediante manipulación de la frecuencia respiratoria y del volumen corriente se intentaba mantener el pH arterial entre 7.36 y 7.44, la pO₂ entre 80 y 110 mmHg y la pCO₂ entre 37 y 44 mmHg. En caso necesario, el animal se cubría con una manta eléctrica para mantener la temperatura entre 36 y 37°C. Se realizaron determinaciones de hematología y bioquímica básica en muestras de sangre venosa antes de la esternotomía y al final del período de reperfusión. La derivación II del ECG, las presiones de aorta y ventrículo izquierdo, la señal del flujo coronario y de los cristales piezoeléctricos fueron filtradas, amplificadas y digitalizadas a 100 Hz por canal mediante un procesador de señales (PowerLab, SP16 Hardward, ADInstruments Pty Ltd, Castle Hill, Australia). Las señales fueron registradas continuamente sobre papel (MT95000, Astro-Med, West Warwick, RI., USA) y almacenadas digitalmente para su posterior análisis mediante el software comercial Chart for Windows v3.4.6 (ADInstruments Pty Ltd). Todas las medidas hemodinámicas se realizaron durante los períodos en los que se mantenía en ritmo sinusal. Si en los tiempos establecidos para la determinación el animal presentaba algún tipo de arritmia se realizaba la medición en el momento más próximo posible, una vez recuperado el ritmo sinusal.

2.2.4. Estudio de la motilidad regional segmentaria.

Mediante las señales de los cristales ultrasónicos, se midieron las distancias telediastólica (DTD) y telesistólica (DTS) así como la máxima y mínima distancia entre cristales, tal y como se ha descrito previamente en este modelo(163) y en otros trabajos previos de nuestro grupo(34). La fracción de acortamiento sistólico del miocardio en riesgo y de la zona control se calcularon mediante la diferencia entre DTD y DTS dividido por DTD. Este valor fue referido en % respecto al basal (antes de la oclusión). La amplitud del cambio en la distancia entre cristales fue calculada como la diferencia entre la máxima y mínima separación entre los

valores a lo largo del ciclo cardíaco(44). La reducción que experimenta éste parámetro durante la isquemia se refirió porcentualmente al valor que tenía a los 5 minutos de oclusión (momento a partir del cual se asumen los cambios como pasivos), y se utilizó como medida del desarrollo de rigor isquémico(44)(figura 12, página 42). La brusca reducción en los valores de DTD en la reperfusión inicial se utilizó como expresión del desarrollo de hipercontractura.

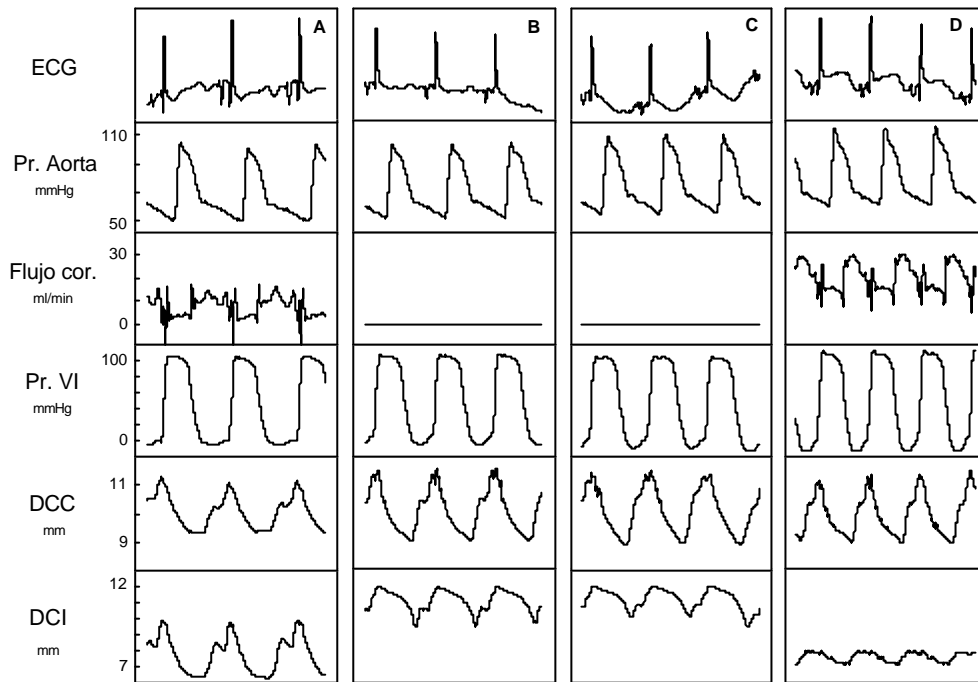


Figura 11. Ejemplo representativo de los registros de electrocardiograma (ECG), presión aórtica (Pr. Aorta), flujo coronario (Flujo cor.), presión ventricular izquierda (Pr. VI) y distancia entre cristales piezoeléctricos de la zona control e isquémica (DCC y DCI respectivamente). **A:** Registro basal previo a la oclusión de la coronaria descendente anterior. **B:** Registro a los 15 minutos de oclusión coronaria. El flujo coronario es nulo y se ha abolido la contractilidad en la zona isquémica, al tiempo que se observa un aumento (expansión) de los valores alcanzados en telediástole. **C:** Registro a los 45 minutos de oclusión coronaria. **D:** Registro a los 15 minutos de reperfusión. El flujo coronario es mayor al previo a la oclusión (hiperemia) y se aprecia un marcado descenso de la distancia en telediástole de la zona isquémica (reflejando hipercontractura).

2.2.5. Oclusión coronaria y reperfusión.

En el tiempo establecido según el protocolo de estudio, se sometía a los animales a un período de isquemia coronaria regional de 48 minutos de duración sobre el territorio de la descendente anterior, que se seguía de un período de reperfusión de 2 horas. Para ello se ligaba externamente la arteria en el punto de disección, mediante un lazo formado por la seda y un manguito elástico, que permitiera la liberación posterior, provocando el mínimo daño a la

arteria. Al finalizar el período de oclusión se liberaba el lazo oclusivo, permitiendo de nuevo el flujo sanguíneo sobre el miocardio dependiente de la arteria coronaria descendente anterior a partir de ese punto.

En el grupo de animales a los que se les realizaba daño intimal coronario, y como se ha comentado previamente, se procedía a ocluir la arteria al tiempo que se retiraba el catéter de infusión que se había hecho avanzar hasta la porción distal de la arteria, con el fin de lesionar el endotelio en el punto de oclusión de la coronaria.

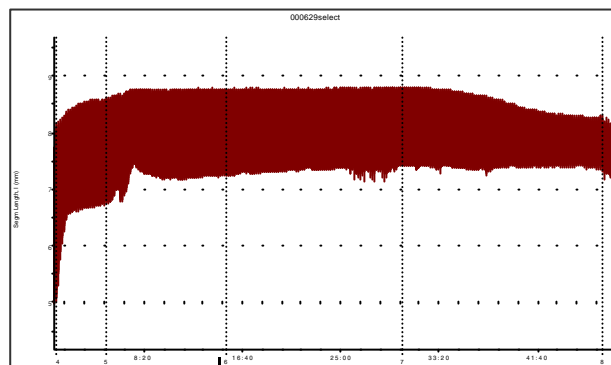


Figura 12. Representación de la reducción progresiva en la amplitud del movimiento de los cristales insertados en el área en riesgo. En abscisas se representa el tiempo. Las marcas verticales corresponden a 0, 5, 15, 30 y 45 min de oclusión respectivamente. En ordenadas se muestran los valores de la distancia entre cristales expresados en mm. Se observa como la amplitud entre la máxima y mínima distancia entre cristales se reduce progresivamente a lo largo del período de isquemia. Igualmente se aprecia la expansión (aumento de la distancia en telediástole) al inicio de la del período de isquemia.

3. Estudios postmortem.

3.1. *Determinación del área en riesgo y tamaño de infarto.*

Tras finalizar el experimento, y con intención de delimitar el área en riesgo, se ocluía la DA, se inyectaban 5 mL de fluoresceína al 10% en la aurícula izquierda y se extraía el corazón, todavía latiendo, cortando con tijeras quirúrgicas curvas (Mayo 11-171-23, Martin, Germany) su base a nivel de grandes vasos y venas pulmonares. Inmediatamente, se sumergía en una bandeja con suero salino helado (4°C). Se cortaban, mediante hoja de dermatomo (Paragon; Maersk Medical LTD., Sheffield, UK), lonchas transversales de miocardio de 5-7mm de grosor, desde el ápex hacia la base. Posteriormente, las lonchas se pesaban en una balanza de precisión (Precisa 180 A, Zurich, Switzerland). La tercera loncha se separaba para estudio de

mieloperoxidasa en tejido miocárdico, como se describirá más adelante. El resto de las lonchas se fotografiaban, por su cara basal (excepto la cuarta, que se fotografiaba por ambas caras para suplir el defecto de la tercera loncha), bajo luz ultravioleta, con una escala de referencia (Olympus Digital Camera CL1400, Olympus Optical Co. LTD., Tokyo, Japan). A continuación, las lonchas se sumergían en un baño de cloruro de trifeniltetrazolium al 1 %, a pH 7.4 y 37°C, durante 10 minutos, para determinar el miocardio necrosado (que presentaba una reacción negativa al trifeniltetrazolium(164)). Inmediatamente después, las lonchas volvían a ser fotografiadas bajo luz blanca. Las fotografías fueron analizadas mediante el software comercial Microlmage (Olympus Optical Co., Hamburg, Germany), para determinar las áreas de miocardio en riesgo y de miocardio control en cada loncha, y calcular su peso aproximado a partir del peso individualizado de cada loncha. Tras ser fotografiadas, las lonchas se incluían en formaldehído al 10%, para el posterior análisis histológico. Un ejemplo de las imágenes obtenidas para delimitación del área en riesgo (tinción con fluoresceína e iluminación con luz UV) y del tamaño del infarto (reacción a trifeniltetrazolium) se muestra en la **figura 13**.

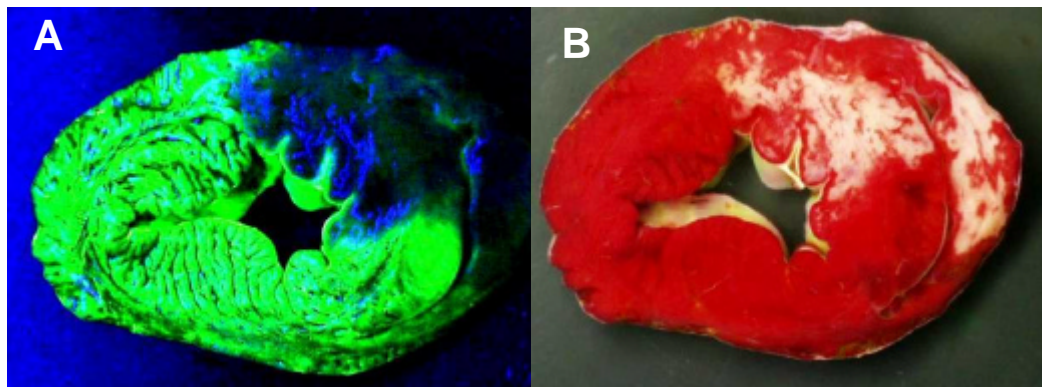


Figura 13. A: Imagen de una loncha obtenida mediante cortes transversales de los ventrículos e iluminada por su cara basal con luz ultravioleta. Las porciones que no se reflejan delimitan el área de miocardio en riesgo. B: La misma loncha iluminada con luz blanca después de su incubación con cloruro de trifeniltetrazolium. Las áreas que no adoptan la tonalidad roja (aquí aparecen blancas) delimitan los territorios necróticos.

3.2. **Análisis histológico.**

La segunda loncha de cada corazón se fijaba en formaldehído al 20%, se incluía en parafina y se procedía al corte de secciones de 4 μ m de grosor que incluían la totalidad del área en riesgo (microtomo Leica RM2145, Leica Instruments, Nussloch, Germany). Seguidamente, las secciones se extendían sobre portas (2.5 x 7.5 cm) y se teñían con

hematoxilina-eosina y tricrómico de Masson. Para determinar la correlación entre la extensión de la necrosis medida mediante la reacción negativa al trifeniltetrazolium de las lonchas de miocardio, se analizó la extensión de la necrosis en bandas de contracción en 6 corazones de la primera serie, seleccionados al azar (3 por cada grupo de tratamiento). Para ello, se marcaron los portos con líneas consecutivas, trazadas con rotulador (0.5 mm) que irradiaban de la cavidad ventricular y que cubrían todo el área en riesgo (identificada por la fotografía de la loncha de miocardio, teñida con fluoresceína y visualizada bajo luz ultravioleta). De cada loncha se realizaron una media de 167 ± 16 microfotografías digitales de campos adyacentes, entre las líneas marcadas, con aumento de x400 (DP10 Olympus microscope digital camera. Resolution 1280 x 1024 pixels, Tokyo, Japan). La presencia de bandas de contracción se cuantificaba semicuantitativamente en cada fotografía como 0 (sin necrosis); 1 (algunas bandas de contracción) y 2 (la mayor parte del campo son bandas de contracción). Las bandas de contracción se identificaban como zonas teñidas en rojo oscuro intenso o zonas hipercontracturadas con múltiples granulaciones(165). El resultado global se comparó con la extensión de la necrosis mediante la reacción negativa al trifeniltetrazolium.

3.3. Determinación de mieloperoxidasa (MPO) en tejido miocárdico.

Se utilizó como índice de la acumulación de polimorfonucleares en el miocardio reperfundido(166). Para ello se obtuvieron muestras de miocardio de área en riesgo y de zona control de la tercera loncha; se pesaron y se congelaron -80°C hasta el momento de su procesado. Las muestras se descongelaron y se homogeneizaron en tampón fosfato 20mM, pH 7.4, en hielo (TM 985-370 Tissue tearor, Biospec Products, Inc, Dremel, WI). A continuación se centrifugaron a $1900 \times g$ durante 20 minutos a 4°C . El sedimento se disolvió en un tampón de fosfato potásico 50 mM a pH 6.0 usándose bromuro de hexadeciltrimetil amonio al 0.5% como detergente (HTAB, Sigma Chemical Co). A continuación se homogenizaron de nuevo durante 15 segundos 3 veces, y se sonicaron (Labsonic 2000, Braun-Biotech, Melsulgen AG, Germany). El homogeneizado se sonicó de nuevo durante 15 segundos, 3 veces, y se centrifugó a 1900 g durante 20 min, a 4°C . En el sobrenadante se determinó la actividad de la MPO mediante modificación del método Bradley(59). La actividad MPO se valoró midiendo la oxidación dependiente de H_2O_2 del dihidrocloruro de orto-dianisidina (Sigma Chemical Co),

mediante espectrofotometría a 460nm (Lector de ELISA SLT 16 925, SLT-Labinstruments, Grödig, Austria), y sus unidades se definieron como la cantidad de enzima que era capaz de degradar 1 $\mu\text{mol/L}$ /minuto de peróxido a una temperatura de 25°C.

3.4. Determinación de GMPc.

En el transcurso de los experimentos se obtuvieron muestras sanguíneas, según cada protocolo experimental, para la determinación de niveles plasmáticos de GMPc. Igualmente, se obtuvieron muestras de miocardio para cuantificar la concentración de GMPc miocárdica en diferentes situaciones (normoxia, tras isquemia y reperfusión, o tras estimular la síntesis de GMPc) que se detallarán con más detenimiento en los apartados dedicados a los protocolos experimentales.

3.4.1. Determinaciones en plasma.

Para determinación de los niveles plasmáticos de GMPc se obtuvieron muestras seriadas de 4.5 mL de sangre recogidas en un tubo vacutainer (Hemogard® K3 EDTA, Becton Dickinson, MEYLAN Cedex, France) que contenía EDTA como anticoagulante. Las muestras se colocaban en una bandeja con hielo y se centrifugaron a 2000 r.p.m. para obtener plasma en no más de 30 minutos tras su obtención. El plasma así obtenido se congelaba a una temperatura de -20°C hasta el momento de su análisis. Las concentraciones de GMPc se determinaron mediante radioinmunoensayo utilizando [^3H]GMPc acetilado como se describió por L. Agulló et al.(102).

3.4.2. Determinaciones en tejido miocárdico.

El contenido GMPc en el miocardio se midió en experimentos adicionales diseñados específicamente para este objetivo. La zona de miocardio en riesgo de estos animales se marcaba mediante aplicación de un punto de seda del número 2. En estos animales se inducía fibrilación ventricular mediante aplicación de una corriente continua (9 V) a los 5 minutos de reperfusión, mediante contacto directo de los dos polos de una pila con el epicardio. En ese momento se procedía a seccionar con una hoja de dermatomo el tercio apical de los ventrículos y a sumergirlo en nitrógeno líquido. El procedimiento de sección e inmersión duraba

3 segundos. A posteriori se obtenían fragmentos de miocardio de área en riesgo (marcada mediante el punto de seda trenzada) y de la zona control (pared posterior del ventrículo izquierdo). Los fragmentos de miocardio congelados eran pulverizados, todavía bañados en nitrógeno líquido, homogeneizados usando ácido tricloroacético al 7.5% y, finalmente, se determinaba el contenido de GMPc, como se describió previamente por nuestro grupo (147).

3.5. Determinaciones de lactato deshidrogenasa.

En el modelo de corazón aislado de rata, un grupo de experimentos fue dirigido a cuantificar la muerte celular mediante la cuantificación de lactato deshidrogenasa (LDH) que se observaba en el efluente coronario obtenido de los corazones en el período de reperfusión. En estos experimentos, el período de isquemia, como se comentará después, se prolongó hasta los 60 minutos, ya que con períodos inferiores, la liberación enzimática es muy pobre. Se recogían muestras del efluente seriadas en el tiempo a lo largo de la reperfusión, y la actividad de LDH se medía mediante espectrofotometría como ya se ha descrito en trabajos previos de nuestro grupo(102).

4. Administración de L-arginina. Protocolos de estudio.

4.1. Protocolo de administración de L-arginina.

En un primer protocolo destinado a la cuantificación del tamaño del infarto, se utilizaron 24 animales (16 machos), con una edad media de 15 semanas y con un peso medio de 40.9 ± 1.5 Kg. Tras completar la instrumentación inicial, los animales se distribuyeron de forma aleatoria en dos grupos de tratamiento. Un grupo recibiría 100 mg/Kg de L-arginina en 100 mL de suero salino, infundido a través de la vena femoral durante 20 minutos, con ayuda de una bomba de infusión (Harvard Syringe Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Natick, MA., USA). El segundo grupo (control) recibiría la misma infusión sin la adición de L-arginina. A los 10 minutos de haber finalizado la infusión, se procedía a ocluir la arteria coronaria descendente anterior durante 48 minutos, al finalizar los cuales, se liberaba el lazo oclusivo y se iniciaba un período de reperfusión de 2 horas, al final del cual se determinaría el tamaño del infarto (**figura 14**).

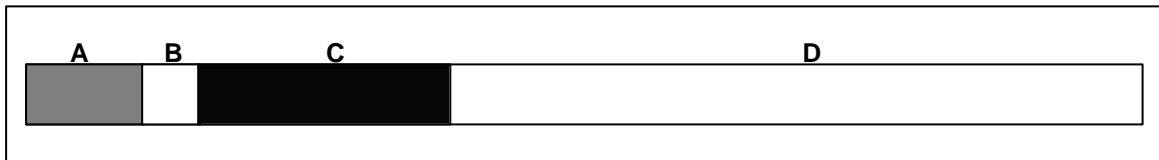


Figura 14. Esquema del protocolo. A: Infusión de L-arginina o placebo endovenosa (20 minutos). B: Tiempo de espera de 10 min. C: Oclusión de la arteria descendente anterior (48 min). D: Período de reperfusión coronaria (2 horas).

4.2. Determinaciones de L-arginina en plasma.

Se extrajeron muestras de sangre venosa (4.5 mL) en tubo vacutainer conteniendo EDTA en los siguientes tiempos: antes de la administración de L-arginina o placebo; antes de la oclusión coronaria; a los 15 y 45 min de oclusión; a los 120 min de reperfusión. Las muestras se colocaban en una bandeja con hielo y se centrifugaban a 2000 r.p.m. en los siguientes 30 minutos. Las concentraciones de L-arginina del plasma se analizaron mediante cromatografía líquida de alta resolución en fase reversa tras derivación con fenil, utilizando luz ultravioleta (Pico-Tag®, Waters, MA.,USA).

4.3. Determinaciones de GMPc.

4.3.1. Determinación de GMPc en plasma.

En los animales del protocolo principal, diseñado para la determinación del tamaño del infarto, se obtuvieron muestras de sangre venosa para determinación de niveles plasmáticos de GMPc antes de la administración de L-arginina o placebo; antes de la oclusión coronaria; a los 15 y 45 min de oclusión; y a los 5, 15 y 120 min de reperfusión.

4.3.2. Determinación de GMPc en seno coronario.

Con intención de determinar las concentraciones de GMPc en seno coronario, se planificaron 5 experimentos adicionales. Los animales se sometieron al mismo protocolo e instrumentación que el grupo principal a estudio, y se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos (3 animales recibieron L-arginina, y 2 animales placebo). Como instrumentación adicional, en ellos se cateterizó el seno coronario para obtención de muestras de sangre, como se ha descrito con anterioridad. Tras 30 minutos de espera (para evitar que la manipulación de las aurículas interfiriera en los resultados) se procedía a la infusión de la droga (L-arginina o placebo). Se obtuvieron muestras de sangre de la gran vena coronárica y arterial (2 mL) de

forma secuencial durante todo el experimento, para determinar la diferencia arteriovenosa de GMPc en el territorio de la arteria coronaria descendente anterior.

4.3.3. Determinación de GMPc en miocardio.

El contenido GMPc en el miocardio se midió en 8 experimentos adicionales que se sometieron al protocolo de estudio inicial, y que fueron distribuidos aleatoriamente para recibir L-arginina o placebo (4 y 4). En estos animales, el protocolo se interrumpiría a los 5 minutos de reperfusión, momento en el que se extraería la porción apical del corazón, sumergiéndola en nitrógeno líquido, para la posterior determinación del contenido miocárdico de GMPc, tanto en el área en riesgo (dependiente de la arteria coronaria descendente anterior más allá del punto de oclusión), como en el miocardio control.

5. Administración de Urodilatina. Protocolos de estudio.

El propósito de este estudio era determinar si la administración de urodilatina, en el momento de la reperfusión miocárdica en un modelo de corazón porcino in situ, protege al miocardio de la muerte celular.

Las dosis de urodilatina que se acabarían administrando en el modelo porcino y su relación con los niveles de GMPc miocárdico, así como su relación con la extensión de la muerte celular del miocardio sometido a isquemia y reperfusión, se investigó en primer término en corazones de rata aislados sometidos a isquemia y reperfusión, en los que se administraba urodilatina a diferentes concentraciones durante la reperfusión. Tras esta serie de experimentos, y con el objeto de determinar la dosis de urodilatina que conseguía el aumento deseado en el contenido de GMPc del miocardio reperfundido, se administró urodilatina, a dos dosis diferentes, durante la reperfusión en una serie de cerdos sometidos a un protocolo de isquemia y reperfusión, en los que se determinaba el contenido miocárdico de GMPc en los primeros minutos de la reperfusión. Finalmente, estas dosis fueron comparadas frente a placebo en su capacidad para reducir el tamaño de la necrosis tras isquemia y reperfusión del miocardio.

5.1. Estudios en el corazón aislado de rata. Protocolos.

Se realizaron 3 grupos de experimentos (**figura 15**, página 50), sometiendo a los corazones a diversos protocolos de isquemia y reperfusión miocárdica, con el propósito de estudiar diversas variables.

5.1.1. Efectos sobre la recuperación funcional.

En esta primera serie (n=20), los corazones se sometieron a 40 minutos de isquemia seguidos de 60 minutos de reperfusión. En los primeros 15 minutos de reperfusión, recibieron urodilatina a las siguientes concentraciones: 0 (grupo control), 0.01, 0.05 y 1 $\mu\text{mol/L}$. Un tiempo de isquemia de 40 minutos de isquemia, no produce liberación enzimática y permite observar recuperación funcional, como se describió en otros experimentos similares de nuestro grupo(147) .

5.1.2. Efectos sobre el contenido miocárdico de GMPc.

En este segundo grupo de experimentos (n=16), los corazones se distribuyeron en los mismos grupos que los descritos en el apartado anterior, es decir: para recibir urodilatina a concentraciones de 0 (grupo control), 0.01, 0.05 y 1 $\mu\text{mol/L}$. En este caso, sin embargo, el tiempo de reperfusión se redujo a 10 minutos, momento en el que se procedía a retirar el catéter transductor de presión de la cavidad ventricular y a seccionar la base de la aorta, para introducir el corazón en nitrógeno líquido y posteriormente proceder a la determinación de GMPc miocárdico. Los fragmentos de miocardio congelados eran pulverizados, todavía bañados en nitrógeno líquido, homogeneizados usando ácido tricloroacético al 7.5% y, finalmente, se procedía a la determinación de GMPc, del mismo modo descrito para las muestras obtenidas del modelo de corazón porcino in situ.

5.1.3. Efectos sobre la muerte celular.

En este tercer grupo (n=22), la isquemia se prolongó hasta los 60 minutos con el fin de documentar liberación del enzima lactato deshidrogenasa (LDH) en el efluente coronario en el momento de la reperfusión.

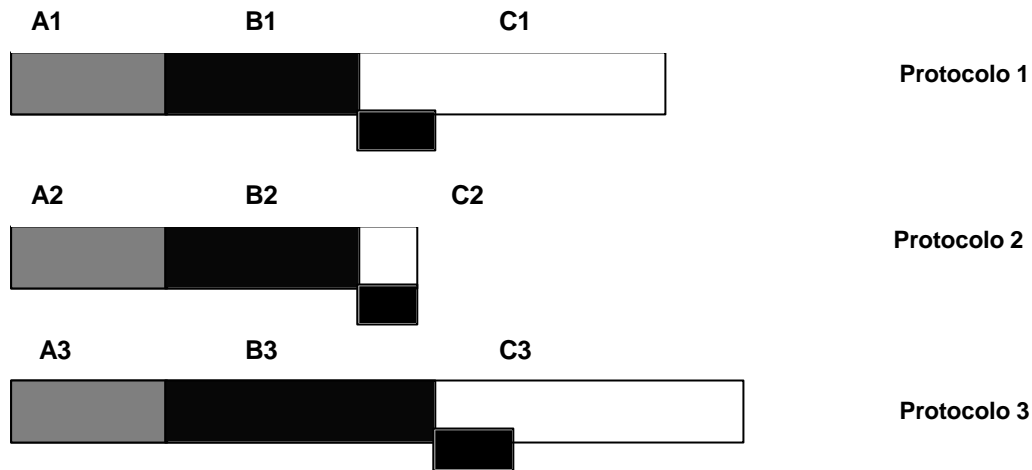


Figura 15. Esquema de los 3 protocolos en el modelo de corazón aislado de rata. Protocolo 1: A1) Equilibrado de 30 min; B1) Isquemia de 40 min; C1) Reperusión de 60 minutos. Protocolo 2: A2) Equilibrado de 30 min; B2) Isquemia de 40 min; C2) Reperusión de 10 min. Protocolo 3: A1) Equilibrado de 30 min; B3) Isquemia de 60 min; C) Reperusión de 60 min. Las barras horizontales sombreadas indican el tiempo de infusión de urodilatina o placebo que se inician en el momento de reperusión y se prolongan durante 15 min en los protocolos 1 y 3 y durante 10 min en el segundo.

5.2. Estudios en el modelo de corazón porcino *in situ*. Protocolos.

Se utilizaron treinta y dos cerdos (Large White) con un peso medio de 34.7 ± 1 Kg. Tras la instrumentación inicial, se esperaba 30 minutos para evitar que la manipulación del corazón pudiera interferir con los resultados. Al finalizar este tiempo, se sometía a los animales a una oclusión de la arteria coronaria descendente anterior en el punto de disección durante 48 minutos, para posteriormente reperfundir el miocardio durante dos horas. Los experimentos se dividieron en dos series:

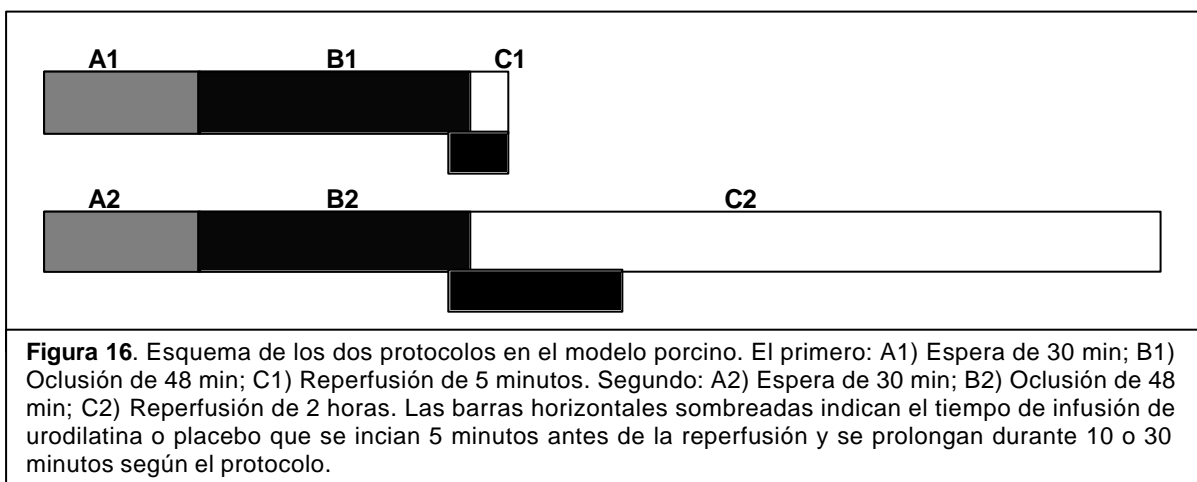
5.2.1. Dirigida a determinar el contenido miocárdico de GMPc.

En esta primera serie se utilizaron 10 animales, y estaba dirigida a la determinación del contenido de GMPc en el miocardio reperfundido y el miocardio control. Estos animales se distribuyeron de forma ciega, para recibir una solución de suero fisiológico (placebo) o una solución de suero fisiológico que contenía urodilatina, administrándose de forma endovenosa (por vena femoral) a dosis de 10 ng/Kg/min y 50 ng/Kg/min, durante 10 minutos, a partir de los últimos 5 minutos de oclusión coronaria. La droga se infundía a través de la vena femoral mediante una bomba de infusión (Harvard Syringe Infusion Pump 22, Harvard Apparatus, South Nathick, MA., USA). A los 5 minutos de reperusión, se procedía a seccionar las porciones

apicales de ambos ventrículos con un dermatomo sumergiendo inmediatamente las piezas de miocardio en nitrógeno líquido, para su posterior procesado.

5.2.2. Dirigida a cuantificar el tamaño del infarto.

En esta segunda serie de experimentos, que estaba dirigida a la determinación del tamaño de infarto, 22 animales vieron prolongado el período de reperfusión a 2 horas, al final de las cuales, se determinaba el tamaño del infarto. Dentro de este grupo, 10 animales se distribuyeron aleatoriamente para recibir urodilatina endovenosa a dosis de 10 ng/Kg/min o placebo durante 30 minutos, comenzando la infusión 5 minutos antes de la reperfusión. Los restantes 12 animales fueron distribuidos, también de forma aleatoria, para recibir urodilatina a dosis 50 ng/Kg/min o placebo.



5.3. Determinaciones de urodilatina y GMPc en plasma.

A lo largo de los experimentos de la segunda serie del modelo porcino (dirigida a cuantificar el tamaño de la necrosis), se extrajeron muestras de sangre venosa (4.5mL) para la determinación de GMPc y urodilatina. Estas muestras se tomaron 15 minutos antes de la oclusión, a los 10, 20, 30, 42, 44 y 47 minutos de oclusión y a los 5, 15, 25, 27, 30, 35, 45, 60, 90 y 120 minutos de reperfusión. Las muestras se conservaban en una bandeja con hielo y se centrifugaban posteriormente para obtener plasma en un tiempo no superior a los 30 minutos. El plasma se conservaba a -20°C hasta el procesado de las muestras. Los niveles de urodilatina se determinaron mediante radioinmunoensayo utilizando un anticuerpo específico contra la porción NH_2 terminal [95-101] de la urodilatina(161). Los niveles de GMPc

plasmáticos, como se ha comentado previamente, se determinaron igualmente mediante radioinmunoensayo utilizando [³H]cGMP acetilado, como se describió previamente(102).

6. Administración de nitratos. Protocolos de estudio.

Se utilizaron 39 cerdos con un peso medio de 35.2 ± 1.1 Kg.

6.1. Búsqueda de dosis.

Un grupo inicial de 3 animales fue sometido a un protocolo de administración de 5-mononitrato de isosorbide (5-MNI) diluido en 100 mL de agua y administrado a dosis crecientes mediante una sonda nasogástrica. La dosis inicial sería de 0.3 mg/Kg de peso y se incrementaría cada hora con 0.3 mg/Kg más. Así las dosis serían de 0.3, 0.6, 0.9, y sucesivas, hasta una dosis máxima de 50 mg o hasta que la presión arterial presentara una caída superior o igual al 30% de la basal.

6.1.1. Determinaciones de 5-MNI en plasma.

En esta serie de experimentos se obtuvieron muestras de 4.5 mL sangre venosa a través del introductor insertado en una vena femoral a los 15, 30 y 60 minutos posteriores a la administración de cada dosis del fármaco. Las muestras se transferían a tubos de ensayo de vidrio silanizado y se centrifugaban a 2000 r.p.m durante 10 min a 4°C. El plasma sobrenedante se transfería de nuevo a un tubo silanizado que se mantenía congelado a -80°C hasta el momento de su análisis para determinar los niveles plasmáticos del fármaco por cromatografía de gases(167).

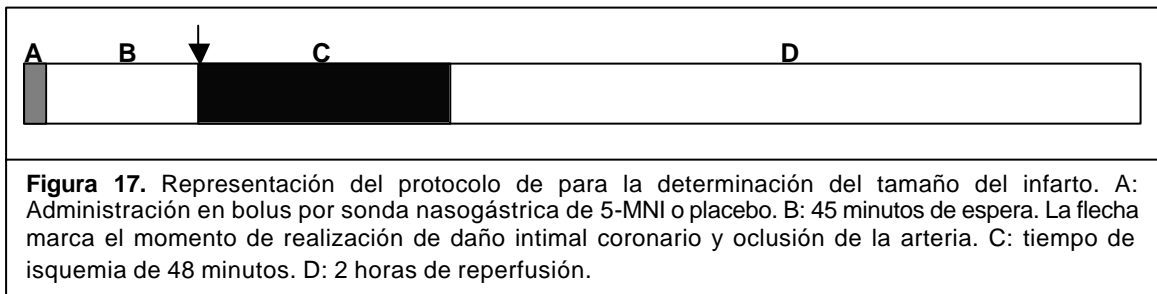
6.2. Experimentos dirigidos a determinar el tamaño del infarto.

Un conjunto de 36 animales, fue distribuido aleatoriamente, después de la instrumentación inicial, para recibir por sonda nasogástrica una dosis de 5-MNI que se hubiera acompañado de niveles detectables del fármaco en plasma en el protocolo anterior, o una dosis equivalente de placebo. El fármaco se diluía en 100 mL de agua y se administraba en bolus. Tras 45 minutos de espera se procedía a ocluir la arteria descendente anterior al tiempo que se desendotelizaba la arteria mediante "raspado" con un catéter de infusión 2.5F que se introducía en la misma, y que se retiraba al anudar la arteria, como se comenta en el apartado

correspondiente (Métodos 2.2.2.). La arteria se mantenía ocluída 48 minutos, y posteriormente se reperfundía durante 2 horas (**figura 17**). Al finalizar el protocolo se determinaba el tamaño de la necrosis. Durante el período de reperfundición, se documentaba la presencia o ausencia de reducciones cíclicas del flujo coronario secundaria a la formación y disgregación de trombos en el lugar de desendotelización de la arteria, así como su número, tal y como se ha descrito en otros trabajos de nuestro grupo(59;62).

6.2.1. Determinaciones de 5-MNI en plasma.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa para determinación de 5-MNI en plasma en 5 animales que recibieron 5-MNI, de forma basal; a los 20 y 45 minutos tras su administración; a los 15 y 45 minutos de oclusión coronaria, y a los 30 y 120 minutos de reperfundición.



7. Adquisición y preparación de las drogas.

7.1. L-arginina.

La L-arginina se obtuvo de Sigma Chemical®, en forma de hidrocloreuro de L-arginina en viales de 100 mg. Para su preparación endovenosa se disolvía en suero salino (100 mL) y se neutralizaba con NaOH para alcanzar un pH entre 7.2 y 7.4.

7.2. Urodilatina.

La molécula de urodilatina fue cedida en viales conteniendo 1 mg en forma de polvo (acetato de urodilatina que se conserva estable a temperatura inferior a 8°C) por el Niedersächsisches Institut für Peptid-Forschung GmbH / Haemopep, Pharma GMBH(73), a través del Dr. Markus Meyer, quien se encargó de realizar las determinaciones de urodilatina

en plasma. Una vez preparada la solución ésta se conserva estable a temperatura ambiente durante el tiempo de administración.

7.3. 5-mononitrato de isosorbide.

El 5-mononitrato de isosorbide fue cedido por los laboratorios Lacer. S.A. en forma de polvo contenido en viales estables a 4°C. La droga, se disuelve bien en agua(167), motivo por el que se se disolvía una dosis ajustada por peso del animal en 100 mL de agua a temperatura ambiente para su administración por sonda nasogástrica.

8. Análisis estadístico.

Se utilizó el Software comercial SPSS para Windows 7.0. La homogeneidad entre grupos se estudió mediante t de Student para muestras independientes. Los cambios en los parámetros hemodinámicos, en la distancia entre cristales, y en las determinaciones de moléculas plasmáticas, se estudiaron mediante aplicación de análisis de la varianza para muestras repetidas. Los cambios en las variables hemodinámicas entre antes y después de la infusión de las drogas se estudiaron mediante t de Student para datos apareados. La comparación del tamaño del infarto entre dos grupos se realizó mediante aplicación de t de Student, y mediante análisis de la varianza para muestras independientes cuando se realizó entre tres grupos.

8.1. Análisis específicos.

La hipótesis de un efecto beneficioso de la L-arginina en el modelo porcino, establecida a priori basándonos en estudios en miocitos aislados y corazón de rata, se puso a prueba mediante pruebas de t de Student de una sola cola para comparación de muestras independientes.

Las diferencias en el contenido de GMPc miocárdico entre animales tratados con L-arginina y los animales que recibieron placebo se estudió mediante análisis de la varianza multifactorial (factores tratamiento y zona de miocardio).

Las diferencias en el contenido miocárdico de GMPc en el protocolo de administración de urodilatina a dosis crecientes, se realizaron mediante t de Student para datos apareados en

la comparación entre las zonas isquémicas y normóxicas de un mismo animal y mediante t de Student para muestras independientes entre datos de animales diferentes.

Para todos los análisis se estableció como significativo un valor de p inferior a 0.05. Todos los valores se expresan como media \pm error estándar.