

La adenosina atenúa la disfunción posisquémica diastólica del miocardio atontado

VERONICA D'ANUNZIO, MARTIN DONATO¹

RESUMEN

Existe evidencia experimental acerca de que la adenosina, administrada solamente en la reperusión, atenúa las alteraciones sistólicas presentes en la disfunción ventricular posisquémica. Sin embargo, no es claro si esta protección se extiende sobre la disfunción posisquémica diastólica. El objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la adenosina, administrada durante la reperusión, atenúa las alteraciones diastólicas presentes luego de 15 minutos de isquemia global y, como objetivo adicional, evaluar la posible participación de los receptores A_1 de adenosina actuando como mediadores de los efectos anteriores. Corazones aislados e isovolúnicos de conejo, perfundidos según la técnica modificada de Langendorff, fueron sometidos a isquemia global de 15 minutos y reperusión de 30 minutos. La colocación de un balón de látex en el ventrículo izquierdo conectado a un transductor de presión permitió registrar la presión intraventricular izquierda y la presión de perfusión coronaria (PPC). Se midieron la presión diastólica final (rigidez diastólica) y la PPC. Se calculó la constante de tiempo de decaimiento de la presión durante la fase de relajación isovolúmica (τ). La adenosina administrada desde el comienzo de la reperusión atenuó el aumento de la rigidez diastólica, sin modificar las alteraciones tempranas de la relajación isovolúmica. Este efecto protector fue mediado por la activación de los receptores A_1 . REV ARGENT CARDIOL 2001; 69: 198-203.

Palabras clave Miocardio atontado - Adenosina - Función diastólica

INTRODUCCION

El miocardio atontado representa una entidad fisiopatológica importante que puede evidenciarse tanto en el ámbito experimental como en el clínico. (1) En su descripción original se denominó "disfunción posisquémica sistólica", dado que se le dio mayor importancia a la alteración mecánica del estado contráctil. (2) Años más tarde, otros investigadores (3, 4) observaron que existe una disfunción diastólica y trabajos posteriores (5) describieron más ampliamente este compromiso diastólico como un trastorno precoz (y con rápida recuperación) de la relajación isovolúmica y un trastorno tardío (pero persistente) de la rigidez miocárdica.

Así, varios trabajos experimentales, incluidos estudios realizados en nuestro laboratorio, demostra-

ron que la disfunción ventricular sistólica puede atenuarse con intervenciones farmacológicas (6-8) o fisiológicas (precondicionamiento isquémico). (9) Sin embargo, estos estudios no evaluaron en forma detallada la función diastólica, o lo hicieron utilizando índices indirectos y modelos de isquemia regional.

Se utilizaron numerosos compuestos para proteger al corazón del daño por isquemia y reperusión y entre ellos se destaca la adenosina. Así, diversos trabajos (10-12) mostraron que la administración de adenosina durante la reperusión temprana disminuye el tamaño del infarto. Por otro lado, Janier y colaboradores (13) encontraron mejoría en la función ventricular sistólica y diastólica cuando la adenosina se daba durante todo el experimento, es decir, desde antes de la isquemia hasta el final de la reper-

Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires

¹ Becario de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica

Trabajo recibido para su publicación: 21/1/01. Aceptado: 26/3/01

Dirección para separatas: Martín Donato - Laboratorio de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - Uriburu 950, Piso 2º, (1114) Buenos Aires, Argentina - Tel./Fax: 54 11 4962-4945

E-mail: mdonato@fmed.uba.ar

fusión, pero esta protección estuvo atenuada de manera significativa cuando la droga estuvo presente solamente en la reperfusión.

Sin embargo, estos investigadores (10-13) utilizaron un tiempo prolongado de isquemia (> 30 minutos), con infartos que comprometen un gran porcentaje de la pared ventricular y, además, no evaluaron exhaustivamente las alteraciones diastólicas de la disfunción posisquémica.

Sólo en dos estudios (14, 15) se utilizaron tiempos más cortos de isquemia regional (≤ 15 minutos). Ambos trabajos se realizaron en perros con tórax abierto e instrumentados y ninguno evaluó la fase diastólica.

Así, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la adenosina administrada solamente durante el período de reperfusión atenúa las alteraciones diastólicas de la disfunción posisquémica, evaluando tanto el componente activo (relajación) como el pasivo (rigidez miocárdica). Un segundo objetivo lo constituyó la evaluación de la posible participación de los receptores A_1 de adenosina mediante el mencionado efecto.

MATERIAL Y METODOS

Modelo experimental

Se utilizaron conejos con un peso de 1,8 a 2,0 kg, que se anestesiaron con tiopental sódico (35 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg). Se abrió el tórax rápidamente y se aisló la arteria aorta, para luego colocar y ligar con hilo de lino una cánula en la mencionada arteria. Una vez removido el corazón, éste se colocó en un sistema de perfusión según la técnica modificada de Langendorff.

El corazón se perfundió con solución de Ringer, compuesta de la siguiente manera: ClNa 118 mM, Cl_2Ca 2 mM, ClK 5,9 mM, SO_4Mg 1,2 mM, CO_3HN 20 mM y dextrosa 11,1 mM. La solución fue termos-

tatizada a $36,5 \pm 0,03^\circ C$ y equilibrada con una mezcla de 95% O_2 -5% CO_2 , para obtener un pH de $7,45 \pm 0,01$. Se suturaron dos electrodos para estimular el corazón y así poder mantener la frecuencia cardíaca constante en un valor de 175 latidos/min. Se dejó que el corazón se estabilizara durante 20 minutos.

Análisis de datos

En el ventrículo izquierdo se colocó un balón de látex atado a uno de los extremos de un tubo rígido de polietileno, pasándolo por el anillo mitral a través de un ojal practicado en la orejuela izquierda. El otro extremo del tubo se conectó a un transductor de presión Deltram II (Utah Medical System), el cual nos permitió registrar la presión en el interior del ventrículo izquierdo. El globo de látex se llenó con solución acuosa hasta lograr una presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) de 8-12 mm Hg y este volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. Considerando que la rigidez ventricular diastólica se expresa a través de la relación dP/dV , entonces, en el corazón isovolúmico, la presión diastólica final es índice de rigidez ventricular.

También se registró la presión de perfusión coronaria (PPC) a través de otro transductor de presión conectado a la línea de perfusión. El flujo coronario, controlado con una bomba peristáltica, se reguló para conseguir una PPC de aproximadamente $74,2 \pm 1,8$ mm Hg. Debido a que la resistencia vascular está definida por la relación entre la presión y el flujo, en un corazón perfundido a flujo coronario constante, la presión de perfusión coronaria indica la resistencia vascular coronaria.

La presión intraventricular izquierda (PVI) y la PPC se registraron en una computadora PC con plaqueta conversora analógica-digital que permite registros en tiempo real. La fase de relajación se evaluó utilizando la constante de tiempo de decaimiento de la presión ventricular durante la fase de relaja-

GRUPO 1 ("miocardio atontado")

Estabilización (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusión (30 min)
----------------------------	----------------------	-------------------------

GRUPO 2

Estabilización (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusión con adenosina (30 min)
----------------------------	----------------------	---------------------------------------

GRUPO 3

Estabilización (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusión con adenosina + DPCPX (30 min)
----------------------------	----------------------	---

Fig. 1. Diseño esquemático de los protocolos experimentales.

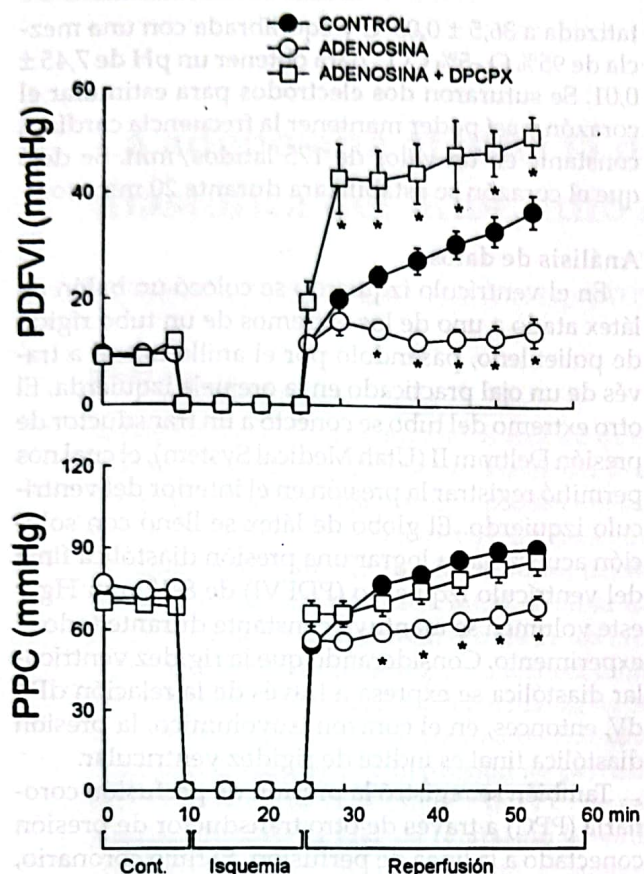


Fig. 2. Valores de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) (panel superior) y de la presión de perfusión coronaria (PPC) (panel inferior) en los tres grupos estudiados, en situación control y durante 30 minutos de reperusión, después de 15 minutos de isquemia. Se observa que la adenosina atenuó el aumento de la rigidez diastólica y de la presión de perfusión coronaria. *: $p < 0,05$ versus control.

ción (τ , tau). (16) Durante el período isquémico los corazones se mantuvieron en normotermia mediante inmersión en una cámara termostataizada que contenía solución acuosa.

Protocolo experimental

Se conformaron tres grupos experimentales (Figura 1):

Grupo 1 ($n = 14$): se indujo una disfunción ventricular posisquémica sistólica y diastólica ("miocardio atontado") mediante un período de 15 minutos de isquemia seguido por 30 minutos de reperusión. Se utilizó isquemia global, la cual se indujo con la disminución brusca del flujo coronario total aportado por la bomba de perfusión.

Grupo 2 ($n = 14$): en este grupo de animales se repitió el protocolo del grupo 1, pero se administró adenosina ($0,3 \text{ mg/kg/min}$) a la solución de Ringer, desde el inicio de la reperusión y se continuó hasta el final de ésta.

Grupo 3 ($n = 10$): se repitió el protocolo del grupo

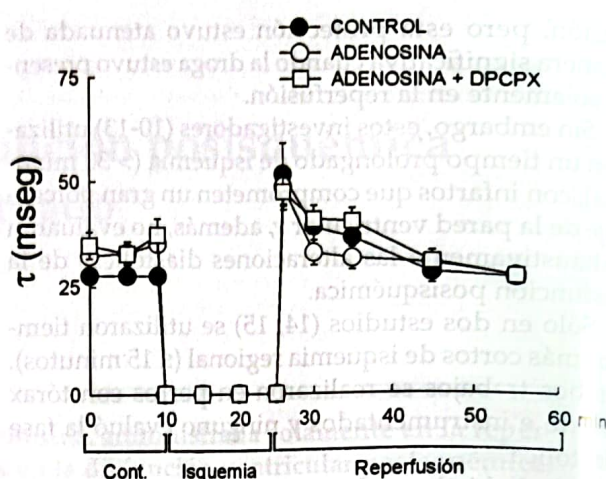


Fig. 3. Comportamiento de la constante de tiempo de decaimiento de la presión τ utilizada para evaluar relajación isovolúmica. Obsérvese que la adenosina no atenuó las alteraciones tempranas de la relajación que ocurren en el miocardio atontado en ninguno de los grupos evaluados.

1, pero se agregó adenosina ($0,3 \text{ mg/kg/min}$) y DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina) (200 nM), a la solución de Ringer, desde el inicio de la reperusión y se continuó hasta el final de ésta.

Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media $\pm$ error estándar (ES) y los datos se analizaron por análisis de varianza seguido por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de $0,05$.

RESULTADOS

En el panel superior de la Figura 2 puede observarse el comportamiento de la presión diastólica final en el grupo control, la cual aumentó el $293 \pm 4\%$ a los 30 minutos del mencionado período ($p < 0,05$ versus valor preisquémico). Con la administración de adenosina desde el comienzo de la reperusión, la presión diastólica final no aumentó significativamente, alcanzando el $15 \pm 8\%$ ($p < 0,05$ versus grupo control) a los 30 minutos. La reperusión en presencia de adenosina más DPCPX no logró atenuar el aumento de la rigidez diastólica, aumentando a los 30 minutos del mencionado período el $493 \pm 9\%$ ($p < 0,05$ versus grupo control y grupo con adenosina). En el panel inferior de la misma figura se grafica la evaluación de las variaciones de la presión de perfusión coronaria en los tres grupos estudiados. Se observa que, en el grupo control, inmediatamente después del período de isquemia la presión comienza a elevarse progresivamente hasta alcanzar el $127 \pm 3\%$ ($p < 0,05$ versus valor preisquémico) a los 30 minutos del período de reperusión. En el grupo que

recibió el nucleósido desde el inicio de la reperfusión se observa la caída de la presión de perfusión coronaria hasta el $77 \pm 5\%$ al minuto del mencionado período ($p < 0,05$) con respecto a valores preisquémicos. Luego de 30 minutos de reperfusión alcanzó el $95 \pm 8\%$. El grupo tratado con el bloqueante A_1 mostró un comportamiento similar al del miocardio atontado, alcanzando el $124 \pm 8\%$ hacia los 30 minutos de la reperfusión.

En la Figura 3 se muestra el comportamiento de la constante de tiempo de decaimiento de la presión, τ . Se observa que en el grupo con disfunción posisquémica hay una lentificación transitoria de la velocidad de relajación, que se refleja en un aumento del τ desde $27,6 \pm 1$ mseg en situación control hasta valores de $51,9 \pm 7$ mseg ($p < 0,05$ *versus* valor preisquémico) al minuto de la reperfusión, para normalizarse progresivamente durante el transcurso de la reperfusión. La administración de adenosina, ya sea sola o en combinación con DPCPX, no modificó las alteraciones de esta fase de la diástole.

DISCUSION

En el presente trabajo se muestra evidencia experimental que indica que la administración de adenosina exógena, desde el inicio de la reperfusión en un modelo de corazón aislado con isquemia global protege al miocardio de las alteraciones diastólicas presentes en la disfunción posisquémica, particularmente del aumento de la rigidez miocárdica, a través de la activación de los receptores A_1 de adenosina. Sin embargo, la adenosina no modificó el componente activo diastólico evaluado a través de la relajación isovolúmica. La administración del bloqueante selectivo de los receptores A_1 , además de eliminar el efecto protector de la adenosina, deprimió el estado contráctil por debajo de los valores del grupo control. Esto estaría de acuerdo con los hallazgos previos de Zhao y colaboradores, (17) quienes demostraron la importancia de la adenosina endógena en la modulación del daño producido por la isquemia.

Si bien varios estudios previos (10-13) pusieron en evidencia el efecto protector de la adenosina sobre el daño isquémico, cuando se administra en la reperfusión, nuestro trabajo extiende ese concepto de protección en varios aspectos importantes.

En primer lugar, estos estudios (10-13) utilizaron modelos de isquemia regional y evaluaron particularmente la función sistólica. Nosotros analizamos los dos componentes de la fase diastólica: la relajación isovolúmica y la rigidez ventricular. Es conocido que en la disfunción posisquémica existe durante la reperfusión una alteración de las dos fases de la diástole (5) que se manifiesta según se evalúe la reperfusión precoz o tardía: mientras que en la re-

perfusión precoz existe una lentificación transitoria de la relajación que se normaliza en función del tiempo, en la reperfusión tardía se observa un aumento pronunciado de la rigidez ventricular pero con relajación normal. La adenosina atenuó el aumento de la rigidez ventricular diastólica, pero no modificó las alteraciones tempranas de la relajación isovolúmica. Como ya se mencionó, en general los trabajos evaluaron la protección farmacológica de la disfunción posisquémica sistólica a través de la administración de adenosina, pero es poco lo mostrado acerca de su efecto sobre las alteraciones diastólicas. En nuestro conocimiento, un solo trabajo (13) mostró mejoría del estado contráctil y atenuación del aumento de la rigidez diastólica durante la reperfusión, en un modelo de corazón aislado e isovolúmico, con la administración de la adenosina antes del período de isquemia, durante él y después. Sin embargo, no encontraron protección cuando la intervención se realizó solamente en la reperfusión. Además, utilizaron un tiempo prolongado de isquemia (30 minutos), por lo que es válido pensar que la adenosina actuó disminuyendo el tamaño del infarto (precondicionamiento) y de esta manera indirectamente mejoró la función ventricular.

Una tercera diferencia con trabajos previos (10-13) es el tiempo de isquemia utilizado. Algunos autores usaron tiempos prolongados (≥ 30 minutos), donde existen áreas de infarto de miocardio que comprometen un gran porcentaje de la pared ventricular. Nosotros utilizamos un modelo con 15 minutos de isquemia global. Con este tiempo de isquemia el tamaño del infarto es poco significativo y el daño funcional es completamente reversible. En nuestro conocimiento sólo dos trabajos (14, 15) utilizaron tiempos cortos de isquemia y la adenosina se administró en la reperfusión. Sin embargo, estos estudios utilizaron una especie diferente, como el perro, y en un modelo experimental de tórax abierto, es decir, corazones que desarrollaban trabajo externo, lo cual dificulta la evaluación de la función ventricular. Además, no pudieron encontrar protección. En acuerdo con estos investigadores, Goto y colaboradores (18) tampoco encontraron protección administrando la droga solamente en la reperfusión en un modelo de conejo instrumentado, por lo que deberíamos descartar una diferencia de especies.

Si bien nuestro protocolo experimental no se diseñó para estudiar los mecanismos intracelulares involucrados en la protección miocárdica por la adenosina, nuestros datos permiten realizar algunas especulaciones. En primer lugar, la reperfusión provoca un deterioro significativo de la respuesta vasodilatadora en el lecho previamente isquémico, con liberación de endotelinas, una de las más potentes sustancias vasoconstrictoras, que tendrían un papel

importante en la reducción del flujo sanguíneo durante la reperfusión; (19) de esta manera, el incremento de la PPC podría ser responsable, por lo menos en parte, del incremento de la rigidez diastólica. Así, Velasco y colaboradores (20) describieron que la adenosina puede disminuir durante la reperfusión temprana la liberación de endotelinas, mejorando la función ventricular. En segundo lugar, la estimulación del receptor A_1 de adenosina inhibe la actividad de la enzima adenilciclase disminuyendo, de esta manera, los niveles de AMP cíclico y, como consecuencia, la entrada de Ca^{++} al citosol a través de los canales lentos de Ca^{++} ubicados en la membrana plasmática. (21) Por último, es conocido que el preconditionamiento isquémico involucra una serie de acontecimientos intracelulares que se inician con la activación del receptor A_1 y que tienen como uno de sus efectores finales a los canales de K^+ ATP sensibles de la mitocondria. (22) La fosforilación y apertura de estos canales provocaría la aparición del efecto protector. Si bien la activación de este mecanismo específico durante la reperfusión no se estudió, nuestros datos sugieren que el paso inicial de este mecanismo específico de protección está dado, al haber mostrado en nuestro estudio que la protección durante la reperfusión requiere la activación de los receptores A_1 .

En resumen, mostramos en un modelo experimental con estricto control de variables e isquemia global que la administración de adenosina, durante la reperfusión, protege al miocardio del aumento de la rigidez diastólica, sin modificar la relajación isovolumétrica. Esta protección está directamente relacionada con la activación de los receptores A_1 purinérgicos. Aunque la extrapolación de datos obtenidos en animales de experimentación a pacientes debe realizarse con extrema cautela, el hecho de que la administración de la adenosina posterior al período de isquemia tenga un efecto protector podría representar una interesante propuesta terapéutica. Sin embargo, deben considerarse sus efectos hipotensores debidos a la activación del receptor A_2 , la fugacidad de la acción de este compuesto y la aparición de tolerancia cuando se administra en forma crónica. (23)

SUMMARY

BENEFICAL EFFECT OF ADENOSINE ON DIASTOLIC STUNNED MYOCARDIUM RECOVERY

There is experimental evidence that adenosine, administered only during the reperfusion period, attenuates systolic alterations of the post-ischemic ventricular dysfunction. However, it is not clear if this protection includes the diastolic dysfunction. Thus the main objective of our work was to dis-

close if adenosine, administered only during reperfusion, attenuates the diastolic alterations after 15 minutes of global ischemia. An additional objective of this work was to determine the possible participation of A_1 receptors as possible mediators of the abovementioned effects. Isolated and isovolumic rabbit hearts, were perfused according to the Langendorff technique, and subjected to 15 minutes of global ischemia followed by 30 minutes of reperfusion. Using a pressure transducer we registered the left ventricular end diastolic pressure (myocardial stiffness), and the coronary perfusion pressure. The time constant of pressure decay during the isovolumic relaxation phase (τ) was calculated. We found that adenosine administration from the beginning of the reperfusion attenuates the increase of myocardial stiffness, without modifying the early alterations of the isovolumic relaxation. This protection was mediated by activation of A_1 receptors.

Key words Stunned myocardium - Adenosine - Diastolic function

BIBLIOGRAFIA

1. Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation* 1990; 82: 723-738.
2. Heyndrickx G, Baig H, Nellens P y col. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusions. *Am J Physiol* 234: H653-H659.
3. Charlat M, O'Neill P, Hartley J y col. Prolonged abnormalities of left ventricular diastolic wall thinning in the "stunned" myocardium in conscious dog: Time course and relation to systolic function. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 185-194.
4. Przylenk K, Patel B, Kloner R. Diastolic abnormalities of postischemic "stunned" myocardium. *Am J Cardiol* 1987; 60: 1211-1213.
5. Mosca SM, Gelpi RJ, Cingolani HE. Dissociation between myocardial relaxation and diastolic stiffness in the stunned heart: Its prevention by ischemic preconditioning. *J Mol Cell Biochem* 1993; 129: 171-178.
6. Gelpi RJ, Morales C, Rodríguez M y col. Efecto del enaprilato sobre la disfunción postisquémica sistólica y diastólica ("miocardio atontado") en el corazón aislado de conejo. *Medicina (Buenos Aires)* 1998; 58: 22-28.
7. Donato M, Morales C, Bagnarelli A y col. Adenosina exógena y disfunción postisquémica en el corazón aislado de conejo. *Medicina (Buenos Aires)* 1999; 59: 339-347.
8. Morales C, Rodríguez M, Scapin O y col. Comparison of the effects of ACE inhibition with those of angiotensin II receptor antagonism on systolic and diastolic myocardial stunning in isolated rabbit heart. *Mol Cell Biochem* 1998; 186: 117-121.
9. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
10. Olafsson B, Forman M, Puett D y col. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: Importance of endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987; 76: 1135-1145.
11. Homeister J, Hoff P, Fletcher D y col. Combined adenosine and lidocaine administration limits myocardial reperfusion injury. *Circulation* 1990; 82: 595-608.

12. Norton E, Jackson E, Virmani R y col. Effect of intravenous adenosine on myocardial reperfusion injury in a model with low myocardial collateral blood flow. *Am Heart J* 1991; 122: 1283-1291.
13. Janier M, Vanoverschelde JL, Bergman S. Adenosine protects ischemic and reperfused myocardium by receptor-mediated mechanism. *Am J Physiol* 1993; 264: H163-170.
14. Sekili S, Jeroudi M, Tang X y col. Effect of adenosine in myocardial "stunning" in the dog. *Circ Res* 1995; 76: 82-94.
15. Jeroudi M, Xian-Liang T, Abd-Elfattah A. Effect of adenosine A₁ receptor activation on myocardial stunning in intact dogs. *Circulation* 1994; 90 (Pt II): 2574.
16. Raff GL, Glantz SA. Volume loading slows left ventricular isovolumetric relaxation rate: Evidence of load-dependent relaxation in the intact dog heart. *Circ Res* 1981; 48: 813-824.
17. Zhao Z, Katsuhiko N, McGee S y col. A₁ receptor mediated myocardial infarct size reduction by endogenous adenosine is exerted primarily during ischemia. *Cardiovascular Res* 1994; 28: 270-279.
18. Goto M, Miura T, Illiodoromitis E y col. Adenosine infusion during early reperfusion failed to limit myocardial infarct size in collateral deficient species. *Cardiovascular Res* 1991; 25: 943-949.
19. Pernow J, Wang Q-D. Endothelin in myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1997; 33: 518-526.
20. Velasco C, Jackson E, Morrow J y col. Intravenous adenosine suppresses cardiac release of endothelin after myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993; 24: 121-128.
21. Forman M, Velasco C, Jackson E. Adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 9-17.
22. Baines C, Cohen M, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial K⁺_{ATP} channels. *J Cardiovasc Electrophysiol* 1999; 10: 741-754.
23. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1994; 74: 998-1004.