

## **La adenosina atenúa la disfunción posisquémica diastólica del miocardio atontado**

VERONICA D'ANUNZIO, MARTIN DONATO<sup>1</sup>

### **RESUMEN**

Existe evidencia experimental acerca de que la adenosina, administrada solamente en la reperfusión, 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 reperfusión, atenúa las alteraciones diastólicas presentes luego de 15 minutos de isquemia global y, como objetivo adicional, evaluar la posible participación de los receptores A<sub>1</sub> de adenosina actuando como mediadores de los efectos anteriores. Corazones aislados e isovolumicos de conejo, perfundidos según la técnica modificada de Langendorff, fueron sometidos a isquemia global de 15 minutos y reperfusión de 30 minutos. La colocación de un balón de latex 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 isovolumica ( $\tau$ , c). La adenosina administrada desde el comienzo de la reperfusión atenuó el aumento de la rigidez diastólica, sin modificar las alteraciones tempranas de la relajación isovolumica. Este efecto protector fue mediado por la activación de los receptores A<sub>1</sub>. 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 contractil. (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 isovolumica y un trastorno tardío (pero persistente) de la rigidez miocárdica.

Así, varios trabajos experimentales, incluidos estudios realizados en nuestro laboratorio, demost

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 reperfusión y entre ellos se destaca la adenosina. Así, diversos trabajos (10-12) mostraron que la administración de adenosina durante la reperfusión 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

<sup>1</sup>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 2°, (1114) Buenos Aires, Argentina - Tel. /Fax: 54 114962-4945

E-mail: [mdonato@fmed.uba.ar](mailto:mdonato@fmed.uba.ar)

fusion, pero esta proteccion estuvo atenuada de manera significativa cuando la droga estuvo presente solamente en la reperfusion.

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, ademas, no evaluaron exhaustivamente las alteraciones diastolicas de la disfuncion posisquemica.

Solo en dos estudios (14, 15) se utilizaron tiempos mas cortos de isquemia regional (< 15 minutos). Ambos trabajos se realizaron en perros con torax abierto e instrumentados y ninguno evaluo la fase diastolica.

Asi, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si la adenosina administrada solamente durante el periodo de reperfusion atenua las alteraciones diastolicas de la disfuncion posisquemica, evaluando tanto el componente activo (relajacion) como el pasivo (rigidez miocardica). Un segundo objetivo lo constituyo la evaluacion de la posible participacion de los receptores A<sub>1</sub> de adenosina mediando 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 sodico (35 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg). Se abrio el torax rapidamente y se aislo la arteria aorta, para luego colocar y ligar con hilo de lino una canula en la mencionada arteria. Una vez removido el corazon, este se coloco en un sistema de perfusion segun la tecnica modificada de Langendorff.

El corazon se perfundio con solucion de Ringer, compuesta de la siguiente manera: C1Na 118 mM, Cl<sub>2</sub>Ca 2 mM, C1K 5,9 mM, SO<sub>4</sub> Mg 1,2 mM, CO<sub>3</sub>HNa 20 mM y dextrosa 11,1 mM. La solucion fue termos-

tatizada a  $36,5 \pm 0,03^{\circ}\text{C}$  y equilibrada con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, para obtener un pH de  $7,45 \pm 0,01$ . Se suturaron dos electrodos para estimular el corazon y asi poder mantener la frecuencia cardiaca constante en un valor de 175 latidos/min. Se dejo que el corazon se estabilizara durante 20 minutos.

### Analisis de datos

En el ventriculo izquierdo se coloco un balon de latex atado a uno de los extremos de un tubo rigido de polietileno, pasandolo por el anillo mitral a traves de un ojal practicado en la orejuela izquierda. El otro extremo del tubo se conecto a un [transductor de presion Deltram II](#) (Utah Medical System), el cual nos permitio registrar la presion en el interior del ventriculo izquierdo. El globo de latex se lleno con solucion acuosa hasta lograr una presion diastolica final del ventriculo izquierdo (PDFVI) de 8-12 mm Hg y este volumen se mantuvo constante durante todo el experimento. Considerando que la rigidez ventricular diastolica se expresa a traves de la relacion  $dP/dV$ , entonces, en el corazon isovolumico, la presion diastolica final es indice de rigidez ventricular.

Tambien se registro la presion de perfusion coronaria (PPC) a traves de otro transductor de presion conectado a la linea de perfusion. El flujo coronario, controlado con una bomba peristaltica, se regulo para conseguir una PPC de aproximadamente  $74,2 \pm 1,8$  mm Hg. Debido a que la resistencia vascular esta definida por la relacion entre la presion y el flujo, en un corazon perfundido a flujo coronario constante, la presion de perfusion coronaria indica la resistencia vascular coronaria.

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

#### GRUPO 1 ("miocardio atontado")

Estabilizacion (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusion (30 min)
----------------------------	----------------------	-------------------------

#### GRUPO 2

Estabilizacion (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusion con adenosina (30 min)
----------------------------	----------------------	---------------------------------------

#### GRUPO 3

Estabilizacion (20 min)	Isquemia (15 min)	Reperfusion con adenosina + DPCPX (30 min)
----------------------------	----------------------	---

Fig. 1. Diseno esquematico de los protocolos experimentales.

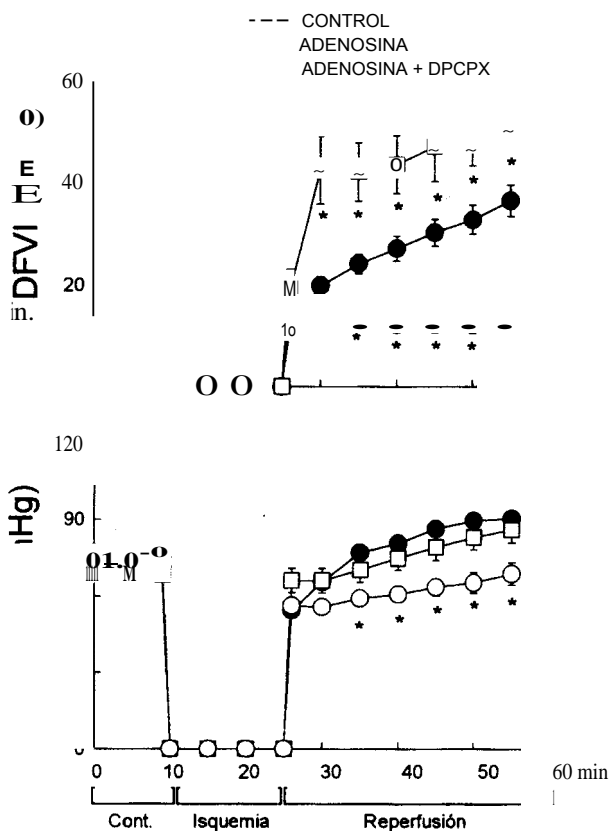


Fig. 2. Valores de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) (panel superior) y de la presión de perfusión coronaria (PPC) (panel inferior) en los tres grupos estudiados, en situación control y durante 30 minutos de reperusión, después de 15 minutos de isquemia. Se observa que la adenosina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

don (1, tau). (16) Durante el periodo isquemico los corazones se mantuvieron en normotermia mediante immersion en una camara termostatazada que contenia solucion acuosa.

#### Protocolo experimental

Se conformaron tres grupos experimentales (Figura 1):

Grupo 1 ( $n = 14$ ): se indujo una disfuncion ventricular posisquemica sistolica y diastolica ("miocardio atontado") mediante un periodo de 15 minutos de isquemia seguido por 30 minutos de reperfusion. Se utilizo isquemia global, la cual se indujo con la disminucion brusca del flujo coronario total aportado por la bomba de perfusion.

Grupo 2 ( $n = 14$ ): en este grupo de animales se repitio el protocolo del grupo 1, pero se administro adenosina ( $0,3 \text{ mg/kg/min}$ ) a la solucion de Ringer, desde el inicio de la reperfusion y se continuo hasta el final de esta.

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

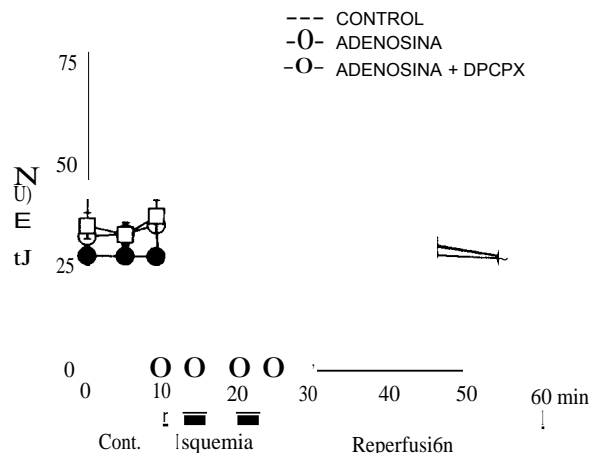


Fig. 3. Comportamiento de la constante de tiempo de decaimiento de la presión  $t$  utilizada para evaluar relajación isovolumétrica. Obsérvese que la adenosina no atenuó las alteraciones tempranas de la relajación que ocurren en el miocardio atontado en ninguno de los grupos evaluados.

1, pero se agrego adenosina ( $0,3 \text{ mg/kg/min}$ ) y DPCPX (8-ciclopentil-1,3-dipropilxantina) ( $200 \text{ nM}$ ), a la solucion de Ringer, desde el inicio de la reperfusion y se continuo hasta el final de esta.

#### Análisis estadístico

Los resultados se expresan como la media  $\pm$  error estandar (ES) y los datos se analizaron por analisis de varianza seguido por la prueba de Bonferroni para comparaciones multiples. Se considero 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 aumento el  $293 \pm 4\%$  a los 30 minutos del mencionado periodo ( $p < 0,05$  versus valor preisquemico). Con la administracion de adenosina desde el comienzo de la reperfusion, la presión diastólica final no aumento significativamente, alcanzando el  $15 \pm 8\%$  ( $p < 0,05$  versus grupo control) a los 30 minutos. La reperfusion en presencia de adenosina mas DPCPX no logro atenuar el aumento de la rigidez diastólica, aumentando a los 30 minutos del mencionado periodo 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 evaluacion de las variaciones de la presión de perfusión coronaria en los tres grupos estudiados. Se observa que, en el grupo control, inmediatamente despues del periodo de isquemia la presión comienza a elevarse progresivamente hasta alcanzar el  $127 \pm 3\%$  ( $p < 0,05$  versus valor preisquemico) a los 30 minutos del periodo de reperfusion. En el grupo que

recibio el nucleosido 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 periodo ( $p < 0,05$ ) con respecto a valores preisquémicos. Luego de 30 minutos de reperfusión alcanza el  $95 \pm 8\%$ . El grupo tratado con el bloqueante  $A_1$  mostro 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,  $\tau$ . 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  $\tau$  desde  $27,6 \pm 1$  msec en situación control hasta valores de  $51,9 \pm 7$  msec ( $p < 0,05$  *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 isovolumétrica. La administración del bloqueante selectivo de los receptores  $A_1$ , además de eliminar el efecto protector de la adenosina, deprimió el estado contractil 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 isovolumétrica 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 isovolumétrica. 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) mostro mejoría del estado contractil y atenuación del aumento de la rigidez diastólica durante la reperfusión, en un modelo de corazón aislado e isovolumétrico, con la administración de la adenosina antes del periodo de isquemia, durante el 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 solo 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  $Ca^{2+}$  al citosol a través de los canales lentos de  $Ca^{2+}$  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

### BENEFICIAL 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 isovolumetric 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 isovolumetric relaxation phase ( $\tau$ , r) 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 isovolumetric 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, Rodriguez 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, Rodriguez M, Scapfn 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 A<sub>1</sub> 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. A<sub>1</sub> 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 supresses 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 mitochondria) K<sub>Atp</sub> 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.