

Acción de un bloqueante cálcico sobre la extensión y reversibilidad del daño miocárdico en un modelo de infarto experimental en cerdos

CARLOS B. ALVAREZ*
GUILLERMO PUJADAS
MIGUEL CACERES
VICTOR PICONE
DAVID CELENER
MAURICIO RAPPAPORT
JOSE R. MARTIN

Instituto de Cardiología,
Hospital Español de Buenos Aires.

* Para optar a Miembro Titular.

El propósito de este trabajo es evaluar la acción cardioprotectora de la nifedipina (N) en el infarto agudo. A seis cerdos se les administró N sublingual (3 mg/kg) 20 minutos antes de la isquemia provocada por la ligadura de la arteria descendente anterior durante 90 minutos (I), dosis que se repitió 20 minutos antes de la reperfusión (R) (liberación de la ligadura). Otros seis animales constituyeron el grupo control (C). La extensión del daño miocárdico se evaluó mediante la determinación de las sumatorias de ST (Σ ST) y de las ondas R (Σ R) y Q (Σ Q) en mapeos electrocardiográficos epicárdicos, así como de los niveles séricos de TGO y LDH. Se controló también la presión sistémica (PA), pulmonar (PP), de aurícula derecha (AD), resistencia sistémica (RS) y el volumen minuto (VM). Después de 210 minutos de R se sacrificó el animal para efectuar estudios morfológicos e histoquímicos. La PA, PP y RS fueron significativamente menores en los animales que recibieron (N). El VM tendió a ser menor en N, excepto post-reperfusión, que mostró una brusca caída en el C. La Σ R cayó menos durante I y se recuperó más (R) en el grupo N. La Σ Q fue al final de la experiencia significativamente mayor en el C. Las concentraciones de TGO y LDH fueron significativamente mayores en los controles durante (R). La histoquímica mostró una mayor actividad de la SDH y LDH en los animales tratados. Se concluye que en este modelo experimental la N disminuyó la postcarga y por ésta, y/o por acción miocárdica directa, limitó la magnitud de la necrosis y aumentó la cantidad de miocardio recuperable.

Es conocido el efecto cardioprotector de la nifedipina (1,4-dihidropiridina) sobre la extensión y reversibilidad durante la isquemia y reperfusión del infarto de miocardio experimental en el perro.^{1,2,3} Sin embargo, la circulación coronaria de este animal es diferente de la del ser humano, porque la circulación colateral es más desarrollada, lo que dificulta la extrapolación de los resultados experimentales agudos al ser humano.⁴ El objeto de este trabajo fue el de investigar si este efecto cardioprotector podía también demostrarse en el cerdo, cuya circulación coronaria es semejante a la del hombre (Fig. 1).

MATERIAL Y METODOS

Se estudiaron 12 animales, en 6 sesiones en las que se trabajó simultáneamente con 2 animales; uno recibió 3 mg/kg de nifedipina



Fig. 1. Arteriografía coronaria de un corazón de cerdo normal.

por vía sublingual 20 minutos antes de la isquemia, repitiéndose la misma dosis 20 minutos antes de la reperfusión.

El otro animal recibió un placebo, no conociendo los investigadores ni el anatomopatólogo a qué grupo correspondía cada animal hasta después que informaron los resultados. El peso de los animales osciló entre 14 y 25 kilogramos; eran de raza doméstica, de buen aspecto general, con una temperatura esofágica entre 36,7°C y 38,1°C, medida con un termómetro YSI 400 (Yellow Springs Instruments) con deposiciones y orina de aspecto normal y con un electrocardiograma de base similar al normal del ser humano.

Todos los animales que cumplían estos requisitos se mantuvieron en ayunas 18 horas antes de la intervención.

Previa premedicación con ketamida intra-

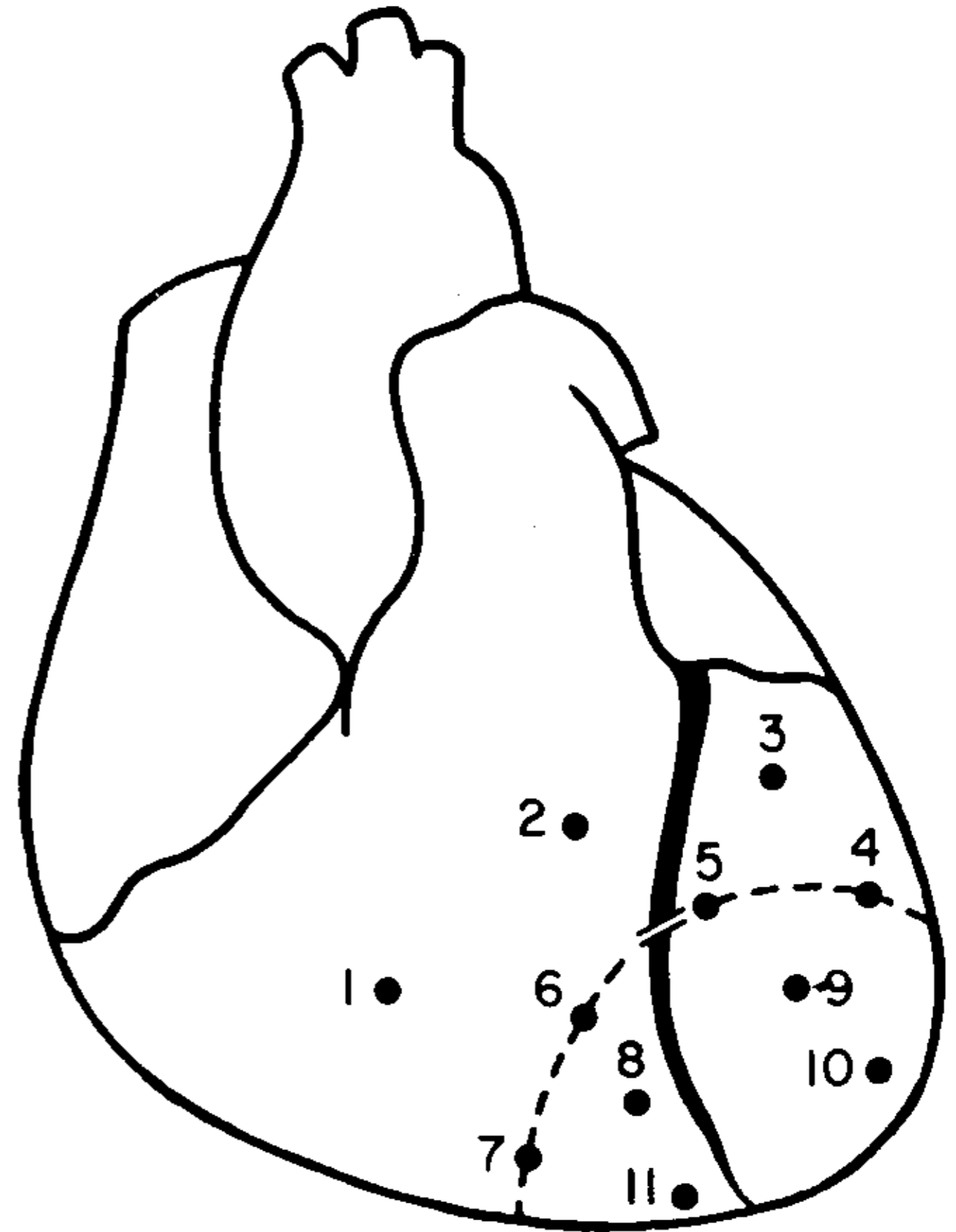


Fig. 2. Zonas donde se efectuó el mapeo epicárdico.

muscular 15 mg/kg y anestesia general con pentotal sódico 10 mg/kg y bromuro de pancuronio 0,1 mg/kg se efectuó intubación traqueal conectando el animal a un respirador volumétrico, repitiendo el relajante muscular según necesidad. Se colocaron catéteres de dacrón 8F en carótida, de polystán 7F en aurícula derecha, y un Swan-Ganz, Flow directed thermodilution 93A 131 7F en arteria pulmonar. Posteriormente se procedió a efectuar una toracotomía mediante esternotomía, con riguroso cuidado de la hemostasia.

En esta situación se procedió a tomar los controles basales, que se dividieron en:

1. *Hemodinámicos*: Frecuencia cardíaca, presión sistémica y pulmonar sistólica, diastólica y media, presión media de la aurícula derecha, volumen minuto, volumen sistólico y débito cardíaco. Los parámetros de flujo se expresaron como ml/kg de peso. Estos controles se efectuaron mediante un monitor Statis TM Becton-Dickinson modelo ST-469 con computadora de volumen minuto por termodilución CO₁, preamplificador de ECG modelo HR-4, módulos de presión digital PR-18, PR-8 y un inscriptor de dos canales modelo WR-22A.

2. *Electrocardiográficos*: Se realizó mapeo epicárdico directo de 11 puntos que compren-

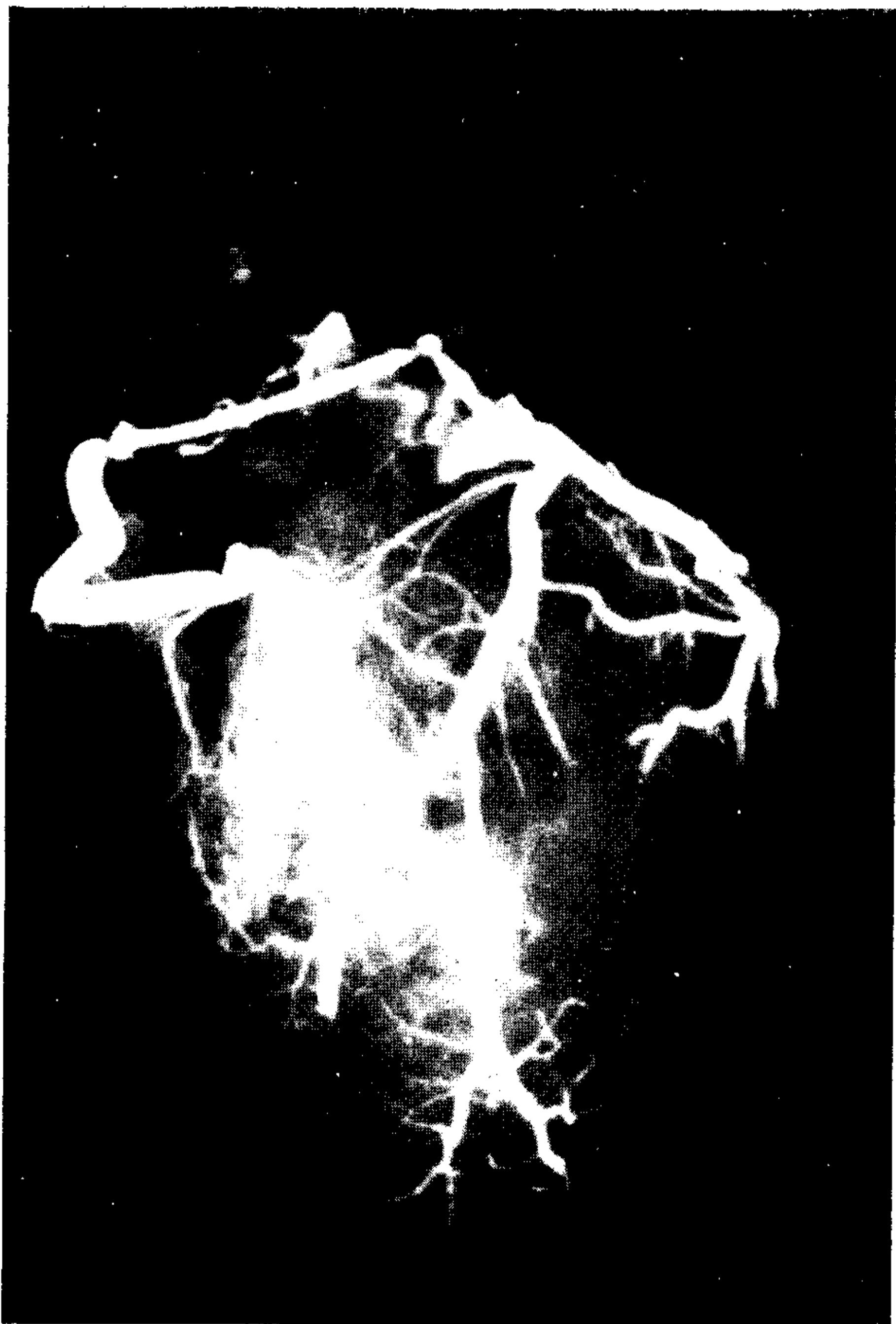


Fig. 3. Arteriografía coronaria de un corazón de cerdo con oclusión de la arteria descendente anterior en el tercio distal.

dió zonas presumiblemente sanas,^{1,2,3} isquémicas^{4,5,6,7} y necróticas^{8,9,10,11} del miocardio, mediante una derivación unipolar con un electrodo de plata y en un electrocardiograma convencional. Estas zonas fueron marcadas con un colorante inocuo a fin de reducir posibles variantes en la colocación del electrodo a lo largo de la experiencia (Fig. 2).

3. *Enzimáticos*: Se determinaron los niveles plasmáticos de transaminasa-glutámico-oxalacética y láctico-dehidrogenasa, de muestras obtenidas de la aurícula derecha por el método cinético.^{5,6} Posteriormente a la toma de los controles basales se administró la droga o el placebo, mientras se disecaba la arteria descendente anterior entre su tercio medio e inferior, procediéndose a su ligadura con nylon monofilamento 5/0 con cobertura de dacrón (Fig. 3).



Fig. 4. Infarto agudo mostrando las zonas donde se obtuvieron las muestras para histoquímica.

Durante el tiempo de isquemia se efectuaron los controles mencionados a los 4, 15, 25, 45, 60 y 90 minutos, al cabo de lo cual se procedió a la liberación de la ligadura, comenzando el tiempo de reperfusión, efectuándose los controles a los 4, 15, 30, 60, 90, 150 y 210 minutos.

Al término de la experiencia se sacrificaron los animales, obteniéndose muestras de tejido miocárdico de la zona del infarto, de la zona presumiblemente sana en la cara lateral, de la zona intermedia y del hígado, con el objeto de efectuar su estudio microscópico e histoquímico (Fig. 4).

La actividad de las enzimas succínico-dehidrogenasa y láctico-dehidrogenasa fue evaluada de 0 a ++ de la siguiente manera: 0: ausencia; ±: débil; +: moderada; ++: elevada.^{7,8,9}

RESULTADOS

Hemodinámicos

No se observaron diferencias estadísticamente significativas durante toda la experiencia entre el grupo placebo y droga respecto de la frecuencia cardíaca. La presión arterial media cayó en ambos grupos luego de la ligadura, pero mientras que en el placebo de $125 \pm 12,6$ mmHg descendió a $104,3 \pm 16$, con nifedipina, de $124,8 \pm 14,7$ descendió a $76,3 \pm 6,2$ a los cuatro minutos. Así se mantuvo prácticamente durante toda la

experiencia y, excepto una ligera elevación post-reperfusion, la disminucion de este parametro en los animales que recibieron la droga fue altamente significativa (Fig. 5).

La resistencia sistémica mostró un comportamiento similar, pero fue más evidente la elevación de ella post-reperfusion en el grupo placebo, en el que, de $31,9 \pm 8,3$ UR, se elevó a $36,2 \pm 11,3$, mientras que en el grupo droga, de $20,6 \pm 2,7$ UR antes de soltar la ligadura, descendió a $19,05 \pm 2,8$ cuatro minutos después (Fig. 6). Esto no hizo más que confirmar el conocido efecto de la nifedipina sobre la postcarga.

La presión pulmonar media también fue menor en el grupo de animales que recibieron droga y se observó una mayor elevación de ésta post-reperfusion en el grupo placebo, en el que, de $20,6 \pm 1,3$ mmHg, se elevó a $26 \pm 3,5$ a los cuatro minutos, mientras que de $17,4 \pm 0,7$ mmHg sólo ascendió a $18,6 \pm 1,2$ con nifedipina (Fig. 7).

En cuanto al volumen minuto, tendió a ser algo menor en el grupo nifedipina, aunque esta diferencia sólo alcanzó el límite de lo significativo al final del período de isquemia. Pero una vez soltada la ligadura se inició un descenso en los animales con placebo, que coincidió con la elevación observada de la presión arterial y pulmonar media, como así también de la resistencia sistémica, mientras que los animales con nifedipina mostraron una recuperación significativa del gasto cardíaco después de los cuatro minutos de la reperfusion (Fig. 8).

Electrocardiográficos

La sumatoria del segmento ST mostró un brusco incremento en ambos grupos al ocluirse la arteria descendente anterior y se mantuvo todo el tiempo de isquemia elevado, aunque esta elevación fue significativamente mayor en el grupo nifedipina. Al comenzar el tiempo de reperfusion se inició el descenso en ambos grupos pero los animales que recibieron droga presentaron mayor sumatoria hasta el final de la experiencia (Fig. 9).

Luego de un incremento inicial en ambos grupos, se observó que los animales que habían recibido droga mostraban una menor caída de la sumatoria de onda R durante la isquemia y una mayor recuperación durante la reperfusion, mientras que en el grupo control la amplitud de la onda R continuó cayendo (Fig. 10).

La sumatoria de ondas Q se incrementó mucho menos en el grupo tratado que en el control, el que al final de la experiencia presentaba una sumatoria cuatro veces mayor que el grupo que recibió nifedipina (Fig. 11).

Enzimáticos

Los niveles de transaminasa glutámina-oxalacética durante la isquemia tuvieron un comportamiento similar en ambos grupos, pero la diferencia al soltar la ligadura fue de más de un 100% de incremento en el grupo placebo, bajando a las tres horas un 35%, pero manteniendo aún por encima de los valores obtenidos de los animales con nifedipina (Fig. 12).

Tabla I
Resultados hemodinámicos

	Basal		I (80-90 min)		R (4-15 min)	
	N	C	N	C	N	C
PA (mmHg)	125 ± 15	125 ± 13	$76 \pm 6^*$	118 ± 12	$78 \pm 7^*$	118 ± 14
PP (mmHg)	18 ± 1	17 ± 1	$17 \pm 2^{**}$	21 ± 1	$19 \pm 1^*$	26 ± 3
AD (mmHg)	4 ± 1	3 ± 1	5 ± 1	5 ± 1	6 ± 1	5 ± 1
RS (UR)	38 ± 9	35 ± 6	$21 \pm 3^{**}$	32 ± 8	$19 \pm 3^{**}$	36 ± 12
VM (ml/kg/m)	232 ± 41	230 ± 36	$202 \pm 14^{***}$	255 ± 41	$235 \pm 24^{**}$	241 ± 43

Promedio: \pm E.S. *: $p < 0,001$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,05$

PA: presión arterial media. PP: Presión pulmonar media. AD: presión media de aurícula derecha. RS: resistencia sistémica. VM: volumen minuto.

Tabla 2
Resultados electrocardiográficos

	Basal		I (80-90 min)		R (4-15 min)		R (200-210 min)	
	N	C	N	C	N	C	N	C
Σ ST (mm)	16 \pm 5	11 \pm 4	72 \pm 11	57 \pm 8	51 \pm 7 **	26 \pm 4	17 \pm 6 **	8 \pm 2
Σ R (mm)	103 \pm 29	99 \pm 22	56 \pm 17 *	19 \pm 6	63 \pm 22*	19 \pm 5	75 \pm 22 *	16 \pm 5
Σ Q (mm)	13 \pm 6	9 \pm 5	16 \pm 7 ***	35 \pm 11	18 \pm 6 *	77 \pm 15	27 \pm 15 *	114 \pm 12

Promedio: \pm E.S. *: $p < 0,001$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,05$

Referente a la láctico-dehidrogenasa se observó un comportamiento similar a la TGO, siendo el área de las curvas significativamente mayor en los controles (Fig. 13).

Histoquímica

En el grupo de animales que recibieron placebo la actividad enzimática de la succínico-dehidrogenasa y láctico-oxhidrogenasa en la zona del infarto e intermedia fue de 0 (ausencia de actividad) hasta \pm (actividad débil), mientras que en el grupo de nifedipina éste fue de \pm (actividad débil) hasta + y ++ (actividad moderada y elevada) (Figs. 14 y 15).

DISCUSION

Del análisis de los resultados obtenidos se desprende inicialmente que la disminución del trabajo cardíaco como consecuencia de la caída de la postcarga contribuiría a limitar el daño miocárdico provocado durante la isquemia y la reperfusión bajo tratamiento con nifedipina. Es difícil creer que sólo este efecto hemodinámico ya demostrado en el perro y en otros ani-

males de experimentación,^{10,11,12,13} como así también su acción sobre la circulación coronaria,¹³ sea el único responsable de esta acción protectora sobre el miocardio.

Es necesario hacer un análisis de la situación del miocardio isquémico partiendo de la base de que la disminución brusca del flujo coronario impuesta por la ligadura de una de sus arterias principales conduce al área comprometida a disminuir, por falta de oxígeno, la síntesis de adenosintrifosfato (ATP), comprometiendo así el metabolismo energético del corazón. Es sabido que el ATP, además de proporcionar la energía necesaria para la contracción, es el responsable del balance iónico celular y su acción sobre la enzima Na-K ATPasa, la conservación de una normal concentración del calcio intracelular y el mantenimiento de la estructura mitocondrial son otras funciones de este compuesto de alta energía. Por todo lo mencionado es fácil comprender que la isquemia, al comprometer la generación de ATP, altera el normal funcionamiento de la Na-K ATPasa, produciendo un ingreso exagerado de Na y una salida de

Tabla 3
Resultados enzimáticos

UI/L	Basal		I (80-90 min)		R (80-90 min)	
	N	C	N	C	N	C
TGO	28 \pm 3	27 \pm 4	35 \pm 3 **	40 \pm 4	60 \pm 22 *	111 \pm 15
LDH	1250 \pm 225	992 \pm 168	1227 \pm 174 ***	1608 \pm 364	1442 \pm 169 **	1912 \pm 255

Promedio: \pm E.S. *: $p < 0,001$ **: $p < 0,01$ ***: $p < 0,05$

TGO: transaminasa glutámico-oxalacética. LDH: láctico-dehidrogenasa.

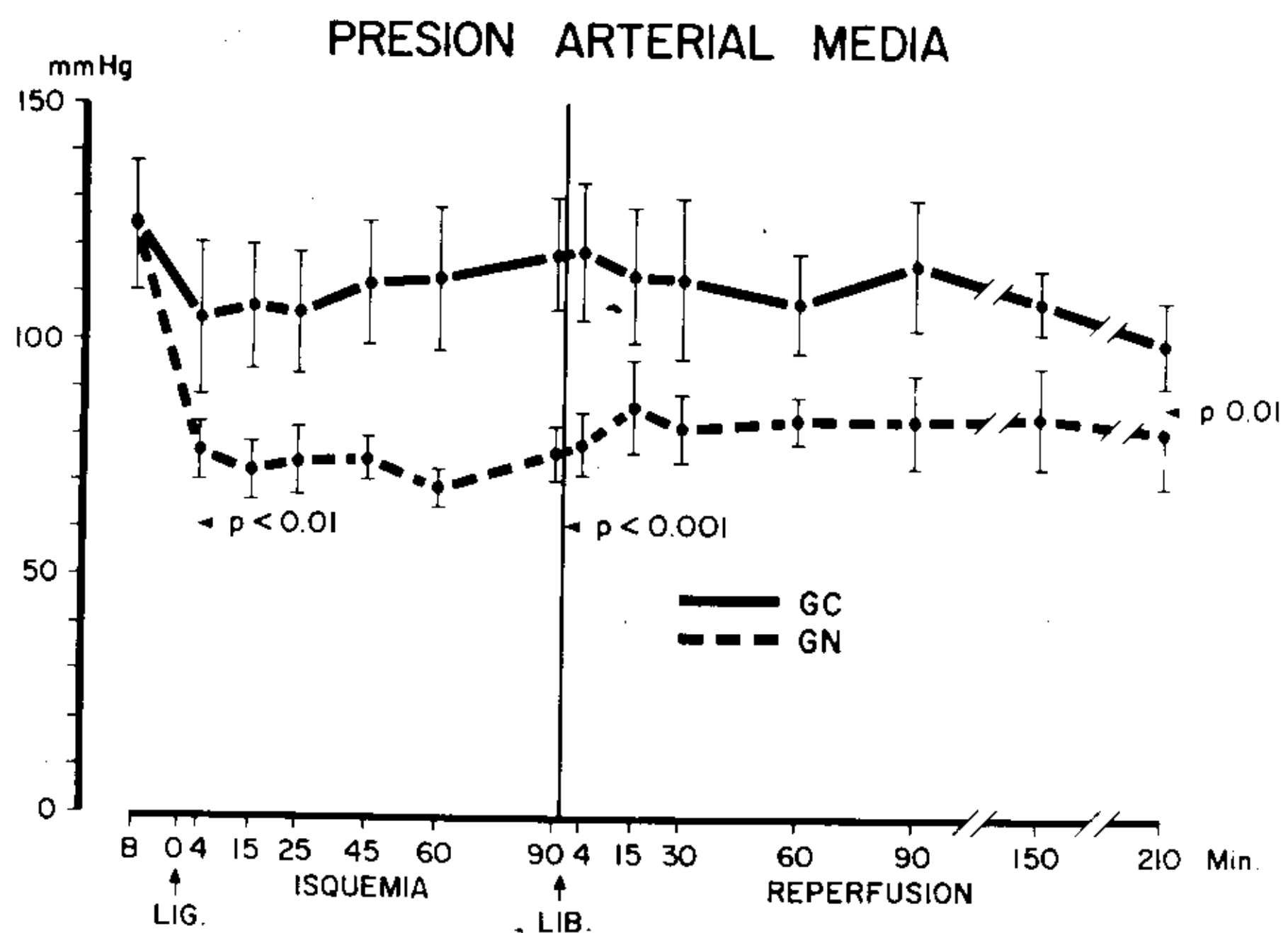


Fig. 5

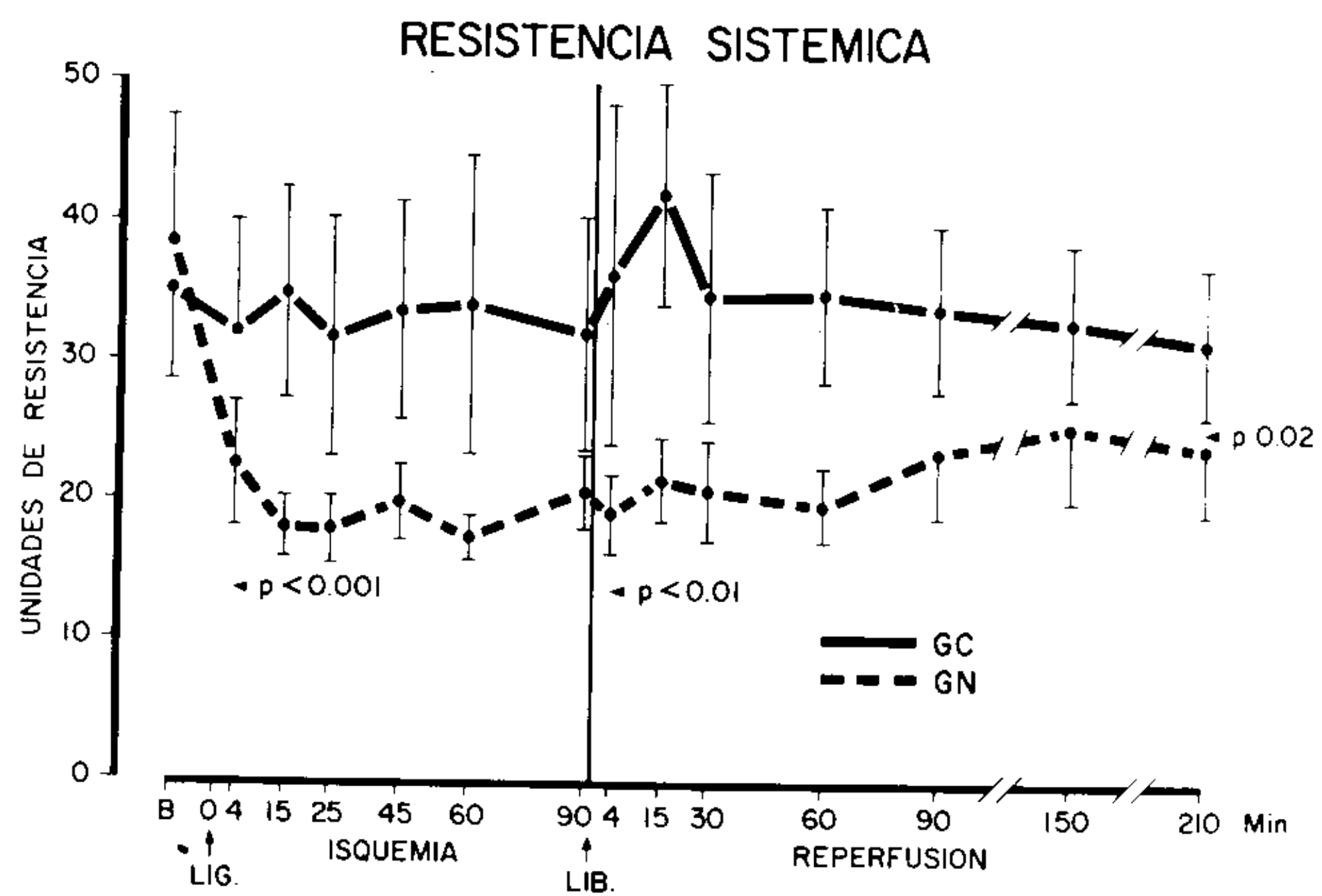


Fig. 6

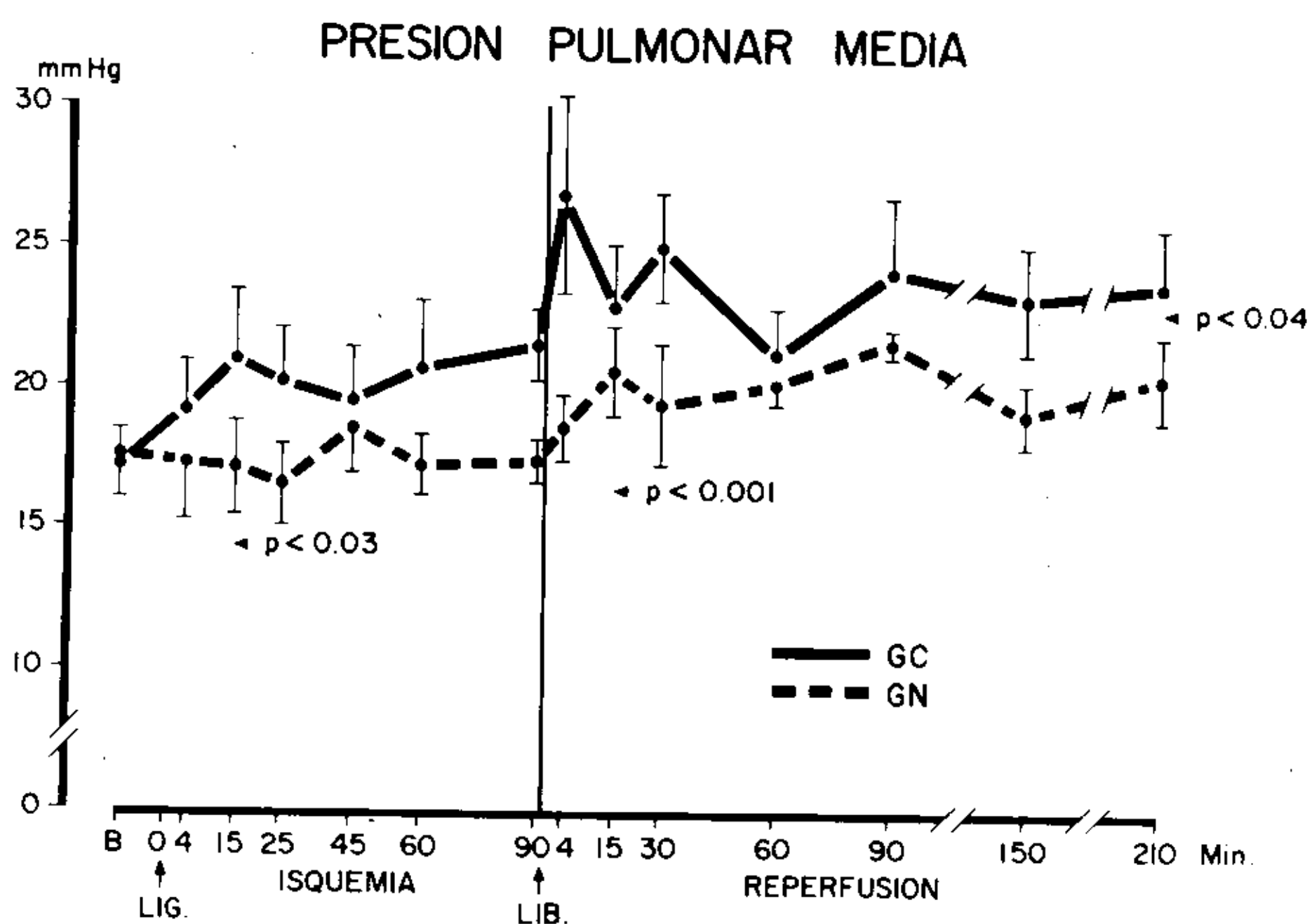


Fig. 7

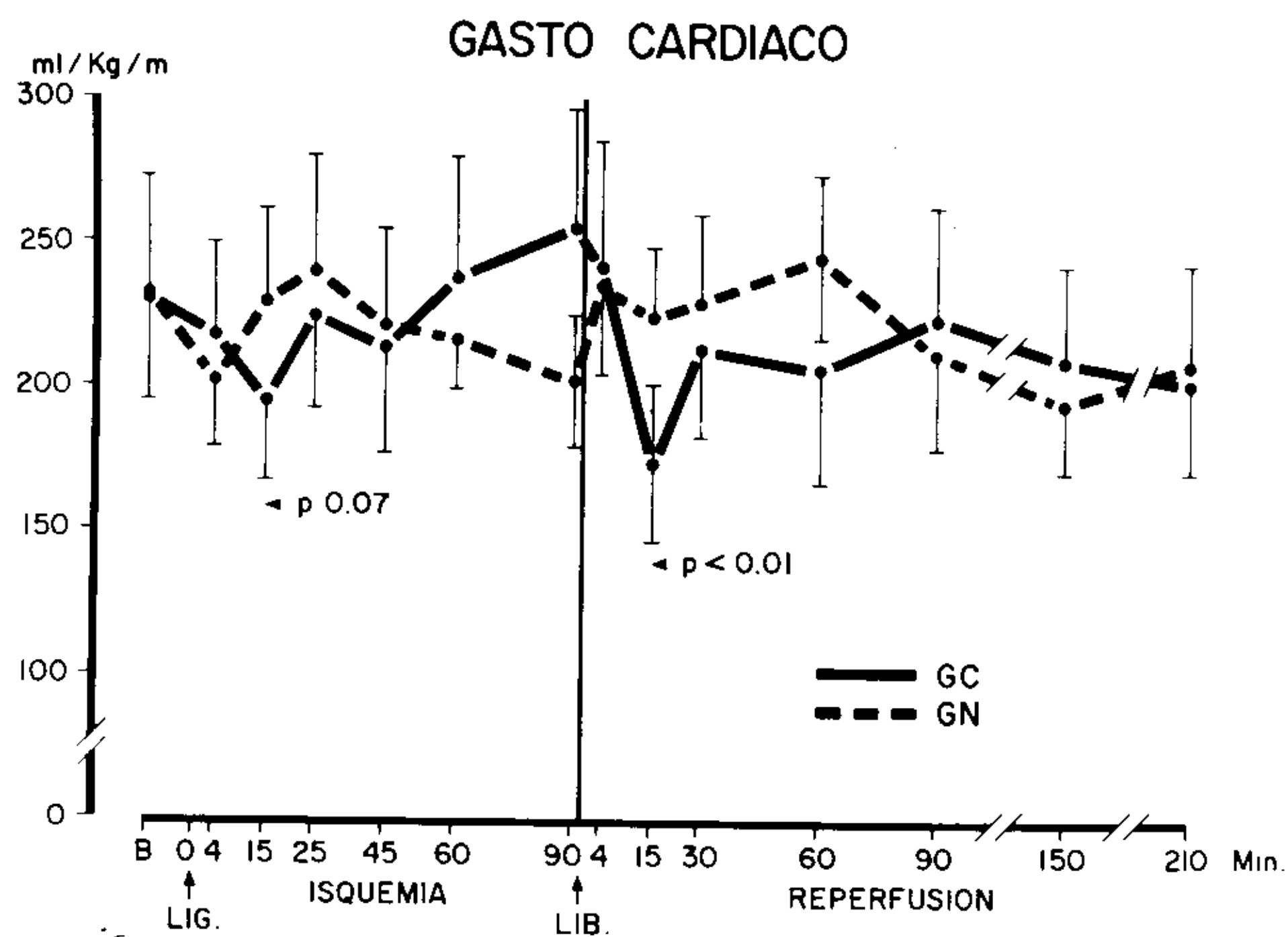


Fig. 8

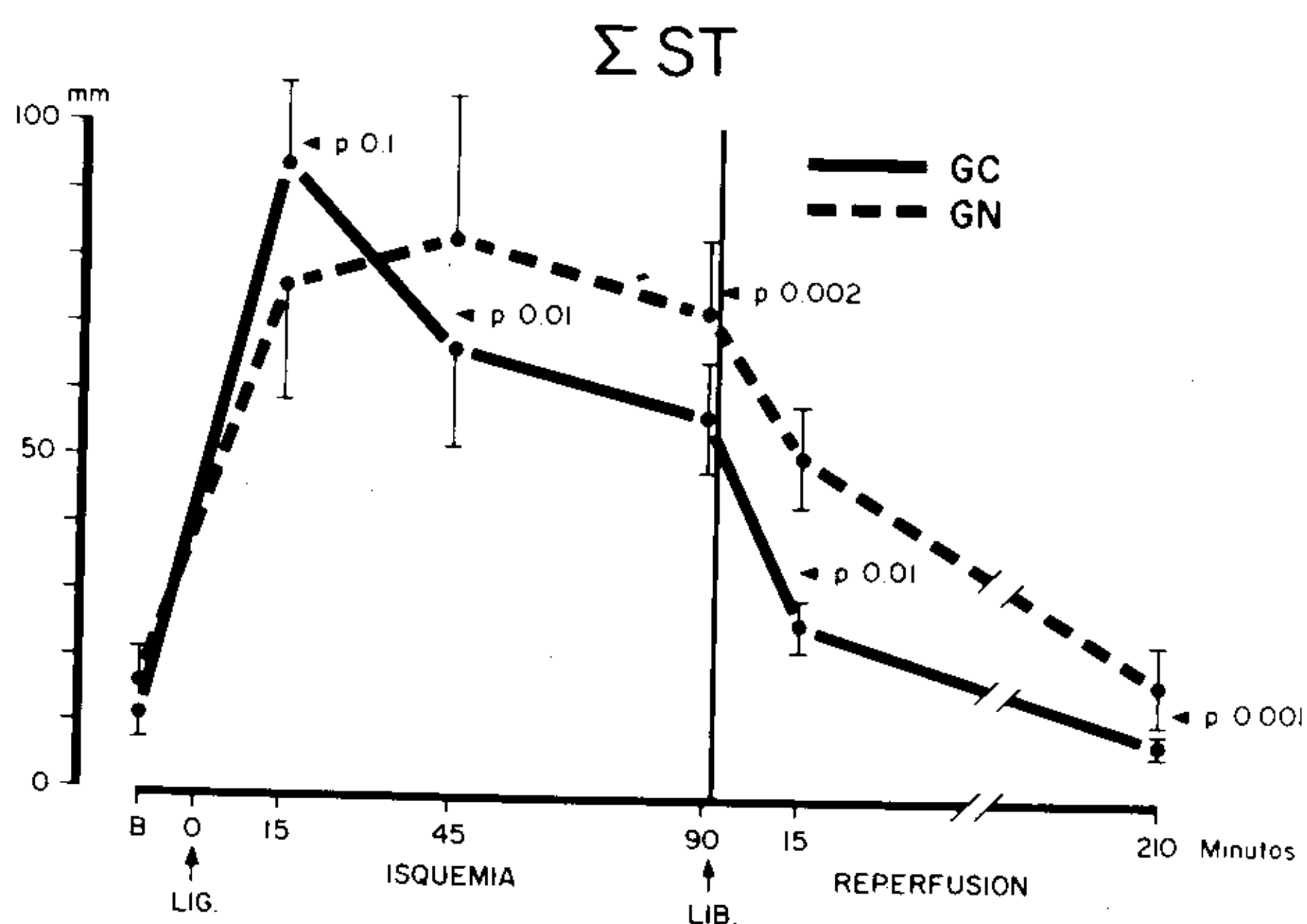


Fig. 9

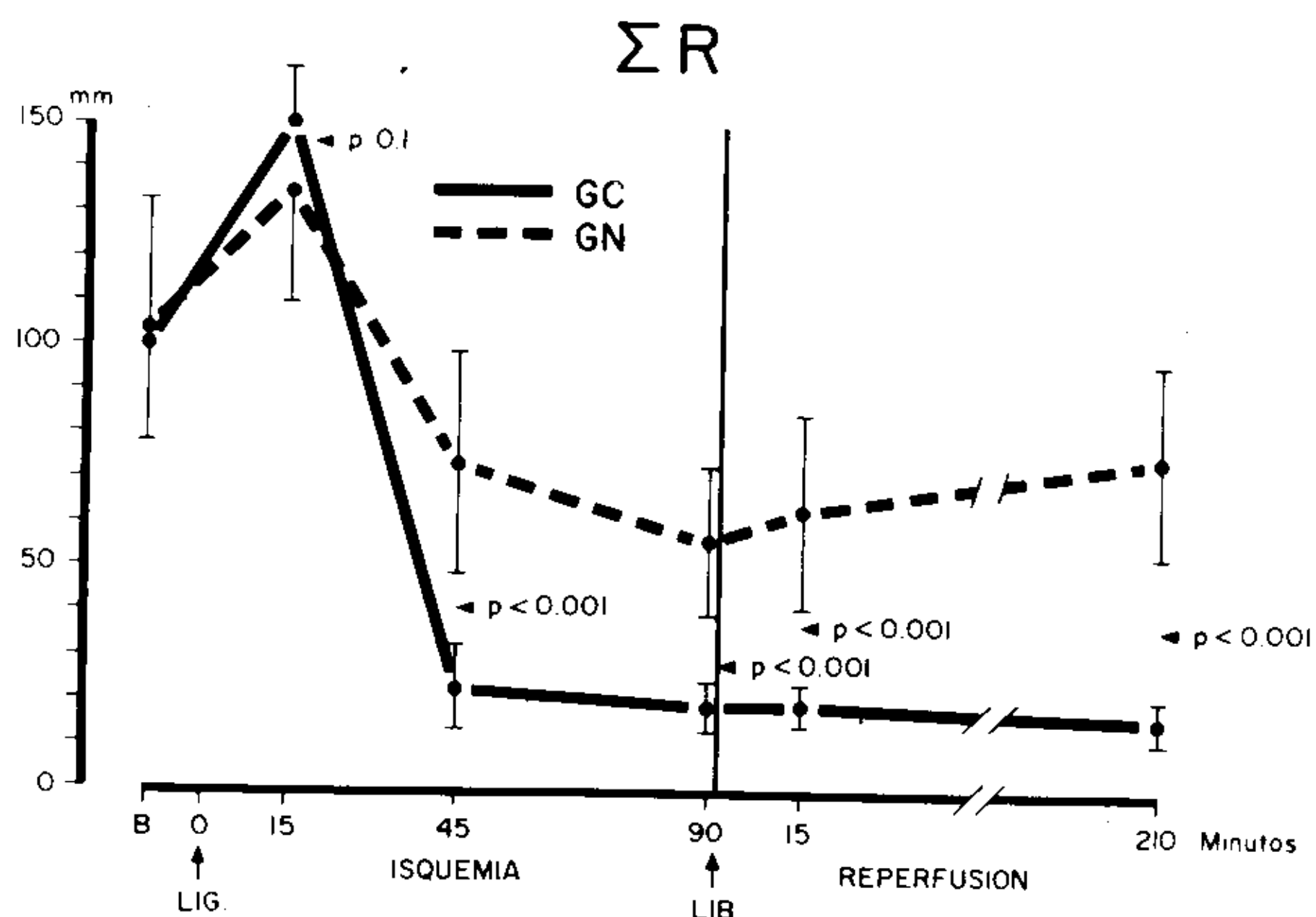


Fig. 10

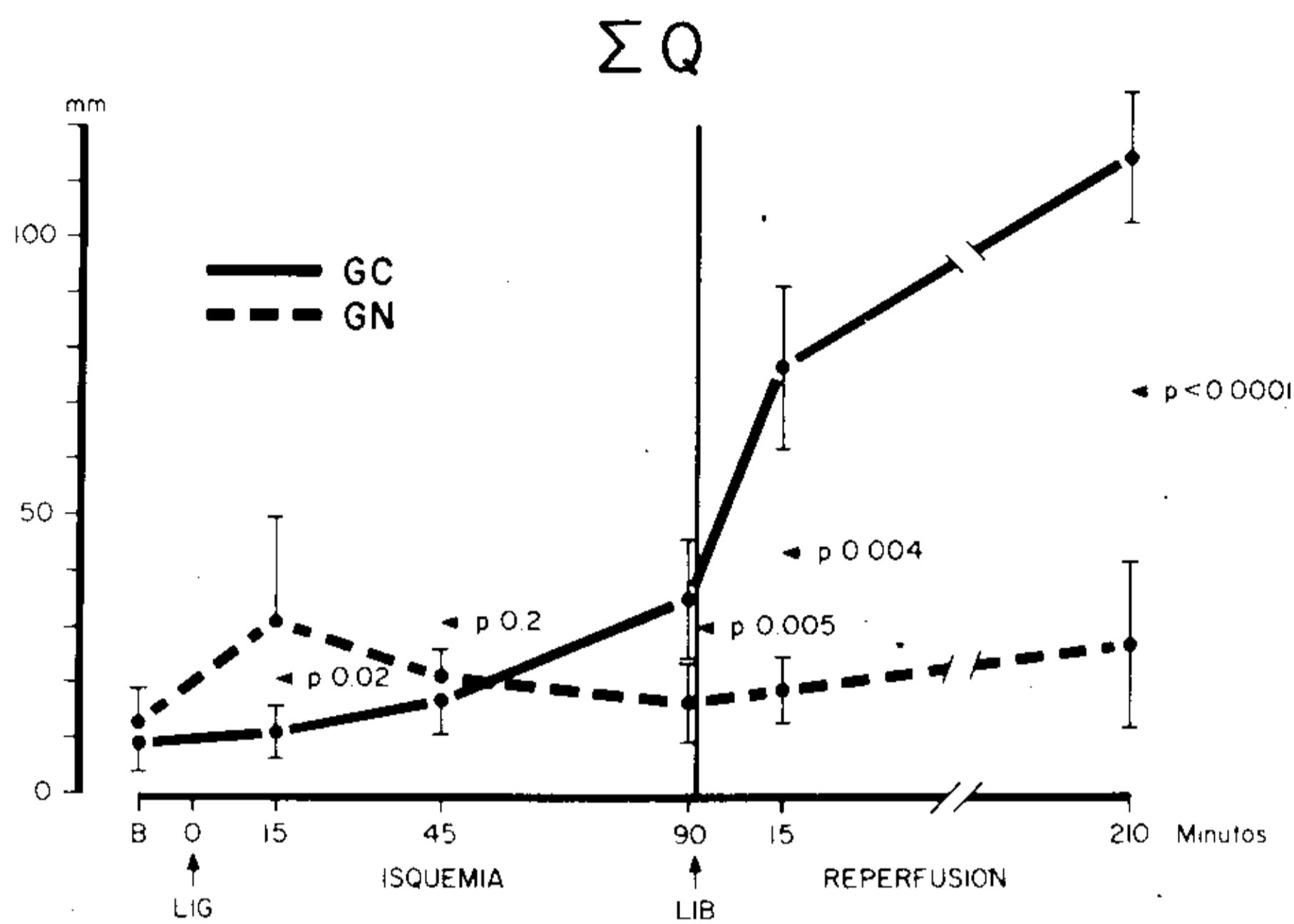


Fig. 11

K al exterior de la célula, que no sólo despolariza la membrana y aumenta la entrada del calcio, sino que también libera catecolaminas en forma masiva y, por vasoconstricción, agrava más la isquemia existente.

Ante esta situación la célula no puede manejar este exceso del calcio que activa fosfolipasas y proteasas, lo que agrava el deterioro de la estructura y función celular.^{14,15,16} En base a estos hechos demostrados, numerosos investigadores han utilizado a los bloqueantes cálcicos para frenar el ingreso del mismo a través de los canales lentos, ya que estos compuestos no interfieren la entrada del calcio por otros caminos, evitando la sobrecarga mitocondrial durante la isquemia y la reperfusion responsable de la reducción en la utilización de oxígeno y la generación de ATP.^{17,18,19,20,21}

En nuestro modelo experimental hemos podido comprobar además el conocido efecto hemodinámico de la nifedipina, y a través de él, y/o de la acción directa sobre el metabolismo celular ya comentado, un real efecto limitante sobre la extensión y reversibilidad del daño miocárdico provocado, ya que desde el punto de vista electrocardiográfico pudimos demostrar menor necrosis y mayor recuperación de los potenciales eléctricos en el grupo de animales que recibió la droga. Las enzimas TGO y LDH medidas en la sangre de la aurícula derecha mostraron mayores incrementos post-reperfusion en aquellos animales que no recibieron el

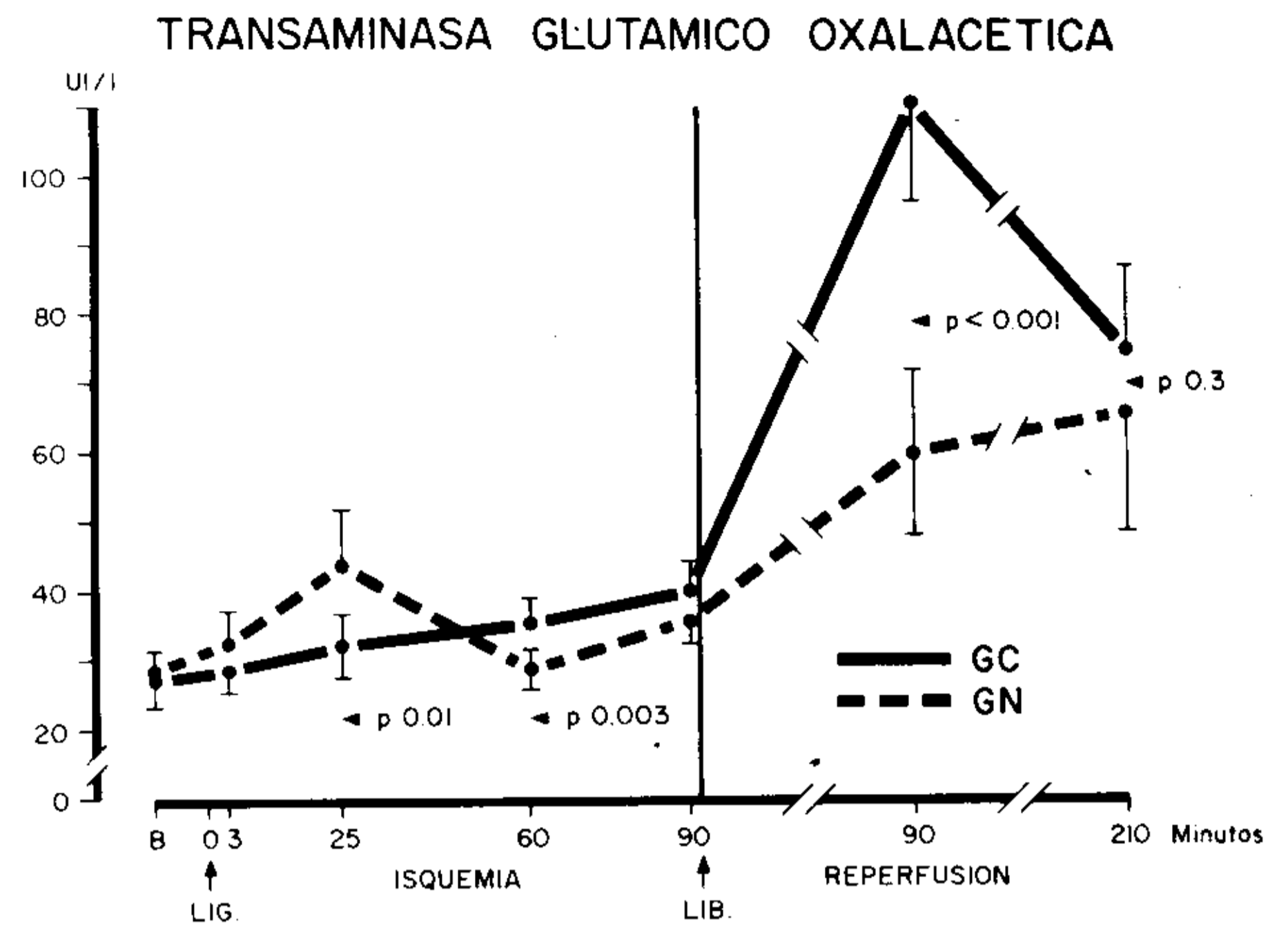


Fig. 12

bloqueante cálcico, lo que hablaría de un mayor daño celular en ellos.

Además el estudio histoquímico demostró, a través de la actividad de la láctico-dehidrogenasa y succindehidrogenasa, una mayor preservación de la estructura celular, sobre todo si tenemos en cuenta que esta última es una enzima puramente mitocondrial.

Por último, pensamos que los beneficios de este modelo experimental en cerdos radican en que el poco desarrollo de su circulación colateral no pone a disposición de las células isquémicas una mayor cantidad de calcio, lo que agravaría el daño miocárdico existente, situación que puede ser extrapolable al ser humano.

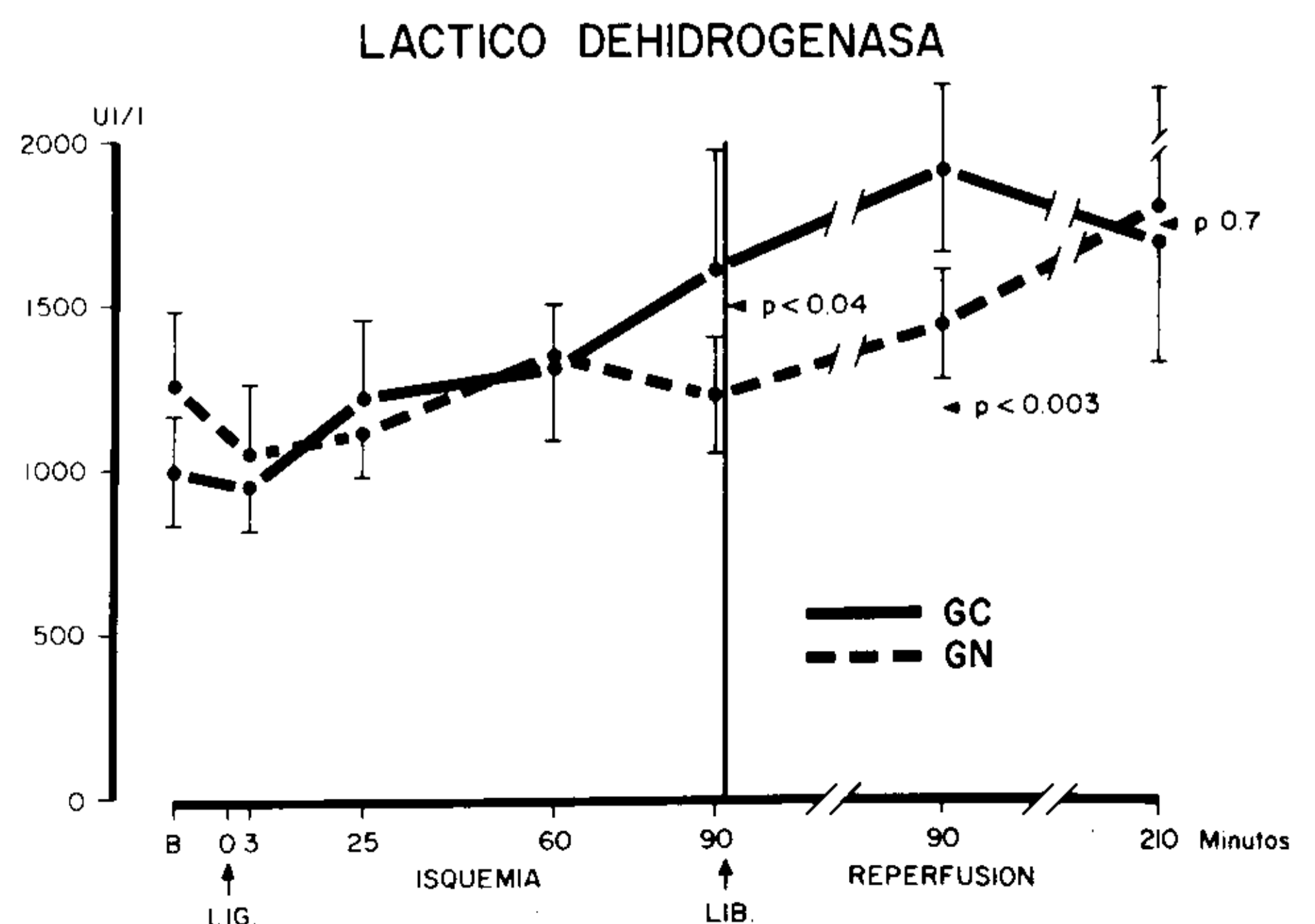


Fig. 13

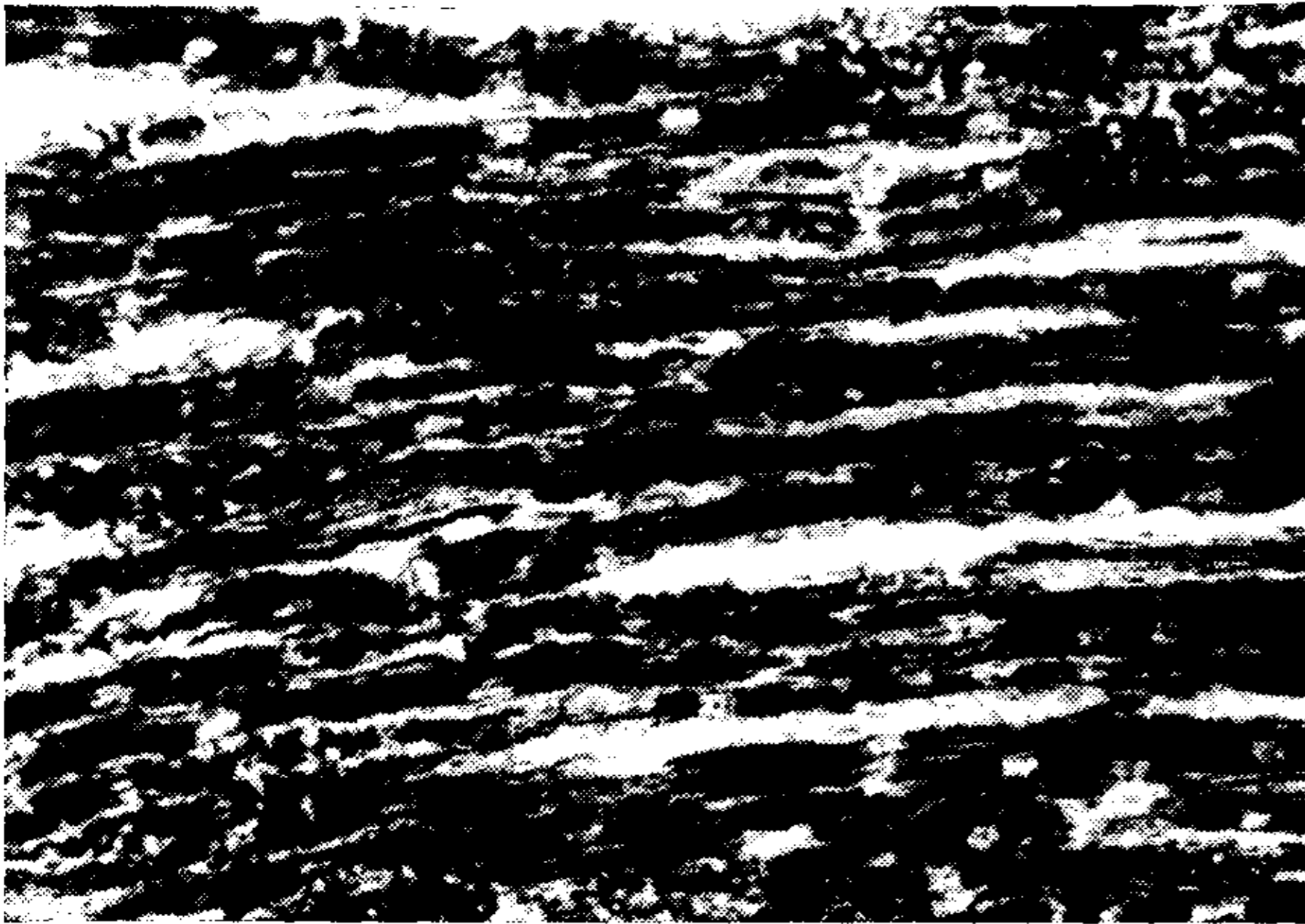


Fig. 14. Zona intermedia con actividad elevada de succínico-dehidrogenasa en un animal tratado con nifedipina.

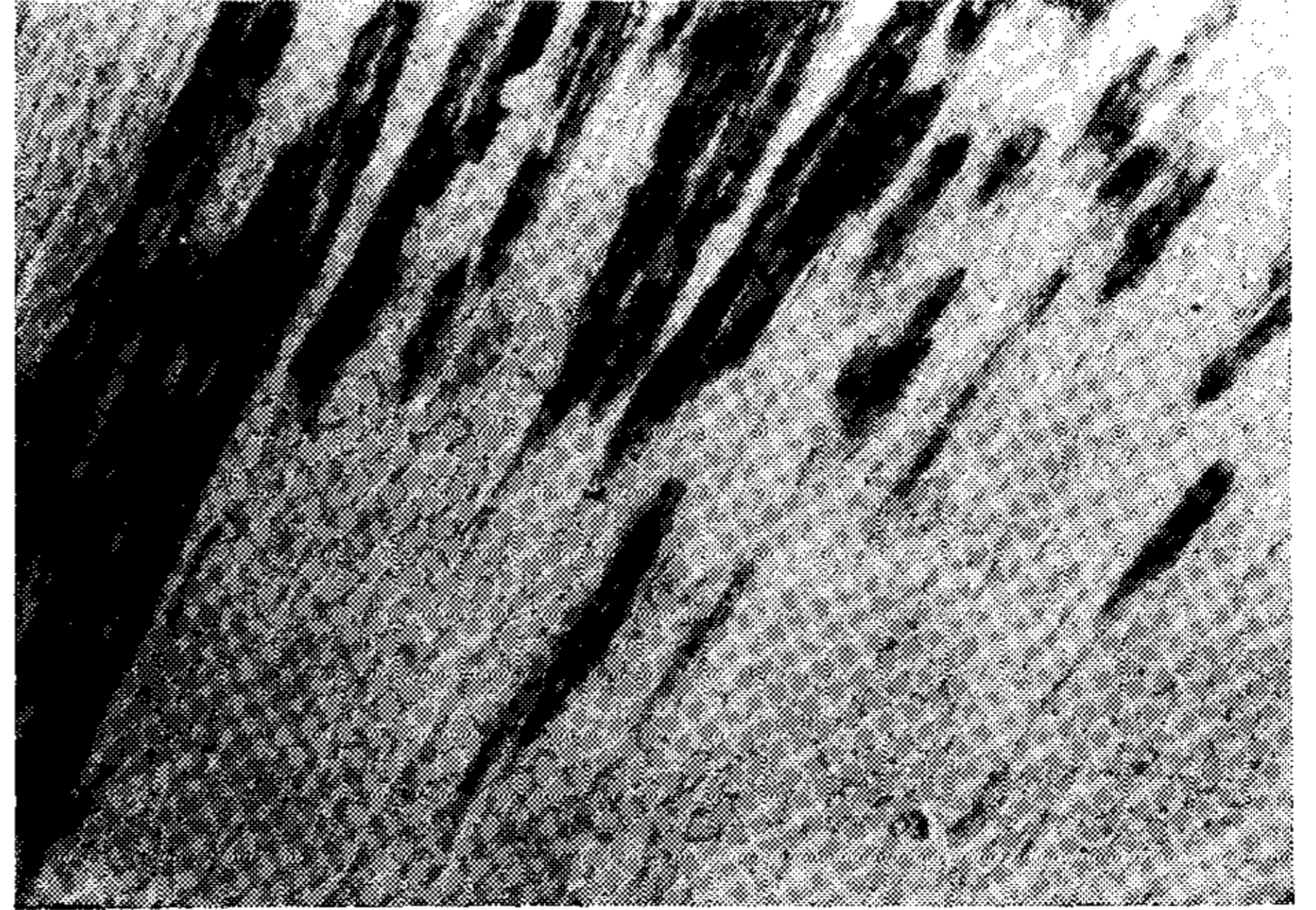


Fig. 15. Zona intermedia con actividad débil de succínico-dehidrogenasa en un animal tratado con placebo.

ACTION OF CALCIUM-ANTAGONIST DRUG OVER THE EXTENSION AND REVERSIBILITY OF EXPERIMENTAL MYOCARDIAL INFARCTION

The purpose of this paper is to evaluate if nifedipine (N) has cardioprotective action over ischemic myocardial injury provoked in the porcine heart. In 6 pigs N (3 mg/kg) was given sublingually 20 minutes before ischemia (I) provoked by the snare placed on the left anterior descending artery during 90 minutes. The dosis was repeated 20 minutes before reperfusion (snare release) (R). Other 6 pigs were used as controls (C). The extension of myocardial injury was gauged with epicardial electrocardiographic mapping over 11 points (ΣR and ΣQ), as well as serum levels of SGOT and HLD. Aortic (AO), pulmonary artery (PA) right atrial (RA) mean pressures, sistemic resistance (SR) were monitored and cardiac output (CO) measured. After 210 minutes of R the heart was excited for light microscopy and histochemical studies. The AO, PA and SR were significantly less in the animals that received N. CO was less in N, except post-reperfusion, where C group showed a deep decrease. The ΣR was less during I and recovery was much better in N. The ΣQ was at the end of the experience higher in C. The concentration of SGOT and HLD were increase significantly during R in C. In the pathologic study were found

fewer infiltrates and fibrillar necrosis as well as higher succinic-dehydrogenase concentration in the N group. It is concluded that in this model N significantly diminishes afterload and by this mechanism and/or by direct action over the myocardium diminishes injury during ischemia and reperfusion.

BIBLIOGRAFIA

1. Henry PD, Shuchleib R, Borda LJ, Williamson JR, Sobel BE: Effects of nifedipine on myocardial perfusion and ischemic injury in dogs. *Circ Res* 43: 372, 1978.
2. Henry PD, Shuchleib R, Clark RE, Pérez JE: Effects of nifedipine on myocardial ischemia: analysis of collateral flow pulsatile heart and regional muscle shortening. *Am J Cardiol* 44: 817, 1979.
3. Clark RE, Christlieb IY, Spratt JA, Henry PD, Fischer AE, Williamson JR, Sobel B: Myocardial preservation with nifedipine: a comparative study at normothermia. *Ann Thorac Surg* 31: 3, 1981.
4. Eckenhoff JE, Hafkenschiel JH, Landmesser CM: The coronary circulation in the dog. *Amer J Physiol* 148: 581, 1947.
5. Schmidt E, Schmidt FW: Aspartate aminotransferase UV method. *Enzym Biol Clin* 3: 1, 1963.
6. Weissbar D: Lactate dehydrogenase UV method. *Med Welt* 26: 387, 1975.
7. Farber E, Sternberg WH, Dunlap CE: Histochemical localization of specific oxidative enzymes. *Jour of Histochem* 4: 254, 1956.
8. Mc Cabe M, Maple AI, Jones GRN: Variations in dehydrogenase and neotetrazolium reductase (diaphorase) activities in various buffers studied in frozen sections. *J Hist Cytoch* 13: 541, 1945.
9. Cox JL, Mc Laughlin VN, Flowers NC, Horan LG: Ischemic zone surrounding acute myocardial infarction. Its morphology as detected staining dehydrogenase. *Am Heart J* 76: 650, 1968.

10. Hageman K, Niehves B, Schwanitz V, Arnold G, Lochner W: Untersuchungen zur extracardialen komponente der wirkung vasoaktiver substanzen an gesamtkreislauf des hundes. *Res Exp Med* 161: 203, 1973.
11. Mellander S, Johansson B: Controls of resistance exchange and capacitance functions in the peripheral circulation. *Pharmacolog Rev* 20: 117, 1968.
12. Raff KH, Kosche F, Lochner W: Untersuchungen mit nifedipine einer coronargefa Berweiternden substanz mit schnekler sublimaler wirkung. *Arzneim Forsch (drug Res)* 22: 33, 1972.
13. Maxwell GM, Rencis V: The effects of a new coronary vasodilator (BAY a 1040 nifedipine) on the coronary and sistemic hemodynamics in the anesthetized dog. *Aust J Exp Biol Med Sci* 51: 117, 1973.
14. Shen AC, Jennings RB: Kinetics of calcium and accumulation in acute myocardial injury. *Am J Pathol* 67: 441, 1972.
15. Shen AC, Jennings RB: Myocardial calcium and magnesium in acute ischemic injury. *Am J Pathol* 67: 417, 1972.
16. Henry PD, Shuchleib R, Daris J, Weiss ES, Sobel BE: Myocardial contracture and accumulation of mitochondrial calcium in ischemic rabbit heart. *Am J Physiol* 233: H677-H84, 1977.
17. Reiner KA, Lowe JE, Jennings RB: Effects of the calcium antagonist verapamil on necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circulation* 55: 581, 1977.
18. Selwyn AP, Welman E, Fox K, Horlock P, Pratt T, Klein M: The effect of nifedipine on acute experimental myocardial ischemia and infarction in dogs. *Circ Res* 44: 16, 1978.
19. Nayler WG, Fassold E, Yopez C: The pharmacological protection of mitochondrial function in hypoxic heart muscle: effect of verapamil, propranolol and methylprednisolone. *Cardiovasc. Res.* 12: 151, 1978.
20. Nayler WG, Yopez CE, Poole-Wilson PA: The effect of B-adrenoceptor and Ca²⁺ antagonist drugs on the hypoxia induced increase in resting tension. *Cardiovasc Res* 12: 666, 1978.
21. Nayler WG, Ferrari R, Williams A: Protective effect of pre-treatment with verapamil nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium.