

Modelos de isquemia-reperfusión experimental. Hallazgos electrocardiográficos y morfológicos

DANIEL GRANA*, RICARDO BEIGELMAN**, RICARDO FERREIRA**, JOSE MILEI** ***

* Centro de Investigaciones Médicas ILAIMUS, Universidad del Salvador. ** CARDIOPSIS. *** Patología Experimental, Hospital Juan A. Fernández, Buenos Aires

Trabajo recibido para su publicación: 5/93. Aceptado: 7/93

Dirección para separatas: Dr. José Milei, CARDIOPSIS, Tucumán 2163, 4º "B", (1050) Buenos Aires, Argentina

Antecedentes

El fenómeno de isquemia-reperfusión se presenta con relativa frecuencia en la práctica médica; sin embargo, su fisiopatología, así como su prevención y tratamiento, sólo pueden estudiarse en modelos animales. El objetivo de este trabajo es detallar los hallazgos electrocardiográficos y morfológicos en el corazón de 40 conejos sometidos a isquemia-reperfusión.

Material y método

Se dividieron en 4 grupos: 1 (ligadura de la descendente anterior), 2 (ligadura de la circunfleja), 3 (ligadura de la circunfleja + infusión de 6,4 µg/kg/min de AD6) y 4 (ligadura de la circunfleja + infusión de solución salina). La isquemia duró 50 minutos y la reperfusión 20 minutos. En el grupo 1, en 3 casos se observó ensanchamiento del complejo QRS y en 4 arritmias durante la reperfusión, pero no hubo mortalidad experimental. Esta fue del 50% en los grupos 2 y 4. El primer grupo mostró desnivel superior del segmento ST de 3-8 mm que comenzó en la isquemia y continuó en la reperfusión. Un animal tuvo una taquicardia ventricular no sostenida y 5 malignas sostenidas y/o fibrilaciones ventriculares que causaron la muerte de estos animales (5/10). En el grupo 3 sólo se observaron elevaciones transitorias del segmento ST en 3 animales. Comparado con el grupo 4, los cambios del segmento ST presentaron diferencias significativas ($p < 0,05$). Se revirtieron fibrilaciones ventriculares en 2 conejos al aumentar el ritmo de infusión del AD6 a 10,7 µg/kg/min. También se redujeron las elevaciones del segmento ST. La mortalidad en este grupo fue de 2/10 animales. Luego del sacrificio, se inyectó el árbol coronario con diferentes colorantes, se seccionaron los ventrículos en dirección transversal y se obtuvo el área en riesgo de cada arteria ocluida: grupo 1 $33 \pm 18\%$, grupo 2 $64 \pm 15\%$, grupo 3 $64,7 \pm 6\%$ y grupo 4 $62,6 \pm 6\%$.

Resultados

En el grupo 1 se observaron numerosas áreas de necrosis focal subendocárdicas, bandas de contractura y hemorragias focales que afectaban menos del 10% del ventrículo izquierdo. En el grupo 2 se observó lo mismo, pero afectando el $68,4 \pm 8,9\%$ del ventrículo izquierdo. En el grupo 3 se vieron áreas de necrosis subendocárdicas focales o comprometiendo 2 de las 3 hileras internas de miocitos en el subendocardio y músculos papilares ($41,5 \pm 3,1\%$ del ventrículo izquierdo). En 5 animales del grupo 4 que sobrevivieron, se observaron extensas áreas de necrosis subendocárdica focal o confluyente, bandas de contractura y a veces grandes áreas de fibras onduladas que comprometían el $64,7 \pm 6\%$ del ventrículo izquierdo. En los otros 5 que murieron por fibrilación ventricular sólo se observaron áreas focales o confluentes de bandas de contractura. La microscopía electrónica mostró en las zonas necróticas burbujas subsarcolémicas, interrupción del sarcolema, grandes áreas edematosas, bandas de contractura, destrucción de miofilamentos, marginación y agrupamiento de la cromatina, escaso glucógeno, marcado edema mitocondrial con rotura de las membranas internas y externas y depósito de cuerpos densos amorfos. En las áreas isquémicas se observó pérdida de glucógeno, marginación y agrupamiento de la cromatina, edema de las bandas I, intermiofibrilar y del retículo sarcoplásmico y edema mitocondrial leve.

Conclusiones

Aunque las lesiones ultraestructurales fueron cualitativamente semejantes en los 4 grupos, el área comprometida morfológicamente fue sólo importante en la ligadura de la circunfleja (grupo 1 *versus* 2), lo que permitió evaluar la cardioprotección evidenciada por el AD6 (grupo 3 *versus* 4). La ligadura de la circunfleja constituye un modelo apto de isquemia-reperfusión en el conejo. Rev. Arg. Cardiol 1994; 62 (2): 141-150.

Palabras clave Isquemia-reperfusión - Cloricromene - Daño miocárdico - Estrés oxidativo

La reperfusión del miocardio isquémico limita o previene la necrosis; no obstante, puede provocar cambios estructurales y funcionales importantes.^{1,2} Las lesiones que se hallan en el fenómeno de isquemia-reperfusión estarían mediadas en especial por radicales libres del oxígeno y éstos estarían implicados en la génesis de las arritmias ventriculares, el miocardio atontado y/o la muerte celular.³

Dicho fenómeno, descrito originalmente por Jennings y colaboradores en el perro,⁴ se presenta con relativa frecuencia en diversas situaciones de la práctica médica, tales como la terapia trombolítica, la angioplastia transluminal percutánea, la cirugía del puente aortocoronario, los síndromes isquémicos agudos o la reperfusión espontánea luego del espasmo coronario. Con el fin de comprender la fisiopatología del mecanismo de isquemia-reperfusión, así como su prevención y tratamiento, se han utilizado varios modelos animales que aseguren su reproducibilidad y que posibiliten el desarrollo de métodos preventivos.⁵⁻¹⁰

El modelo conejo de oclusión coronaria aguda progresa con celeridad de la necrosis subendocárdica hacia el infarto transmural y es muy útil para estudiar los efectos de agentes que impidan o demoren la progresión de la isquemia miocárdica.¹¹

El cloricromene o AD6 (8-monocloro-3-β-dietilaminoetil-4-metil-7-etoxicarbonilmetoxicumarina) es un compuesto que demostró poseer efecto cardioprotector durante este fenómeno.^{9,12}

El objetivo de este trabajo es detallar los hallazgos electrocardiográficos y morfológicos en el corazón de conejos sometidos a isquemia-reperfusión debida a oclusión parcial de distintas ramas coronarias principales con tratamiento farmacológico con AD6 o sin él.

Tabla 1
Desnivel del segmento ST (en mm) luego de isquemia (50 minutos) y reperfusión (20 minutos) en el conejo

		Grupo 1	Grupo 2
Isquemia	1 minuto	0,3 ± 0,2	2,9 ± 0,4
Isquemia	5 minutos	0,5 ± 0,2	6,1 ± 1,6
Isquemia	10 minutos	1,6 ± 0,4	7,4 ± 1,6
Isquemia	20 minutos	0,9 ± 0,3	6,7 ± 2,0
Isquemia	30 minutos	1,1 ± 0,4	9,2 ± 2,1
Isquemia	40 minutos	1,2 ± 0,4	8,1 ± 1,4
Isquemia	50 minutos	1,6 ± 0,4	7,0 ± 2,5
Reperfusión	5 minutos	1,1 ± 0,5	4,9 ± 1,3
Reperfusión	15 minutos	1,2 ± 0,5	4,2 ± 0,8

MATERIAL Y METODO

Se utilizaron 40 conejos neocelandeses de 2,5-3,5 kg, alojados en jaulas individuales y alimentados con balanceado comercial y agua *ad libitum*.

Los conejos se dividieron en 4 grupos de 10 animales cada uno: grupo 1 (ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, DA), grupo 2 (ligadura de la arteria coronaria circunfleja, Cx), grupo 3 (ligadura de la Cx con infusión de AD6 y previa administración de la droga 0,25 mg/kg/día por 4 días) y grupo 4 (*idem* el 3 utilizando solución fisiológica en iguales volúmenes).

Se usó acepromazina (5 mg/kg IM) como preanestésico y luego pentobarbital sódico a una dosis inicial de 30 mg/kg EV suplementada hasta efecto cuando fue necesario. Los conejos se intubaron a través de una traqueotomía y se ventilaron con un respirador mecánico ELMEC Nº 339. Se obtuvieron registros electrocardiográficos continuos del monitor y trazados basales, a los 1, 5, 10, 20, 30, 40 y 50 minutos del período de isquemia y a los 5 y 15 minutos de reperfusión a una velocidad del papel de 50 mm/seg con un aparato Fukuda. Por medio de una toracotomía mediana se accedió al corazón. A los animales del grupo 1 se les ocluyó la DA y a los restantes la Cx, con una lazada ajustable de prolene 4-0. En los grupos 3 y 4 se infundió AD6 a una dosis de 6,4 µg/kg/minuto o solución salina de inmediato, después de efectuada la ligadura, respectivamente. Transcurridos 50 minutos de oclusión coronaria, se liberó la lazada permitiendo un período de 20 minutos de reperfusión, al cabo de los cuales se efectuó una biopsia del área en riesgo y otra

Tabla 2
Cambios en la amplitud de la onda R (en mm) después de la oclusión de la arteria coronaria circunfleja y reperfusión en los grupos 3 (Cx + AD6) y 4 (Cx + salina)

		Grupo 3	Grupo 4	p
Isquemia	1 minuto	3,4 ± 0,6	4,6 ± 1,0	NS
Isquemia	5 minutos	3,5 ± 1,2	7,5 ± 1,8	NS
Isquemia	10 minutos	2,9 ± 0,7	8,6 ± 2,4	p < 0,01
Isquemia	20 minutos	3,0 ± 0,8	7,6 ± 2,3	p < 0,05
Isquemia	30 minutos	4,5 ± 1,9	7,0 ± 2,2	NS
Isquemia	40 minutos	2,7 ± 0,7	6,5 ± 1,7	NS
Isquemia	50 minutos	3,3 ± 1,0	7,3 ± 1,9	NS
Reperfusión	5 minutos	2,1 ± 0,4	6,1 ± 1,7	p < 0,05
Reperfusión	15 minutos	1,9 ± 0,4	5,8 ± 1,8	NS

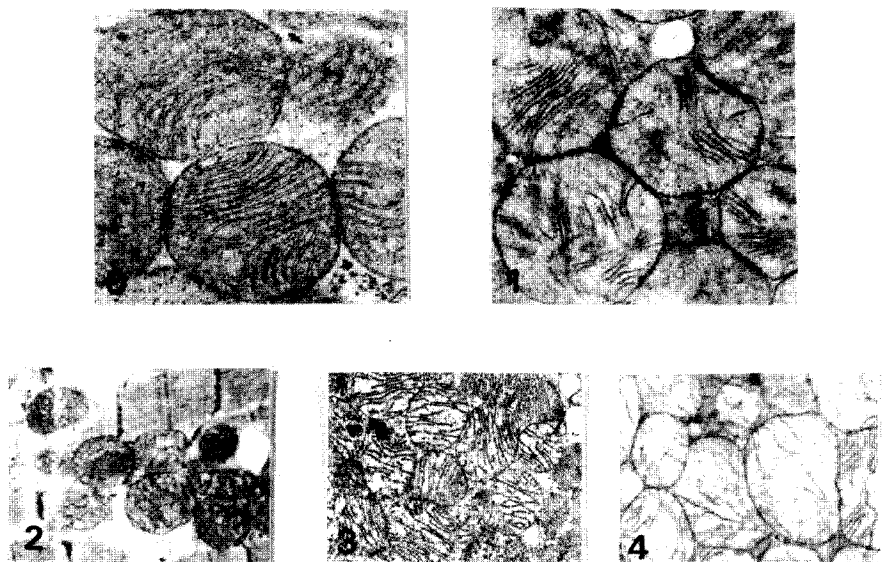


Fig. 1. Distintos grados de daño mitocondrial (escala: 0 a 4).

del área no comprometida. El cambio en la colocación del corazón y las discinesias-acinesias posligadura fueron las dos condiciones que se utilizaron para delimitar esas dos áreas a nivel macroscópico. Las biopsias se procesaron para microscopia electrónica (ME) con el fin de evaluar en forma cualitativa y cuantitativa el daño miocárdico.

Microscopia óptica

Una vez obtenidas las muestras, se extirpó el corazón, se suturaron los orificios de las biopsias y se inyectó cloruro de trifenil de tetrazolium a 37°C en la Cx o en la DA, según el grupo corres-

pondiente, con el fin de demarcar en forma precisa el tejido no perfundido distal al sitio de oclusión. Luego la arteria fue reocluida y se inyectó azul de metileno al 1% en la raíz aórtica para delinear el área perfundida. Ambos ventrículos se cortaron en sentido transversal en secciones de 2 mm de espesor y se fijaron con formaldehído tamponado al 10% a un pH de 7 por 48 horas. Se incluyeron en parafina, se cortaron con micrótopo a 6 μm de espesor y se colorearon con hematoxilina-eosina, tricómicos de Mallory y de Barbeito-López. A continuación se fotografiaron las secciones transversales y se fotocopiaron con 2x de magnifica-

Tabla 3
Incidencia, duración y tiempos de aparición y desaparición de fibrilaciones ventriculares

Grupo	Incidencia	Aparición	Duración	Reversión	Mortalidad
Grupo 3	4/10	Isquemia: 40 minutos		Irreversible	2
		Isquemia: 3 minutos		Irreversible	
		Isquemia: 3 minutos	7.800 mseg	2*	
		Isquemia: 14 minutos#	4.100 mseg		
		Isquemia: 15 minutos#	5.500 mseg		
		Isquemia: 16 minutos#	1.200 mseg		
Grupo 4	5/10	Reperfusión: 5 minutos		Irreversible	5
		Isquemia: 4 minutos		Irreversible	
		Isquemia: 1 minuto		Irreversible	
		Isquemia: 9 minutos		Irreversible	
		Isquemia: 6 minutos		Irreversible	

* Reversión de arritmias aumentando el ritmo de infusión de AD6. # El mismo conejo sufrió 3 episodios de fibrilación ventricular.

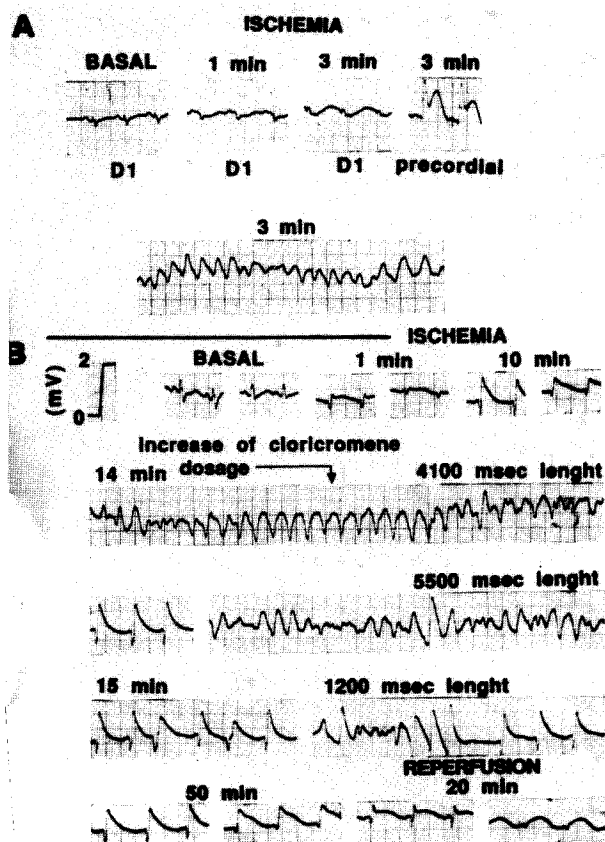


Fig. 2. A: Electrocardiograma de un conejo del grupo 4 (Cx + salina). Obsérvese la marcada lesión de la cara lateral y muerte por fibrilación ventricular a los 3 minutos de la ligadura. B: Electrocardiograma de un conejo del grupo 3 (Cx + AD6). Nótese la marcada lesión de la cara lateral. Reversión de una fibrilación ventricular de la infusión de AD6. (Tomado de: Milei J, Ferreira R, Grana D, Beigelman R, Cirillo R: Beneficial effects of cloricromene in ischemia reperfused myocardium. *Cardiology* [en prensa, 1994].)

ción. Las áreas dañadas se marcaron en rojo y las normales en azul; las primeras se expresaron como porcentaje del ventrículo izquierdo total, por el método de la pesada del papel en balanza de precisión.

Microscopia electrónica

Los tejidos se procesaron para ME de transmisión. Se fijaron con glutaraldehído al 3% frío en amortiguador de cacodilato 0,1 M (pH 7,4); luego se trataron con tetróxido de osmio al 1%, se deshidrataron e incluyeron en Epon. Se seleccionaron 3 bloques a diferentes profundidades de la biopsia y de cada uno se cortó una sección de 1 μ m, se coloreó con bórax-toluidina al 1% y se examinó por microscopia óptica para seleccionar las áreas apropiadas para cortes finos. De cada uno de los bloques se cor-

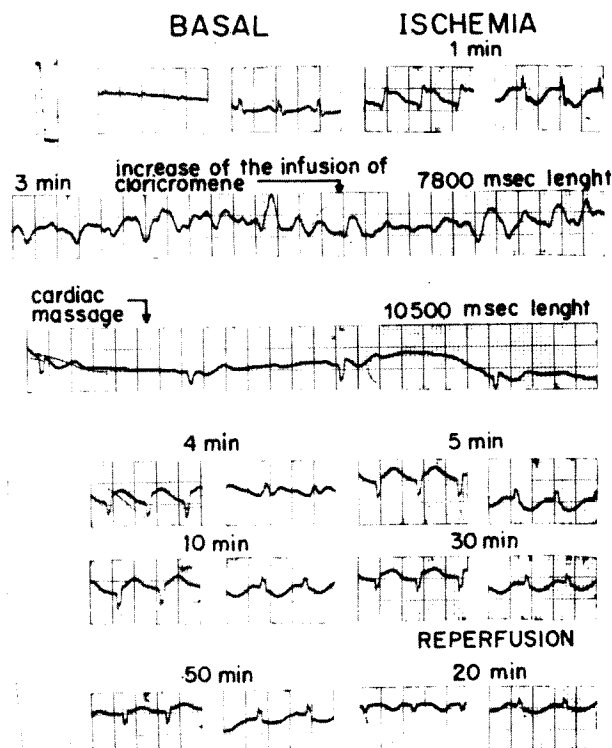


Fig. 3. Electrocardiograma de un conejo del grupo 3 (Cx + AD6). Se observa reversión de la arritmia por efecto de la droga. (Tomado de la misma fuente de la figura 2.)

taron 5 ultrafinos, se montaron en grillas de cobre y se colorearon con acetato de uranilo y citrato de plomo. Se utilizó un microscopio electrónico Jeol JEM-100 C (Japan).

Se tomaron microfotografías electrónicas sistemáticamente a 5.000x para su posterior evaluación. Las observaciones fueron hechas por dos de los autores a doble ciego. El daño miocítico se midió con una escala según Kloner y colaboradores:¹³ 0 = normal; 1 = cambios isquémicos mínimos (pérdida de glucógeno, condensación y marginación de la cromatina nuclear, bandas 1); 2 = cambios isquémicos moderados (edema intermiofibrilar y del retículo sarcoplásmico); 3 = cambios isquémicos graves (ampollas subsarcolémicas, interrupciones sarcolémicas y edema marcado); 4 = destrucción completa de la arquitectura celular y lisis nuclear (ausencia de la membrana sarcolémica y pérdida de la estructura de los sarcómeros).

La gravedad del daño mitocondrial también se midió en una escala de 0 a 4:¹³ 0 = mitocondria normal; 1 = edema temprano con separación de crestas y aclaramiento de la matriz mitocondrial; 2 = edema más marcado; 3 = edema masivo con destrucción de la arquitectura; 4 = rotura de las membranas mitocondriales interna y

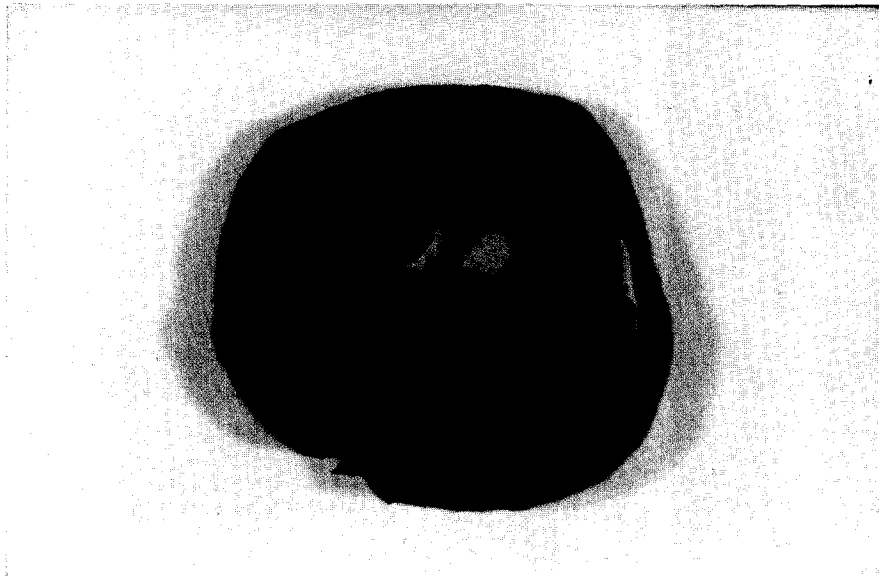


Fig. 4. Corte transversal del corazón de un conejo del grupo 1 (DA). En rojo y teñido por trifenil de tetrazolio, se observa el área de irrigación de la DA (cara anterior alta del VI), cuyo promedio fue de $22 \pm 18\%$.

externa (fig. 1). Se cuantificaron 200 mitocondrias por muestra para obtener el daño mitocondrial promedio.

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como media \pm ES. Las comparaciones entre grupos se efectuaron por análisis de varianza. Los valores que presentaron una probabilidad menor de 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS

Hallazgos electrocardiográficos

Ligadura de la DA *versus* de la Cx (grupo 1

versus 2). En el grupo 1 (DA) se observó ensanchamiento del complejo QRS en 3 casos. Cuatro animales tuvieron arritmias durante la reperfusión pero no hubo muertes inducidas por la isquemia o la reperfusión (tabla 1).

En cambio la mortalidad experimental inducida por isquemia o reperfusión fue del 50% en el grupo 2 (Cx). Este mostró un desplazamiento del segmento ST de 3-8 mm de elevación en las derivaciones correspondientes a la pared anterolateral (tabla 1). Estos cambios, que comenzaron durante la isquemia, continuaron en la reperfusión. En un animal se observó un marcado ensanchamiento del complejo QRS. Seis presentaron arritmias isquémicas graves y sólo

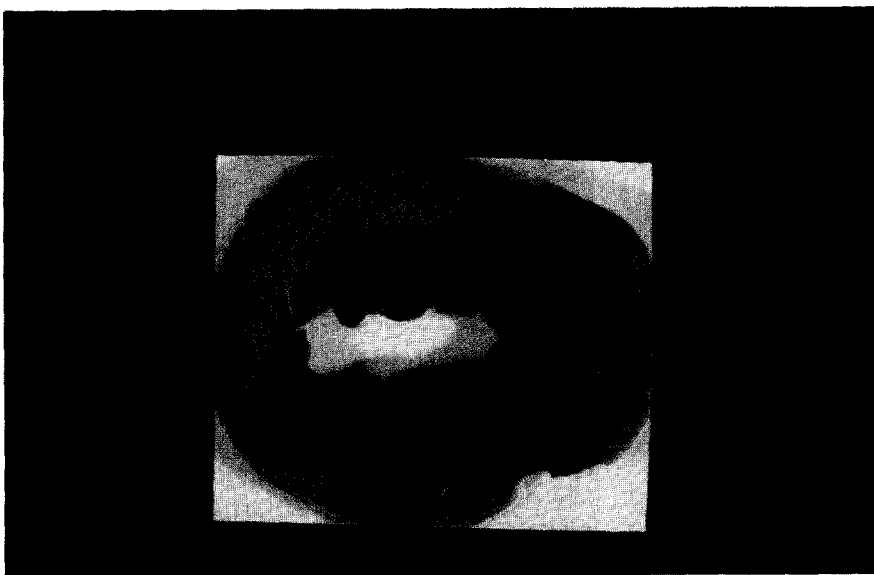


Fig. 5. Corte transversal del corazón en un conejo del grupo 2 (Cx). En rojo y teñido por trifenil de tetrazolio, se visualiza el área de irrigación de la Cx (cara anterior, septal anterior y lateral del VI). Promedio del $63 \pm 6\%$.

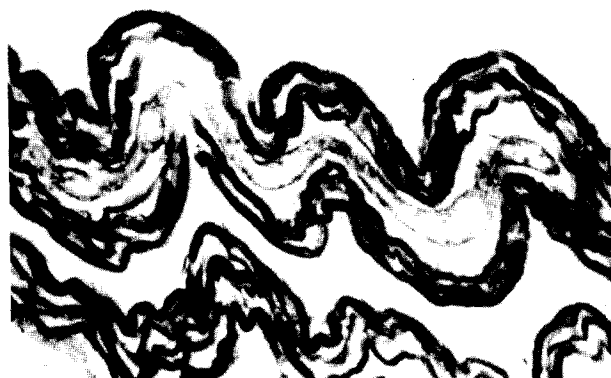


Fig. 6. Fibras onduladas en un animal del grupo 4 (Cx + salina) como resultado de discinesia-acinesia grave del área necrótica isquémica. Imposibilidad de las fibras para contraerse en forma adecuada luego de la relajación por graves disturbios energéticos. Obsérvese la marcada dilatación capilar. (200x, tricrómico de Mallory.)

uno tuvo una taquicardia ventricular no sostenida. Los 5 restantes fueron taquicardias ventriculares malignas sostenidas y/o fibrilaciones ventriculares que les causaron la muerte.

Ligadura de la Cx en conejos tratados y no tratados (grupo 3 versus grupo 4). En el grupo 3 (Cx + tratamiento con AD6) se observaron elevaciones transitorias del segmento ST en 3 animales; en los restantes, hubo pequeñas elevaciones del segmento ST. Comparado con el grupo 4 (Cx + infusión de solución salina), los cambios del segmento ST presentaron diferencias significativas durante todo el período de isquemia y reperfusión ($p < 0,05$). También se pudo observar una reducción significativa de la amplitud de la onda R y el concomitante desarrollo de ondas Q patológicas en el grupo 3 comparado con el 4 (tabla 2).

Se revirtieron fibrilaciones ventriculares en 2 conejos del grupo 3 al aumentar el ritmo de infusión de AD6 de 6,4 a 10,7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ (figs. 2 y 3, tabla 3). También se redujeron las elevaciones del segmento ST. La mortalidad en este grupo fue de 2/10 animales. En cambio, en el 4 la mortalidad fue de 5/10 por arritmias malignas.

En ninguno de los grupos se registraron cambios significativos en el PR o en la frecuencia cardíaca. En el gráfico 1 se pueden observar las diferencias entre los grupos 3 y 4 en el desnivel del segmento ST, siendo ésta la variable que mostró cambios más notables ($p < 0,01$ y $p < 0,05$).

En los grupos 2 y 4 se observaron evidentes

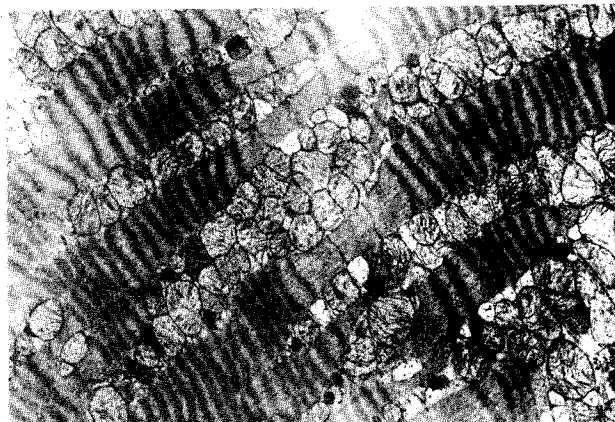


Fig. 7. Hipercontracción de miofilamentos, con formación de bandas de contractura. Obsérvese el edema mitocondrial importante con alteración evidente o desaparición de las membranas internas y externas de las mitocondrias. (5.000x.)

alteraciones de la contractilidad, de modo tal que las cinesias-discinesias de las paredes anterior y lateral semejaban aneurismas.

Microscopía óptica

Las caras anteriores altas en el caso de la ligadura de la DA (fig. 4) y las anteriores y laterales y parte de las posteriores en la ligadura de la Cx (fig. 5) mostraron numerosas áreas de necrosis focal subendocárdica, que iban desde alteraciones citoplasmáticas en una sola fibra con cambios nucleares mínimos hasta la homogeneización completa del citoplasma con cariólisis progresiva. También se observaron con frecuencia bandas de contracción y hemorragias focales. Este cuadro se evidencia en todos los grupos, pero fue mucho más grave en la ligadura de la Cx (grupos 2 y 4). En efecto, la valoración por microscopía óptica del porcentaje del ventrículo izquierdo con necrosis fue de $< 10\%$ en el grupo 1 (DA) y del $68,4 \pm 8,9\%$ en el 2, en los animales que completaron los 20 minutos de reperfusión.

Tabla 4
Porcentajes de daño mitocondrial (de 0-4, véase el texto)

Grupo	0	1	2	3	3	3+4	Nº de mitocondrias estudiadas
Grupo 1	5	6	12	33	44	77*	1.903
Grupo 2	0	1	2	39	58	97*	2.014

* $p > 0,05$

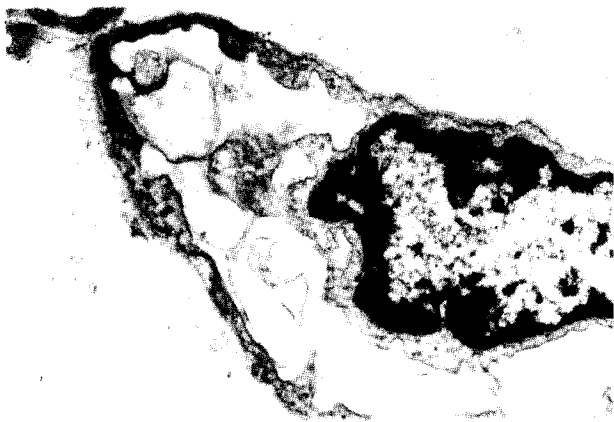


Fig. 8. Ligadura de la Cx. Se nota una evidente marginación nuclear en una célula endotelial de un capilar miocárdico. Obsérvese además la obstrucción luminal por protrusiones citoplasmáticas en un área con necrosis isquémica miocárdica. (10.000x.)

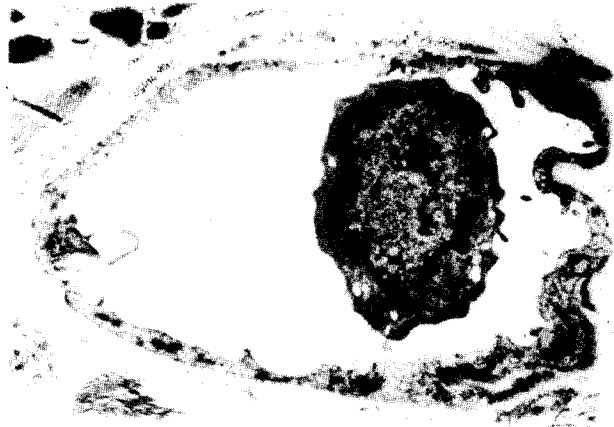


Fig. 9. Ligadura de la Cx. Protección con AD6. Se observa escasa formación de protrusiones del citoplasma endotelial en un capilar miocárdico de una zona con necrosis isquémica. (10.000x.)

En el grupo 3 se evidenciaron áreas de necrosis subendocárdica focales o compromiso de 2 de las 3 hileras internas de miocitos en el sub-endocardio y en los músculos papilares, siendo el porcentaje del ventrículo izquierdo con daño miocárdico del $41,5 \pm 3,1\%$. En el grupo 4, en los 5 animales que sobrevivieron se observaron extensas áreas de necrosis subendocárdica, focales o confluentes, bandas de contracción y en ocasiones amplias áreas de fibras onduladas que comprometían el $64,7 \pm 6\%$ del ventrículo izquierdo (fig. 6). En los 5 animales muertos por fibrilación ventricular sólo se observaron áreas focales o confluentes de bandas de contracción.

Microscopia electrónica

Las áreas en riesgo, tanto en la ligadura de la

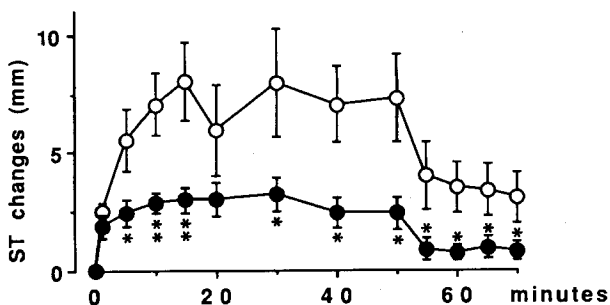


Gráfico 1. Cambios del segmento ST en los grupos 3 (círculos llenos) y 4 (círculos vacíos). * $p < 0,05$. ** $p < 0,01$. (Tomado de: Milei J, Ferreira R, Grana D, Beigelman R, Cirillo R: Beneficial effects of cloricromene in ischemia reperfused myocardium. *Cardiology* [en prensa, 1994].)

DA como en la de la Cx, mostraron ampollas subsarcolémicas, interrupción del sarcolema, amplias áreas de edema y necrosis, bandas de contracción asociadas con destrucción de miofilamentos, agrupamiento y marginación de la cromatina nuclear y escaso glucógeno; las mitocondrias se veían muy edematosas, con disrupción de las crestas, incluyendo rotura de las membranas externa e interna, y con depósitos de cuerpos densos amorfos (fig. 7). En los grupos 1 (DA) y 2 (Cx) se cuantificó el daño mitocondrial en zonas necróticas, mostrando mayor compromiso en el último grupo ($p < 0,05$) (tabla 4).



Fig. 10. Banda de contractura evidente (flecha). Se visualiza hipercontracción del resto de los sarcómeros, edema citosólico, dilatación del retículo sarcoplásmico, y fragmentación de miofilamentos (entre flechas). Las mitocondrias están bastante conservadas. (5.000x.)

Los capilares mostraban alteraciones marcadas de los núcleos de las células endoteliales, con deformación y marginación del material nuclear, así como evidentes protrusiones del citoplasma endotelial que llegaban a obstruir casi toda la luz capilar (fig. 8). Como hallazgo notable en el grupo 3 (tratado con AD6), las protrusiones citoplasmáticas fueron notablemente menores (fig. 9).

En las zonas isquémicas se observó pérdida de glucógeno, marginación y agrupamiento de la cromatina, edema de las bandas I, edema intermiofibrilar, del retículo sarcoplásmico y mitocondrial leve (fig. 10).

En todos los grupos se evidenciaron signos de daño miocítico irreversible e infarto, pero el área comprometida morfológicamente fue importante sólo en la ligadura de la Cx (grupo 1 *versus* 2), lo que permitió la evaluación farmacológica de protección miocárdica (grupo 3 *versus* 4).

Necropsias

Los lechos de las distintas arterias coronarias se pudieron medir por planimetría: el correspondiente a la CD fue de $15 \pm 9\%$; el de la Cx, de $63 \pm 6\%$ (fig. 5) y el área correspondiente a la DA, de $22 \pm 18\%$ (fig. 4), lo que evidenció que el lecho irrigado por la Cx es mucho mayor.

DISCUSION

Este trabajo demostró que el conejo como modelo de isquemia-reperfusión (50 y 20 minutos) fue más útil, y reproducible, ya sea ocluyendo la DA como la Cx. Sin embargo, esta última generó alteraciones mucho más importantes que se expresaron en trastornos electrocardiográficos marcados: supradesnivel del segmento ST de 3-8 mm en las derivaciones correspondientes al territorio de la Cx, taquicardias ventriculares malignas sostenidas y fibrilación ventricular, con una mortalidad del 50% en los grupos 2 y 4 (oclusión de la Cx). Estas alteraciones electrocardiográficas se correlacionaron con la morfología, ya que si bien los cortes seriados evidenciaron lesiones ópticas y ultraestructurales similares en su morfología, la zona necrótica fue mucho más extensa.

En el grupo 3 (Cx + AD6), los cambios del segmento ST y la incidencia de arritmias fueron significativamente menores a los del grupo 4 (Cx + salina). La mortalidad fue del 20% y el porcentaje de área en riesgo fue mucho menor.

El flujo colateral en el sistema coronario es el factor más importante en la determinación del grado y la extensión de la muerte celular en un

área isquémica.^{2,14} El corazón del conejo no presenta flujo coronario colateral, al igual que el hurón, el babón y el cerdo, mientras que por otro lado, animales como el perro, el gato y la rata disponen de un circuito colateral aceptable.¹⁴

Por lo tanto, encontramos que es primordial realizar una elección cuidadosa del modelo experimental teniendo en consideración que no sólo son importantes las diferencias entre especies en lo que atañe a circulación colateral, sino que también la extensión de los territorios anatómicos irrigados por una arteria coronaria son diferentes.

En el caso del conejo, la arteria coronaria izquierda se divide casi de inmediato en DA y Cx. La primera es menor y da una gran rama septal para irrigar el tabique interventricular. Continúa por el surco interventricular dividiéndose en dos ramas que terminan en la unión del tercio medio con el inferior de la superficie cardíaca anterior.

La Cx da grandes ramas para irrigar la pared anterolateral del ventrículo izquierdo, que llegan hasta el ápex. Asimismo, da ramas para la pared posterior del ventrículo izquierdo, aurícula izquierda, tabique posterior y músculos papilares. Por su parte, el aporte circulatorio que brinda la arteria coronaria derecha al ventrículo izquierdo es despreciable.¹⁵ Resumiendo, podemos decir que en el conejo, la DA irriga sólo la porción anterior del tabique interventricular alto y zonas del ventrículo derecho y del ventrículo izquierdo adyacentes, mientras que la Cx tiene a su cargo el aporte sanguíneo del resto del ventrículo izquierdo.

En este modelo experimental, al interrumpir en forma transitoria la circulación de una arteria coronaria pusimos en evidencia el mecanismo de isquemia-reperfusión, en el cual la restauración del flujo sanguíneo acentúa el daño celular. Este fenómeno, conocido como la paradoja del oxígeno, parece estar causado en parte por la toxicidad de los radicales libres del oxígeno.¹⁶⁻²¹

Cualquiera fuera el mecanismo (trombosis, espasmo persistente, isquemia quirúrgica o procedimientos de angioplastia), la supresión del aporte sanguíneo desencadena una serie de alteraciones que pueden sintetizarse en: pasaje a un metabolismo anaerobio glicolítico con baja producción de ATP; caída progresiva del ATP, ADP y AMP con descenso del pH; inhibición de procesos enzimáticos ATP-dependientes con alteraciones en el metabolismo iónico (ingreso descontrolado del Na⁺ y salida del Ca⁺⁺) con producción de edema celular. En la perfusión,

se considera que el daño subsiguiente es causado en particular por el ingreso irrestricto de Ca^{++} y por una generación explosiva de radicales libres del oxígeno.¹¹

El tamaño de un infarto aumenta de manera notable desde los 40 minutos a las 3 horas. Sometiendo a los corazones de conejos a un período de 70 minutos de isquemia-reperfusión se pudo remarcar, gracias a la ME, el área subendocárdica, que como se sabe es la zona más vulnerable. Teniendo en cuenta que la técnica del trifenil de tetrazolium puede subestimar la extensión del daño miocárdico,²² el análisis ultraestructural se considera el método más sensible. Esto también ocurrió en nuestro trabajo, aunque la necrosis debida a ligadura de la Cx fue tan extensa y evidente que la cuantificación mediante microscopía óptica del porcentaje de VI involucrado marcó diferencias muy significativas.

En nuestra experiencia, el corazón de conejo resultó un modelo adecuado para estudiar el mecanismo de isquemia-reperfusión, ajustándose a las características anatómicas mencionadas.

El cloricromene, que es un derivado cumárico sin poder anticoagulante,²³ redujo en esta experiencia la incidencia de arritmias graves, el área de necrosis y la mortalidad, al igual que en otros diseños experimentales.^{9,12} Su mecanismo de acción incluiría una reducción en la producción de radicales libres del oxígeno.¹² La droga reduce *in vitro* la producción de anión superóxido de leucocitos activados;²⁴ además inhibe la adhesión de neutrófilos a células endoteliales y la quimiotaxis de los polimorfonucleares y monocitos.²⁴ También disminuye la formación de prostaglandinas y leucotrienes de leucocitos,²⁵ inhibe la agregación plaquetaria, dilata las coronarias,²⁶ podría tener un efecto protector directo sobre los miocitos, así como una acción antiarrítmica.²⁷

Trabajos futuros permitirán consolidar estas conclusiones y establecer el mecanismo de acción de este fármaco.

SUMMARY

ISCHEMIA-REPERFUSION EXPERIMENTAL MODELS ELECTROCARDIOGRAPHIC AND MORPHOLOGIC FINDINGS

Background and objectives

Varios experimental studies on prevention and treatment of myocardial damage due to ischemia-reperfusion phenomena as well as the pathogenic mechanisms involved have been published. The aim of this study is to describe the electrocardiographic and morphologic

findings in rabbit hearts submitted to experimental ischemia and reperfusion.

Methods

Forty rabbits were divided into 4 groups: group 1: occlusion of the left anterior descending artery; group 2: occlusion of the left circumflex artery; group 3: occlusion of circumflex artery + infusion of AD6, 6.4 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$, and group 4: occlusion of circumflex artery + saline infusion. Each group consisted of 10 New Zealand rabbits. After 50 minutes of occlusion, the artery was reopened for 20 minutes. Then, biopsy specimens of the myocardium at risk and of the perfused tissue were obtained. Electrocardiograms were recorded throughout the experiment. In 3 animals of group 1, a marked widening of the QRS complex was observed whilst arrhythmia during reperfusion occurred in 4. No animals in this group died. The electrocardiograms of rabbits in group 2 showed ST-segment shifting, most frequently a 3-8 mm elevation, during ischemia and reperfusion. One animal presented a non-sustained ventricular tachycardia and 5 died due to malignant sustained ventricular tachycardia and/or ventricular fibrillation. In group 3 only transient ST-segment elevation was observed in 3 animals. There were significant differences between group 3 and 4 regarding ST-segment changes during ischemia and reperfusion ($p < 0.05$). In group 3, reversal of ventricular fibrillation was observed in 2 rabbits after increasing the infusion rate of AD6 to 10.7 $\mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$; ST-segment elevation also retrograded. Two animals in this group and 5 in group 4 died. After sacrifice, the coronary arteries were injected with either triphenyltetrazolium or methylene blue to determine the area at risk, which corresponded to $33 \pm 18\%$ of the tissue in group 1, to $64 \pm 15\%$ in group 2, to $64.7 \pm 6\%$ in group 3 and to $62.6 \pm 6\%$ in group 4.

Results

Wide areas of focal subendocardial necrosis, contraction bands and focal hemorrhage, affecting less than 10% and $68.4 \pm 8.9\%$ of the left ventricle, were observed in group 1 and group 2, respectively. In group 3, $41.5 \pm 3.1\%$ of the left ventricle was damaged (subendocardial necrosis). In the 5 surviving rabbits of group 4 large areas of wavy fibers which involved $64.7 \pm 6\%$ of the left ventricle, were detected. The 5 animals that died earlier due to ventricular fibrillation only showed focal or confluent areas of contraction bands. Ultrastructurally, subsarcolemmal bubbles, sarcolemal disruption, wide edematous areas, contraction bands, scarce glycogen deposits, marked mitochontrial edema with disruption of the internal and external membranes, and dense deposits were observed in the necrotic tissue. In the ischemic areas, loss of glycogen, chromatin condensa-

tion, intermyofibrillar edema and of the sarcoplasmic reticulum were found.

Conclusions

The ultrastructurally observed lesions were similar all 4 groups, but the area involved was appeared to be important only when the circumflex artery was occluded (group 1 versus group 2). This experimental model allowed the evaluation of the cardioprotective effect of AD6 (group 3 versus group 4). The occlusion of the circumflex artery in the rabbit seems to be an adequate experimental model for ischemia and reperfusion.

BIBLIOGRAFIA

1. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987; 30: 23-44.
2. Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium. Effects of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983; 68 (Suppl): 125-136.
3. Bolli R. Oxygen-derived free radicals and myocardial reperfusion injury: An overview. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 249-268.
4. Jennings RB, Sommers HM, Symth GA, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70: 82-93.
5. Ferreira R, Burgos M, Llesuy S, Milei J. Reduction of reperfusion injury with mannitol cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1989; 48: 77-84.
6. Milei J, Ferreira R. Fisiopatologia del mecanismo ischemia riperfusione: nuovi concetti nel trattamento delle lesioni da riperfusione. *La Presse Medicale (ed ital)* 1992; Suppl 1: 3-9.
7. Milei J, Ferreira R, Llesuy S, Foracod P, Covarrubias J. Reduction of reperfusion injury with preoperative rapid intravenous infusion of taurine during myocardial revascularization. *Am Heart J* 1992; 123: 339-343.
8. Milei J, Llesuy S, Boveris A. Amelioration of adriamycin-induced cardiotoxicity in rabbits by prenylamine and vitamins A and E. *Am Heart J* 1985; 111: 95-102.
9. Milei J, Llesuy S, Ferreira R, Grana D, Prosdocimi M, Boveris A. Reduction of myocardial damage by cloricromene during ischemia-reperfusion in the rabbit. *Cardioscience* 1991; 3: 97-106.
10. Runge MS, Haber E. Importance of experimental models in study of thrombosis and thrombolysis. *Circulation* 1991; 83 (Suppl): IV1-IV2.
11. Laird JD, Vellekoop HP. Time course of passive elasticity of myocardial tissue following experimental infarctation in myocardial tissue following experimental infarction in rabbits and its relation to mechanical dysfunction. *Circ Res*
12. Milei J, Ferreira R, Grana D, Cirillo R, Llesuy S, Prosdocimi M. Effects of cloricromene on ischemia-reperfusion myocardial damage in the rabbit. *Cardiology* 1992; 81: 89-99.
13. Kloner RA, Fishbein MC, Braunwald E, Maroko PR. Effect of propranolol on mitochondrial morphology during acute myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1978; 41: 881-886.
14. Maxwell MP, Hearse DJ, Vellon DM. Species variation in the coronary collateral circulation during regional myocardial ischaemia: a critical determinant of the rate of evolution and extent of myocardial infarction. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 737-746.
15. Flores NA, Davies RL, Peny WJ, Sheridan DJ. Coronary microangiography in the guinea pig, rabbit and ferret. *Int J Cardiol* 1984; 6: 459-471.
16. Hearse DG, Humprey SM, Chain EB. Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused heart. A study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol* 1973; 5: 395.
17. Hearse DG, Humrey SM, Navier WG, Slade A, Border D. Ultrastructural damage associated with oxygenation of the anoxic myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1975; 7: 315.
18. Guarneri C, Flamigni F, Caldarrera GM. Role of oxygen in the cellular damage induced by reoxygenation of hypoxic heart. *J Mol Cell Cardiol* 1980; 12: 797.
19. Hess ML, Mann MH. Molecular oxygen: friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1984; 16: 969.
20. Opie LH. Cardiac metabolism. Emergence, decline and resurgence. Part II. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 817-830.
21. Ferreira R, Llesuy S, Milei J, Scordo D, Hourquebie H, Molteni L et al. Assessment of myocardial oxidative stress in patients after myocardial revascularization. *Am Heart J* 1986; 111: 95-102.
22. Miller DD, Gill JP, Livni E, Elmaleh DR, Aretz T, Boucher CA et al. Fatty acid analogue accumulation: a marker of myocyte viability in ischemic-reperfused myocardium. *Circ Res* 1988; 63: 681-692.
23. Aporti F, Finesso M, Granata L. Effect of AD6 on the coronary circulation in the dog. *Pharmacol Res Commun* 1978; 10: 469-477.
24. Bertocchi F, Breviaro F, Proserpio P, Ming Wang J, Chezzi P, Travagli RA et al. In vitro inhibition of human polymorphonuclear cell function by cloricromene. *Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1989; 339: 697-703.
25. Gresele G, Ribaldi E, Mezzasoma AM, Quero E, Stasi M, Prosdocimi M et al. Cloricromene inhibits leukotriene formation by human polymorphonuclear leukocytes by suppressing arachinodate release from membrane phospholipids. *Biochem Pharmacol (en prensa)*, 1993.
26. Prosdocimi M, Finesso M, Tesari F, Gorio A, Languino LR, De Gaetano G et al. Inhibition by AD6 of platelet aggregation in dog stenosed coronary artery. *Thromb Res* 1985; 39: 399-409.
27. Bertolino M, Prosdocimi M, Aporti F, Finesso M, Gorio A. The action of AD6 on experimental arrhythmias and on potentials of cardiac fibers. *Arch Pharmacodynamic Ther* 1986; 281: 66-78.