

## **Relación entre tamaño de infarto y rigidez miocárdica: efectos del preconditionamiento isquémico**

VERONICA D'ANNUNZIO, MARTIN DONATO, MELINA SABAN, RICARDO J. GELPP

### **RESUMEN**

**Es conocido que el preconditionamiento isquémico disminuye el tamaño de infarto; sin embargo,** sus efectos sobre la disfunción posisquémica son controversiales. Por otro lado, el infarto de miocardio produce un **aumento en la rigidez diastólica** y este aumento es proporcional al tamaño del infarto. Sobre la base de estos conocimientos sería de esperar que si el preconditionamiento isquémico produce una reducción significativa en el tamaño de infarto debería atenuar el aumento de la rigidez diastólica. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si el preconditionamiento isquémico, al disminuir el tamaño de infarto, atenúa el aumento de la rigidez miocárdica. Corazones aislados **e isovolúmicos de conejo, perfundidos según la técnica de Langendorff modificada fueron sometidos a 30 minutos de isquemia seguidos de 30 minutos de reperfusión.** A un segundo grupo de corazones se les realizó un protocolo de preconditionamiento isquémico previo a la isquemia prolongada. La colocación **de un balón de látex en el ventrículo izquierdo conectado a un transductor de presión** permitió registrar la presión de fin de diástole (rigidez miocárdica). Además, se midió el tamaño de infarto utilizando cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio. El preconditionamiento isquémico disminuyó significativamente el tamaño de infarto producto de 30 minutos de isquemia global pero no atenuó el aumento de la rigidez miocárdica, probablemente por la persistencia de áreas de atontamiento adyacentes al área de infarto. REV ARGENT CARDIOL 2001; 69: 630-635.

*Palabras clave* Preconditionamiento isquémico - Infarto - Función diastólica

### **INTRODUCCION**

El preconditionamiento isquémico fue descrito por primera vez en el año 1986 por Murry y colaboradores. (1) Estos investigadores observaron que el tamaño de infarto producido por la oclusión de la arteria descendente anterior en corazones de perro podía reducirse si, previamente a una isquemia prolongada (40 minutos), se sometía al corazón a varios ciclos de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusión. Este fenómeno, denominado preconditionamiento isquémico, es el mecanismo de protección fisiológica más potente conocido hasta el momento.

Años más tarde se demostró que el preconditionamiento,

además de producir una disminución en el tamaño de infarto, atenúa las arritmias ventriculares que aparecen durante la reperfusión. (2) Sin embargo, los efectos protectores de este fenómeno sobre el "miocardio atontado" son controversiales.

En referencia a esto, Ovize y colaboradores (3) observaron en corazones de perros sometidos a isquemia regional que el preconditionamiento isquémico no previene el atontamiento del miocardio durante las primeras horas de la reperfusión. En concordancia con estos hallazgos, Jenkins y colaboradores, (4) utilizando un modelo de isquemia global en conejos, demostraron que el preconditionamiento isquémico limita el tamaño de infarto pero que

no atenúa el atontamiento. A diferencia de estos autores, Urabe y colaboradores, (5) en su estudio de corazones aislados de conejo con isquemia regional, demostraron que el preconditionamiento protege al corazón del atontamiento isquémico a través de la activación de los receptores de adenosina.

Por otro lado, es sabido que el infarto de miocardio produce un aumento de la rigidez diastólica, (6-8) y este aumento es proporcional al tamaño del infarto. Sobre la base de estos conocimientos sería de esperar que si el preconditionamiento isquémico produce una reducción significativa en el tamaño de infarto debería atenuar el aumento de la rigidez diastólica.

Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo fue el de determinar si el preconditionamiento isquémico, al disminuir el tamaño de infarto, atenúa el aumento de la rigidez miocárdica.

## MATERIAL Y METODO

Se utilizaron conejos (1,8 a 2 kg), que fueron anestesiados con tiopental sódico (35 mg/kg) y ketamina (75 mg/kg). Se abrió rápidamente el tórax y se identificó y aisló la arteria aorta, para luego colocar una cánula en ella. A través de esta vía se introdujo solución de Krebs-Henseleit heparinizada para lavar la sangre de todo el árbol coronario, e inmediatamente se extrajo el corazón del animal. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 60 segundos, para evitar el deterioro del preparado. Una vez removido el corazón, éste se colocó por intermedio de la cánula en un sistema de perfusión según la técnica modificada de Langendorff.

Así, el corazón fue perfundido con solución de Krebs-Henseleit, compuesta de la siguiente manera: NaCl 118,5 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 24,8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L, CaCl<sub>2</sub> 2,5 mmol/L y dextrosa 10 mmol/L. La solución se mantuvo a temperatura constante de 37°C y se equilibró con una mezcla gaseosa compuesta por 95% de O<sub>2</sub> y 5% de CO<sub>2</sub> para oxigenarla y mantener su pH dentro del rango fisiológico. Se suturaron dos electrodos, conectados a un marcapaso (QRS Ingeniería Médica), para estimular el corazón y así poder mantener una frecuencia cardíaca constante en 175 lat/min.

En la cavidad del 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 permitió medir la presión intraventricular izquierda. El globo de látex se llenó con solución acuosa hasta lograr una presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) de aproximadamente 10 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 miocárdica.

Durante los períodos de isquemia, los corazones se mantuvieron en normotermia mediante inmersión en una cámara termostatzada conteniendo solución acuosa.

## Medición del tamaño de infarto

Después de finalizada la evaluación de la función diastólica, los corazones se cortaron en secciones de 2 mm de espesor desde la punta hasta la base, que se incubaron en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio, a pH 7,8 y a 37°C, durante 10 minutos. Con esta técnica, el tejido viable se tiñe de rojo mientras que la zona no teñida corresponde al área de infarto.

Las secciones se calcularon en hojas de acetato. El área de infarto se midió utilizando planimetría computarizada (analizador de imágenes: Image Pro Plus®, versión 3.0) y el tamaño de infarto se expresó como porcentaje del área del ventrículo izquierdo.

## Protocolo experimental

Se conformaron dos grupos experimentales (Figura 1):

Grupo 1 (n = 6): después de un período de estabilización de 20 minutos, se sometió a los corazones a una isquemia global de 30 minutos, disminuyendo bruscamente el flujo coronario total aportado por la bomba de perfusión. Luego del período de isquemia se reperfundieron los corazones durante 30 minutos.

Grupo 2 (n = 5): se realizó un protocolo de preconditionamiento isquémico, consistente en un período de isquemia de 5 minutos seguido por 5 minutos de reperfusión antes de repetir el protocolo del grupo 1.

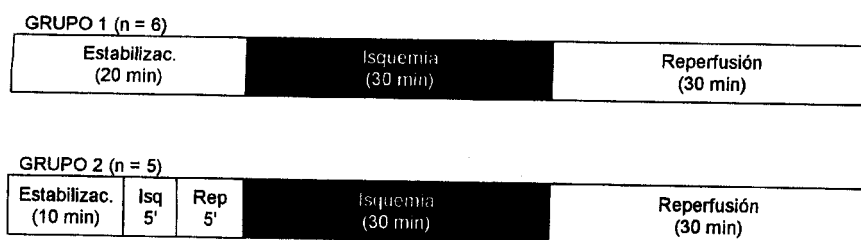


Fig. 1. Esquema de IOs prOtocolOs experimentales realizados. Estabilizac.: Estabilización. Isq.: Isquemia. Rep.: Reperfusión.

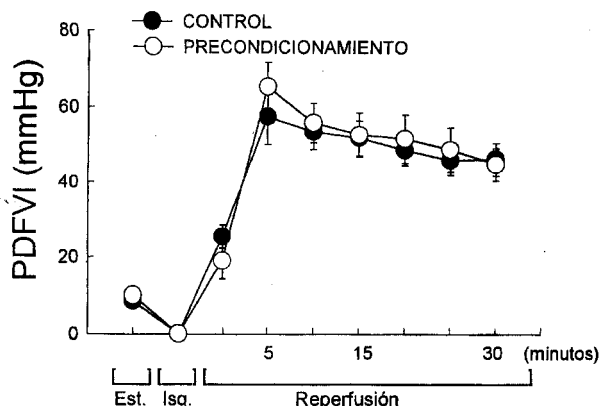


Fig. 2. Valores de presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) en la estabilización, durante la isquemia y durante 30 minutos de reperfusión. El preconditionamiento isquémico no atenuó el aumento de la rigidez miocárdica. Estabiliz.: Estabilización.

**Análisis estadístico**

Los datos obtenidos se analizaron con un programa estadístico (Primer of Biostatistics 4.02). Los datos se expresaron como la media aritmética y el error estándar (EE) de la media. Como pruebas de significación se realizaron el análisis de la varianza seguido de una prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0,05.

**RESULTADOS**

En la Figura 2 puede observarse el comportamiento de la presión diastólica final del ventrículo izquierdo (PDFVI) en el grupo control y en el grupo sometido a un protocolo de preconditionamiento isquémico.

En el grupo control la PDFVI alcanzó un valor de  $46,26 \pm 4,36$  mm Hg a los 30 minutos de la reperfusión, mientras que en el grupo preconditionado esta variable no presentó diferencias significativas con

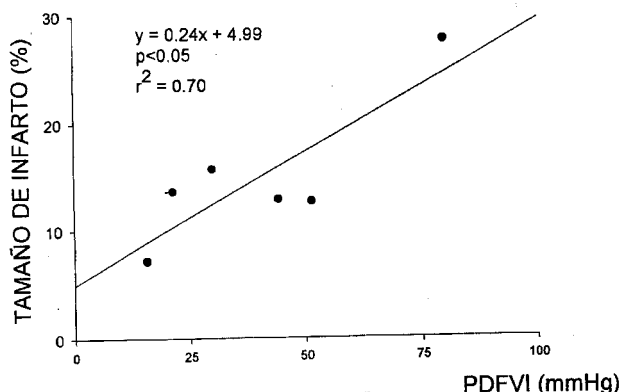


Fig. 4. Correlación entre el tamaño de infarto y la presión diastólica final (PDFVI) en los corazones sometidos sólo a 30 minutos de isquemia global seguidos de 30 minutos de reperfusión.

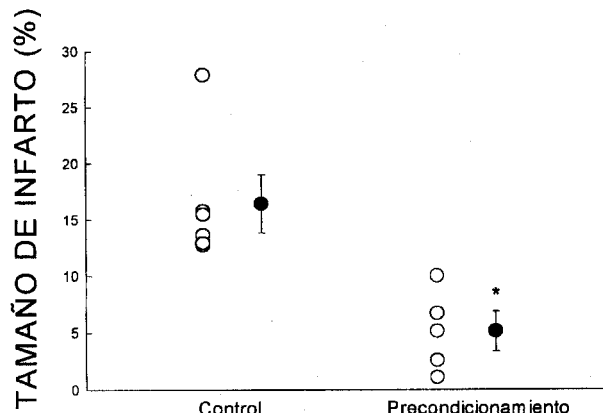


Fig. 3. Tamaño de infarto, producto de 30 minutos de isquemia global, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo. O corresponde a los experimentos individuales, ● corresponde a la media  $\pm$  error estándar. \*:  $p < 0,05$  versus control.

respecto al grupo control, alcanzando un valor de  $44,89 \pm 4,33$  mm Hg a los 30 minutos ( $p = NS$  versus control). Así, el preconditionamiento isquémico no logró atenuar el aumento de la rigidez diastólica presente luego de 30 minutos de isquemia global.

En la Figura 3 se muestra el tamaño de infarto, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo, en los corazones correspondientes al grupo control y al grupo sometido al protocolo de preconditionamiento isquémico.

En el grupo control, 30 minutos de isquemia global produjeron el  $16,59 \pm 2,59\%$  de infarto, mientras que en el grupo al cual se le realizó un protocolo de preconditionamiento isquémico, el tamaño de infarto alcanzó el  $5,09 \pm 1,75\%$ , diferencia ésta que resultó significativa respecto del grupo control ( $p < 0,05$  versus control). Estos datos muestran el conocido efecto del preconditionamiento isquémico sobre el tamaño de infarto.

La Figura 4 muestra la correlación entre el tama-

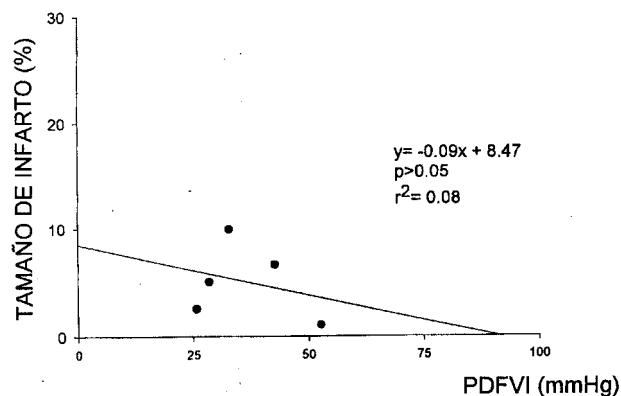


Fig. 5. Correlación entre el tamaño de infarto y la presión diastólica final (PDFVI) en los corazones sometidos a un protocolo de preconditionamiento isquémico.

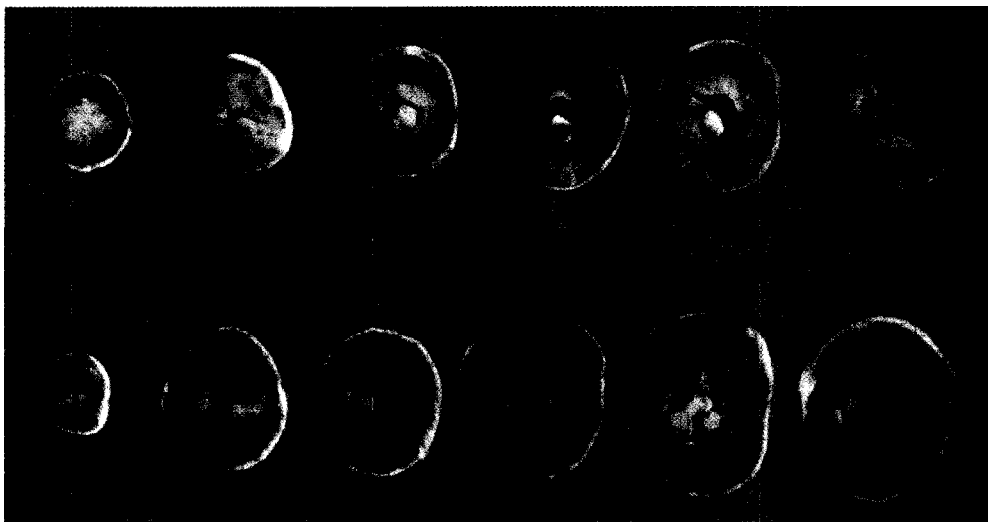


Fig. 6. Cortes transversales correspondientes a dos corazones sometidos a 30 minutos de ischemia global. En la fila superior se encuentra el corazón correspondiente al grupo control y en la inferior el que fue sometido a un protocolo de preconditionamiento isquémico. El color rojo representa el área viable, mientras que el blanco representa la zona infartada.

ño de infarto y la PDFVI a los 30 minutos del período de reperfusión, en los dos grupos estudiados. Se observa una correlación significativa entre estas dos variables en el grupo control. Sin embargo, en la Figura 5 puede verse que esta correlación se pierde cuando los corazones son sometidos a un protocolo de preconditionamiento isquémico.

Los cortes transversales desde la punta hacia la base de dos corazones, coloreados con TTC (cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio), se muestran en la Figura 6. La fila superior corresponde a una serie de cortes de un corazón sometido a 30 minutos de ischemia global seguidos por 30 minutos de reperfusión y la fila inferior, a los cortes de un corazón que fue sometido a un protocolo de preconditionamiento isquémico.

## DISCUSION

En el presente estudio, el preconditionamiento isquémico disminuyó el tamaño de infarto producto de 30 minutos de ischemia global, pero no atenuó el aumento de la rigidez miocárdica. Tal como es conocido, existió una correlación significativa entre el tamaño de infarto y la rigidez miocárdica. Esta correlación estuvo ausente en los corazones preconditionados.

El efecto del preconditionamiento isquémico sobre el tamaño de infarto es un fenómeno bien conocido y que se ha evidenciado en numerosas especies animales. (2, 9) Sin embargo, su efecto sobre la recuperación de la función ventricular posisquémica (atontamiento cardíaco) es controversial. (3,10)

La mayoría de las investigaciones que han estudiado este fenómeno protector utilizaron modelos *in vivo* (11) y con ischemia regional. En este tipo de modelos, la evaluación de los efectos del precondi-

cionamiento está limitada por variaciones en la temperatura, en los parámetros hemodinámicos, en el flujo colateral y en el tamaño del área de riesgo. En este trabajo, al utilizar un modelo de corazón aislado se eliminaron estas limitaciones. Por otro lado, en el corazón aislado la temperatura se mantiene constante, mientras que en el animal intacto con tórax abierto está, frecuentemente, por debajo de los 37°C. La importancia de la temperatura sobre el tamaño de infarto fue puesta en evidencia por Chien y colaboradores. (12) Estos investigadores demostraron que el área de infarto disminuía un 10% por cada grado de descenso en la temperatura; por ello, hay que tener cautela al comparar resultados acerca de modificaciones en el tamaño de infarto entre modelos diferentes (*in vivo* e *in vitro*).

Pocos estudios han evaluado, en forma conjunta, el efecto del preconditionamiento sobre el tamaño de infarto y sobre la función ventricular en corazones aislados de conejo. En uno de ellos, Sandhu y colaboradores (13) mostraron que el preconditionamiento limita el tamaño de infarto pero no modifica la recuperación del estado contráctil. No obstante, estos investigadores utilizaron diferentes valores de presión de perfusión coronaria, tiempo de reperfusión (60 minutos) y, además, no controlaron la frecuencia cardíaca. Estas diferencias podrían alterar la función ventricular, sesgando el estudio de los efectos del preconditionamiento.

En otro estudio, de Cave y colaboradores, (14) realizado en corazones aislados de rata, se demostró que el preconditionamiento atenúa en forma significativa las alteraciones sistólicas y diastólicas presentes luego de 20 minutos de ischemia global. La razón por la cual el preconditionamiento mejora la función ventricular en corazones de rata y no en co-

nejos podría deberse fundamentalmente a diferencias entre las especies, en particular en lo que respecta a circulación colateral, presencia de la enzima xantina oxidasa y mecanismo intrínseco del preconditionamiento. Es sabido que la rata, a diferencia del conejo o el ser humano, posee una circulación colateral más desarrollada, (15) variable que, como ya

se mencionó, modifica significativamente la evolución del daño isquémico. Además, en la rata, la activación del preconditionamiento isquémico se ha relacionado con la presencia de radicales libres, y en esta especie la enzima xantina oxidasa es una fuente importante de aporte de radicales libres. Por el contrario, en el conejo (de la misma manera que en el hombre) esta enzima está ausente. Esta podría ser otra razón que explicaría la diferencia encontrada entre estas especies en la protección brindada por el preconditionamiento. En relación con esto, estudios realizados en ratas y en perros mostraron una atenuación del atontamiento por inhibición de la formación de radicales libres. Esto se relaciona con otros trabajos (16,17) que han mostrado que el alopurinol, un potente inhibidor de la enzima xantina oxidasa, reduce el daño celular asociado con la reoxigenación del corazón hipóxico. El mecanismo específico de activación del receptor de adenosina, el cual es aceptado en el conejo, no se ha podido demostrar en la rata. De esta manera es posible que la protección del atontamiento cardíaco en la rata a través del preconditionamiento no involucre un mecanismo específico sino uno de tipo inespecífico. (14) Los datos del presente trabajo experimental sugerirían que, al menos en el conejo, el preconditionamiento isquémico no atenúa la disfunción posisquémica producto de 30 minutos de isquemia global. Sin embargo, los efectos del protocolo de preconditionamiento empleado pueden evidenciarse a través de la reducción del tamaño de infarto. Estos hallazgos están de acuerdo con los de Jenkins y colaboradores, (4) pero a diferencia de ese estudio, no se ha encontrado modificación en la función ventricular a pesar de la reducción en el área de infarto. Una posible explicación para esta persistencia de la disfunción ventricular, pese a la reducción en el tamaño de infarto, puede encontrarse en un trabajo previo, (18) el cual mostró que el preconditionamiento atenúa las alteraciones del estado contráctil 72 horas luego de la reperusión, pero esta recuperación es proporcionalmente menor en comparación con la reducción en el tamaño de infarto. Más recientemente, Cohen y colaboradores (19) describieron, en conejos crónicamente instrumentados, que el preconditionamiento disminuye el tamaño de infarto y mejora la función ventricular sistólica durante la reperusión, pero que este efecto beneficioso, sobre la función, sería significativo durante las 2 a 3 semanas posteriores a la

reperusión del miocardio isquémico. Los autores atribuyen la persistencia de la disfunción ventricular temprana a la existencia de zonas de atontamiento adyacentes al área de necrosis. A diferencia de este estudio, nosotros consideramos la función diastólica (rigidez miocárdica), pero evaluando la función ventricular global. El hecho de que no exista correlación entre el tamaño de infarto y la PDFVI en el grupo preconditionado podría sugerir que la rigidez miocárdica se mantiene elevada por la presencia de áreas de atontamiento miocárdico.

Por lo tanto, el preconditionamiento isquémico disminuyó significativamente el tamaño de infarto producto de 30 minutos de isquemia global pero no atenuó el aumento de la rigidez miocárdica, probablemente por la persistencia de áreas de atontamiento adyacentes al área de infarto.

## SUMMARY

### RELATION BETWEEN INFARCT SIZE AND MYOCARDIAL STIFFNESS: EFFECTS OF ISCHEMIC PRECONDITIONING

It has been shown that ischemic preconditioning decreases the **size** of the infarction. On the other hand, myocardial infarction increases diastolic stiffness, and this increase is proportional to the size of the infarction. Based on these findings, it could be expected that preconditioning diminishes the increase of diastolic stiffness. Therefore, the objective of the present paper was to determine if ischemic preconditioning -by decreasing the size of the infarction- is able to diminish the increase of myocardial stiffness.

Isolated, isovolumic rabbit hearts that were perfused according to Langendorff modified technique, and were studied after 30 minutes of ischemia followed by 30 minutes of reperfusion. Another group of hearts were submitted to a protocol of ischemic preconditioning, previous to the prolonged ischemia. **A** latex balloon was placed inside left ventricles and connected to a pressure transducer, allowing the register of left ventricular end diastolic pressures (myocardial stiffness). Besides, the size of the infarction was measured using 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride.

Ischemic preconditioning significantly decreased the size of the infarction caused by 30 minutes of global ischemia, but did not attenuate the increase of myocardial stiffness, probably due to the persistence of stunned areas, adjacent to the infarction area.

*Key words:* Ischemic preconditioning - Infarction - Diastolic function

## BIBLIOGRAFIA

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
2. Cave AC, Horowitz GL, Apstein CS. Can ischemic preconditioning protect against hypoxia-induced damage? Studies of contractile function in isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:1471-1486.
3. Ovize M, Przyklenk K, Hale SL y col. Preconditioning does not attenuate myocardial stunning. *Circulation* 1992; 85: 2247-2254.
4. Jenkins DP, Pugsley WB, Yellon DM. Ischaemic preconditioning in a model of global ischaemia: Infarct size limitation, but no reduction of stunning. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 1623-1632.
5. Urabe K, Miura T, Iwamoto M y col. Preconditioning attenuates myocardial stunning via adenosine receptor activation. *Circulation* 1992; 86 (Suppl I):1-24.
6. Diamond G, Forrester JS. Effect of coronary artery disease and acute myocardial infarction on left ventricular compliance in man. *Circulation* 1972; 45:11-19.
7. Paulus WJ, Grossman W, Serizawa T y col. Different effects of two types of ischemia on myocardial systolic and diastolic function. *Am J Physiol* 1985; 248: H719-728.
8. Aronow JM, McKay RG, Heller GV. Simultaneous assessment of left ventricular systolic and diastolic dysfunction during pacing induced ischemia. *Circulation* 1985; 71: 889-900.
9. Ytrehus K, Liu Y, Downey M. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266: H1145-H1152.
10. Rohman S, Scott R, Harting J y col. Ischemic preconditioning is not a function of stunned myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23 (Suppl V): S71.
11. Auchampach JA, Gross GJ. Adenosine A1 receptors, KATP channels, and ischemic preconditioning in dogs. *Am J Physiol* 1993; 264 (Pt 2): H1327-H1336.
12. Chien GL, Wolff RA, Davis RF y col. "Normothermic range" temperature affects myocardial infarct size. *Cardiovasc Res* 1994; 28: 1014-1017.
13. Sandhu R, Diaz RJ, Wilson GJ. Comparison of ischaemic preconditioning in blood perfused and buffer perfused isolated heart models. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 602-607.
14. Cave AC. Preconditioning induced protection against post-ischaemic contractile dysfunction: Characteristics and mechanisms. *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 969-979.
15. Verdouw PD, Van den Doel MA, Zeeuw S y col. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39: 121-135.
16. Akizuki S, Yoshida S, Chambers DE y col. Infarct size limitation by the xanthine oxidase inhibitor, allopurinol, in closed chest dogs with small infarcts. *Cardiovasc Res* 1985; 19: 686-692.
17. Kingma JG, Miura T, Downey J y col. Myocardial salvage with allopurinol during 24 h of permanent coronary occlusion: Importance of pretreatment. *Can J Cardiol* 1988; 4: 360-365.
18. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Smaller infarct after preconditioning does not predict extent of early functional improvement of reperfused heart. *Am J Physiol* 1999; 277: H1754-H1761.
19. Cohen MV, Yang XM, Neumann T y col. Favorable remodeling enhances recovery of regional myocardial function in the weeks after infarction in ischemically preconditioned hearts. *Circulation* 2000; 102: 579-583.