

DEPARTAMENTO CIRUGIA

CITOPROTECCION MIOCÁRDICA: EFECTO DE LA  
TRIMETAZIDINA EN LA ISQUEMIA MIOCARDICA

PEDRO JOSE MORRILLAS BLASCO

UNIVERSITAT DE VALENCIA  
Servei de Publicacions  
2002

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 8 de Maig de 2002 davant un Tribunal format per:

- Pedro Zarco Gutierrez
- Carlos Carbonell Cantí
- Francisco Javier Chorro Gascó
- Francisco Navarro Lopez
- Jose maria Cruz Fernandez

Va ser dirigida per:

Prof. Dr. Juan Cosin Aguilar y Manuel Portolés Sanz

©Copyright: Servei de Publicacions  
Pedro José Morillas Blasco

---

Depòsit legal:

I.S.B.N.: 84-370-5562-8

Edita: Universitat de València  
Servei de Publicacions  
C/ Artes Gráficas, 13 bajo  
46010 València  
Spain  
Telèfon: 963864115

**UNIVERSITAT DE VALENCIA**  
**FACULTAD DE MEDICINA Y ODONTOLOGÍA**



***TESIS DOCTORAL***

**“CITOPROTECCIÓN MIOCÁRDICA: EFECTO DE LA  
TRIMETAZIDINA EN LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA”**

**Memoria presentada por  
Pedro José Morillas Blasco  
para optar al grado de Doctor en  
Medicina y Cirugía.  
Valencia 2001.**

**Dr. D. Juan Cosín Aguilar,**

Jefe de la Unidad de Investigación del Centro de Investigación del Hospital “La Fe” de  
Valencia.

**Dr. D. Manuel Portolés Sanz,**

Facultativo Especialista de la Unidad de Investigación del Centro de Investigación del  
Hospital “La Fe” de Valencia.

**CERTIFICAN:**

Que bajo su dirección, D. PEDRO JOSÉ MORILLAS BLASCO, con grado de  
licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo titulado:

“CITOPROTECCIÓN MIOCÁRDICA. EFECTO DE LA TRIMETAZIDINA EN LA  
ISQUEMIA MIOCÁRDICA”.

para poder optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Y para que conste a efectos  
legales firman la presente en Valencia a 21 de Octubre del año dos mil y uno.

Fdo. Dr. D. Juan Cosín Aguilar

Fdo. Dr. Manuel Portolés Sanz

## AGRADECIMIENTOS.-

A los Doctores D. Juan Cosín Aguilar y D. Manuel Portolés Sanz, a quienes debo no sólo la idea de este trabajo, sino su incondicional apoyo en la elaboración de este manuscrito, por sus ideas para mejorarlo y por abrirme un hueco en el fascinante campo de la Cardiología Experimental.

A los Dres Amparo Hernández, Carmen Capdevilla, Imma Azorín y Vicente Pallarés, por su amistad y por ser el complemento fundamental de este trabajo, sin los cuales no hubiera podido llegar a buen término este “viaje” que empezó a fraguarse hace 5 años.

Al Dr. Vicente Bertomeu por su constante estímulo y por las facilidades en la elaboración de esta monografía.

Al Dr. Joaquín Rueda (“Ximo”), compañero de batallas clínicas y que supo aceptar entre sus amistades a un “Madridista” (MIL GRACIAS) y al Dr. Miguel Angel Arnau, nuestro “*padrino*” en los primeros contactos con el *eléctrico* mundo del ECG.

Al resto de mis compañeros residentes, Segundo Martí, Alfonso Roldán, Ana Osa, Elena Sanchez, Luis Andrés, Paco Ten, Lola Domenech, Chimo Osca, Tasio Quesada, Paco Gonzalez, Chimo Martín, Luis Martínez y Ester Zorio, los cuales compartieron conmigo una ilusión que hoy es una gran realidad y a los que deseo la mejor fortuna.

Al resto de miembros del Servicio de Cardiología del Hospital “La Fe” de Valencia: médicos, personal de enfermería y secretarias, por su ayuda durante los 5 años de residencia y, muy especialmente a los Drs. Miguel Palencia (*trabajador infatigable*) y Adolfo Rincón de Arellano (*una buena persona donde las halla*), por su incondicional “apoyo”, su desinteresada ayuda en mi formación como cardiólogo y, en especial, por su amistad.

Al Dr. Francisco José Algarra Vidal, que supone un ejemplo a seguir para todos los que nos hemos formado bajo su “*estetoscopio*”.

*A la memoria de mi madre.*

*A M<sup>a</sup> Eugenia, mi vida, sin la cual todo esto no tendría ningún sentido.*

# INDICE GENERAL

Pág.

ABREVIATURAS .....	11
INTRODUCCIÓN .....	13
<b>1.- METABOLISMO CARDÍACO.....</b>	<b>15</b>
1.1.- Metabolismo de los carbohidratos .....	16
1.2.- Metabolismo de los ácidos grasos.....	18
1.3.- La mitocondria.....	20
<b>2.- ISQUEMIA MIOCÁRDICA.....</b>	<b>21</b>
2.1.- Efectos de la isquemia sobre la contractilidad.....	22
2.2.- Efectos de la isquemia sobre el metabolismo.....	24
2.3.- Alteraciones ultraestructurales.....	28
2.4.- Alteraciones iónicas y del equilibrio ácido-base.....	30
2.5.- Alteraciones electrofisiológicas.....	33
2.6.- Otras alteraciones.....	34
<b>3.- LESIÓN POR REPERFUSIÓN.-.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.- Mecanismos del daño por reperfusión.-.....</b>	<b>35</b>
3.1.1.- La paradoja del oxígeno. Papel de los radicales libres.....	35
3.1.2.- La paradoja del calcio.....	40
3.1.3.- La paradoja del protón: el intercambiador sodio-hidrógeno.....	42
3.1.4.- Papel de los ácidos grasos.....	43
3.1.5.- Otros mecanismos.....	44
<b>3.2.- Eventos asociados al daño por reperfusión.....</b>	<b>48</b>
3.2.1.- Arritmias cardíacas.....	48
3.2.2.- Miocardio aturdido.....	50
3.2.3.- Daño celular letal. Hipercontractura.....	53
<b>4.- APOPTOSIS.....</b>	<b>54</b>
<b>4.1.- Apoptosis en la cardiopatía isquémica.....</b>	<b>56</b>
4.1.1.- Hallazgos celulares.....	57
4.1.2.- Hallazgos moleculares.....	58
4.1.3.- Implicaciones fisiopatológicas.....	59

<b>5.- CITOPROTECCIÓN MIOCÁRDICA.....</b>	<b>60</b>
<b>5.1.- Antagonistas del Calcio.....</b>	<b>60</b>
<b>5.2.- Inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina.....</b>	<b>63</b>
<b>5.3.- Betabloqueantes. Carvedilol.....</b>	<b>65</b>
<b>5.4.- Inhibidores de la bomba Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>.....</b>	<b>66</b>
<b>5.5.- Óxido nítrico.....</b>	<b>67</b>
<b>5.6.- Fármacos antioxidantes.....</b>	<b>68</b>
<b>5.7.- Otros fármacos.....</b>	<b>69</b>
<b>6.- TERAPIA METABÓLICA.....</b>	<b>72</b>
<b>6.1.- Moduladores metabólicos.....</b>	<b>72</b>
<b>6.2.- Trimetazidina.....</b>	<b>77</b>
6.2.1.- Fórmula desarrollada.....	77
6.2.2.- Farmacocinética.....	78
6.2.3.- Actividad farmacológica.....	79
6.2.4.- Tolerancia y toxicidad.....	79
6.2.5.- Hipótesis del mecanismo de acción.....	81
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVO.....</b>	<b>86</b>
<b>MATERIAL Y MÉTODO.....</b>	<b>89</b>
<b>1.- MATERIAL.....</b>	<b>90</b>
<b>1.1.- Animales de experimentación.....</b>	<b>90</b>
<b>1.2.- Área de experimentación.....</b>	<b>90</b>
<b>1.3.- Material quirúrgico.....</b>	<b>90</b>
<b>1.4.- Ventilación mecánica.....</b>	<b>91</b>
<b>1.5.- Registro de señales.....</b>	<b>91</b>
<b>1.6.- Catéteres y guías.....</b>	<b>91</b>
<b>1.7.- Medida de flujo coronario.....</b>	<b>93</b>
<b>1.8.- Medidores de función regional miocárdica.....</b>	<b>93</b>
<b>1.9.- Bombas de infusión continua.....</b>	<b>93</b>
<b>1.10.- Fármacos y fluidos.....</b>	<b>93</b>
<b>1.11.- Sacrificio del animal.....</b>	<b>94</b>
<b>1.12.- Estudios ultraestructurales.....</b>	<b>94</b>



<b>2.- METODOLOGÍA GENERAL.....</b>	<b>95</b>
<b>2.1.- Preparación de los animales de experimentación.....</b>	<b>95</b>
<b>2.2.- Criterios de selección y exclusión.....</b>	<b>95</b>
<b>2.3.- Anestesia.....</b>	<b>96</b>
<b>2.4.- Monitorización ECG periférico.....</b>	<b>96</b>
<b>2.5.- Toracotomía.....</b>	<b>97</b>
<b>2.6.- Pericardiotomía.....</b>	<b>97</b>
<b>2.7.- Disección y oclusión coronaria.....</b>	<b>97</b>
<b>2.8.- Implantación de cristales piezoeléctricos.....</b>	<b>98</b>
2.8.1.- Situación de los microcristales.....	98
2.8.2.- Técnica de implantación.....	98
<b>2.9.- Medida de la presión ventricular.....</b>	<b>99</b>
<b>2.10.- Calibración de los diversos registros.....</b>	<b>99</b>
<b>2.11.- Análisis bioquímico.....</b>	<b>100</b>
<b>2.12.- Estudio <i>postmortem</i>.....</b>	<b>101</b>
<b>3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.....</b>	<b>105</b>
<b>3.1.- Preparación experimental básica.....</b>	<b>105</b>
<b>3.2.- Protocolos específicos.....</b>	<b>105</b>
<b>3.3.- Series experimentales.....</b>	<b>105</b>
<b>3.4.- Tratamiento.....</b>	<b>106</b>
<b>4.- PARÁMETROS ANALIZADOS.....</b>	<b>106</b>
<b>4.1.- Estudios hemodinámicos.....</b>	<b>106</b>
<b>4.2.- Estudios microscópicos.....</b>	<b>108</b>
4.2.1.- Estudio de microscopía óptica.....	108
4.2.2.- Estudio de microscopía electrónica.....	109
4.2.2.1.- Análisis cualitativo de las micrografías.....	109
4.2.2.2.- Análisis cuantitativo de las micrografías.....	109
4.2.2.3.- Material utilizado.....	110
<b>5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....</b>	<b>110</b>
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>112</b>
<b>PROTOCOLO DE ISQUEMIAS BREVES Y REPETIDAS.....</b>	<b>113</b>
<b>1.- FUNCION GLOBAL Y REGIONAL DE LAS SERIES.....</b>	<b>113</b>
<b>1.1.- Serie Placebo.....</b>	<b>113</b>

1.1.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	113
1.1.2.-	Parámetros de función regional.....	114
1.1.3.-	Comparación entre zona isquémica y zona control.....	116
<b>1.2.-</b>	<b>Serie Trimetazidina.....</b>	<b>119</b>
1.2.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	119
1.2.2.-	Parámetros de función regional.....	120
1.2.3.-	Comparación entre zona control vs zona isquémica....	122
<b>1.3.-</b>	<b>Comparación serie Placebo vs serie Trimetazidina.....</b>	<b>124</b>
1.3.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	124
1.3.2.-	Parámetros de función regional.....	126
<b>2.-</b>	<b>RESULTADOS DEL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.....</b>	<b>129</b>
<b>2.1.-</b>	<b>Serie Placebo.....</b>	<b>129</b>
<b>2.2.-</b>	<b>Serie Trimetazidina.....</b>	<b>132</b>
<b>2.3.-</b>	<b>Comparación serie Placebo vs serie Trimetazidina.....</b>	<b>133</b>
<b>3.-</b>	<b>ANÁLISIS BIOQUÍMICO.....</b>	<b>137</b>
<b>PROTOCOLO DE ISQUEMIA ÚNICA Y PROLONGADA.....</b>		<b>138</b>
<b>1.-</b>	<b>FUNCIÓN GLOBAL Y REGIONAL DE LAS SERIES.....</b>	<b>138</b>
<b>1.1.-</b>	<b>Serie Placebo.....</b>	<b>138</b>
1.1.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	138
1.1.2.-	Parámetros de función regional.....	139
1.1.3.-	Comparación zona isquémica vs zona control.....	141
<b>1.2.-</b>	<b>Serie Trimetazidina.....</b>	<b>143</b>
1.2.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	143
1.2.2.-	Parámetros de función regional.....	144
1.2.3.-	Comparación zona isquémica vs zona control.....	145
<b>1.3.-</b>	<b>Comparación serie Placebo vs serie Trimetazidina.....</b>	<b>147</b>
1.3.1.-	Parámetros hemodinámicos.....	147
1.3.2.-	Parámetros de función regional.....	149
<b>2.-</b>	<b>RESULTADOS DEL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.....</b>	<b>152</b>
<b>2.1.-</b>	<b>Serie Placebo.....</b>	<b>152</b>
<b>2.2.-</b>	<b>Serie Trimetazidina.....</b>	<b>153</b>
<b>2.3.-</b>	<b>Comparación serie Placebo vs serie Trimetazidina.....</b>	<b>156</b>

<b>DISCUSIÓN</b> .....	159
<b>1. CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.</b>	
<b>VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA</b> .....	160
1.1.- El modelo experimental.....	160
1.2.- Técnica de medición. Cristales ultrasónicos.....	161
1.3.- Ocluser coronario.....	163
1.4.- Protocolo	
isquémico.....	163
1.5.- Zonas analizadas.....	166
<b>2.- ANALISIS DE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS</b>	
<b>Y DE FUNCIÓN VENTRICULAR</b> .....	166
2.1.- Efectos de un episodio de isquemia única sobre	
la contractilidad miocárdica.....	166
2.2.- Efectos de episodios breves y repetidos sobre	
la contractilidad miocárdica.....	170
<b>3.- ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN EL MIOCARDIO</b>	
<b>SOMETIDO A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN. ESTUDIO</b>	
<b>ULTRAESTRUCTURAL</b> .....	176
3.1.- Isquemias breves y repetidas.....	177
3.2.- Isquemia única y prolongada.....	180
<b>4.- TRIMETAZIDINA Y ATURDIMIENTO MIOCÁRDICO</b> .....	182
4.1.- Estudios experimentales.....	182
4.2.- La Trimetazidina en los ensayos clínicos.....	194
4.2.1.- Evaluación en monoterapia.....	194
4.2.1.1.- Estudios controlados contra placebo.....	194
4.2.1.2.- Estudios contra fármacos de referencia.....	194
4.2.2.- Evaluación en tratamiento asociado.....	196
4.2.3.- Evaluación en situaciones de isquemia extrema.....	197
4.2.3.1.- Cirugía extracorpórea.....	197
4.2.3.2.- Angioplastia coronaria.....	198
4.2.3.3.- Cardiopatía isquémica avanzada.....	198
4.2.3.4.- Infarto de miocardio.....	199
4.2.3.5.- Ecocardiografía con dobutamina.....	200

**CONCLUSIONES.....202**

**BIBLIOGRAFÍA.....205**

# ***ABREVIATURAS***

## **ABREVIATURAS**

- **ACTP:** Angioplastia coronaria transluminal percutánea
- **Acx:** Arteria circunfleja.
- **ADA:** Arteria descendente anterior.
- **AGL:** ácidos grasos.
- **ADP:** Difosfato 5' de adenosina.
- **ATP:** Trifosfato 5' de adenosina
- **CK:** Creatin Kinasa Total.
- **CK-MB:** Fracción MB de la Creatin Kinasa.
- **dP/dt:** Derivada de la presión respecto al tiempo.
- **ECG:** Electrocardiograma.
- **FA:** Fracción de acortamiento (%).
- **FC:** Frecuencia cardíaca.
- **FLC:** Flujo coronario.
- **GIK:** Solución de glucosa-insulina-potasio.
- **IAM:** Infarto agudo de miocardio.
- **IECA:** Inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina.
- **Is:** Isquemia.
- **Kgs:** Kilogramos.
- **LTD:** Longitud telediastólica.
- **LTS:** Longitud telesistólica.
- **NO:** Óxido nítrico.
- **Ns:** No significativo.
- **PI:** Protocolo isquémico.
- **PVI:** Presión ventricular izquierda.
- **Re:** Reperusión.

# ***INTRODUCCIÓN***

El corazón, al igual que muchos otros órganos, depende por completo de un aporte continuo de flujo sanguíneo y de nutrientes metabólicos a través de los cuales obtiene la energía necesaria (ATP) para realizar sus funciones vitales. Esta energía se obtiene a partir de diferentes sustratos, entre los que destacan los carbohidratos y los ácidos grasos. La interrupción de este aporte sanguíneo, incluso durante periodos de tiempo muy breves, provoca la alteración de muchos de los procesos celulares, al mismo tiempo que pone en marcha una serie de mecanismos homeostáticos cuyo objetivo es mantener las funciones y reducir al mínimo las lesiones resultantes. Incluso tras el restablecimiento del flujo sanguíneo en las arterias epicárdicas, pueden producirse nuevas lesiones debidas a la reperfusión, que comparten muchos aspectos característicos de la respuesta inflamatoria.

Hasta hace poco tiempo las aproximaciones terapéuticas de la cardiopatía isquémica se orientaban fundamentalmente en la prevención de la isquemia, modificando los parámetros hemodinámicos. Desde los nitratos cuyas propiedades antianginosas fueron descubiertas al azar en el siglo XIX en una fábrica de explosivos, pasando por los betabloqueantes en los años 60 y llegando hasta los calcioantagonistas, muchas han sido las terapias utilizadas en combatir esta enfermedad, incluyendo el desarrollo de la técnica de "by-pass" aorto-coronario al comienzo de los años 80 y la aparición extraordinaria de la angioplastia. En esta fase, los objetivos del tratamiento quedaron claramente definidos: reducir la demanda e incrementar el aporte de oxígeno al miocardio. Los grupos terapéuticos existentes atendían a esta doble necesidad y, en general, la manifestación clínica del sufrimiento miocárdico, es decir la crisis de angor, podía controlarse correctamente e incluso desaparecer.

Sin embargo, independientemente del estadio evolutivo de la cardiopatía isquémica, del tratamiento hemodinámico administrado y del estado clínico, ningún paciente coronario se halla totalmente libre del riesgo de isquemia. Y cuando la isquemia se presenta, a pesar de todo, cada episodio conlleva su propio riesgo de arritmia, infarto de miocardio, muerte súbita y reducción de la esperanza de vida del paciente. Así quedó demostrado hace una década en un trabajo publicado por Deedwania y Carbajal (1990) en 107 pacientes coronarios estables, clínicamente controlados mediante tratamientos antianginosos convencionales, y que, a pesar de ello, el 43% presentaba al menos un episodio isquémico en el registro de Holter. Más aún, 35 de estos 46 pacientes no manifestaban sintomatología clínica alguna que hiciera sospechar la existencia de tales episodios. Lo que resultaba todavía más alarmante es que, durante los dos años siguientes, el 24% de los 46 pacientes que presentaron episodios isquémicos en el registro Holter fallecieron de causa cardíaca en comparación con el 8% de los pacientes que no presentaron signos de isquemia ( $p=0.023$ ).



Así pues, y dado que en la actualidad no se dispone de tratamientos ni de intervenciones capaces de defender definitivamente al paciente coronario de la isquemia, se ha iniciado una nueva línea de investigación centrada en la cascada de fenómenos metabólicos que conduce de la isquemia a la lesión de la célula del miocardio, en lo que se conoce como *citoprotección miocárdica*, con el enorme interés que supone proteger al miocardio en todos los pacientes coronarios, limitando las secuelas y la gravedad de la isquemia cuando ésta, pese a todo, se produce. La comprensión de los mecanismos que llevan a la muerte de los miocitos ha permitido el desarrollo de estas intervenciones terapéuticas diseñadas para mitigar los procesos fisiopatológicos que acompañan a la isquemia y a la reperfusión miocárdicas (Naka *et al.*, 1997).

## 1.- METABOLISMO CARDÍACO.-

El músculo cardíaco, para hacer frente a las necesidades energéticas de la contracción, debe producir una elevada cantidad de trifosfato 5' de adenosina (ATP) a partir de sus productos de degradación, el difosfato 5' de adenosina (ADP) y el fosfato inorgánico. El contenido cardíaco de ATP es de aproximadamente 20  $\mu\text{mol/g}$  ( de peso seco), mientras que su consumo es muy elevado; tengamos presente que durante el transcurso de un día, la célula cardíaca debe contraerse alrededor de 90.000 veces, produciendo y consumiendo 30 Kg de ATP. El simple cálculo ilustra que el ATP debe ser resintetizado tan rápidamente como es consumido, dado que sin una repleción continua, los niveles intracelulares de ATP se agotarían en menos de 1 minuto (Taegtmeyer *et al.*, 1998). Esta simple consideración justifica la complejidad de la estructura y del metabolismo de la célula cardíaca.

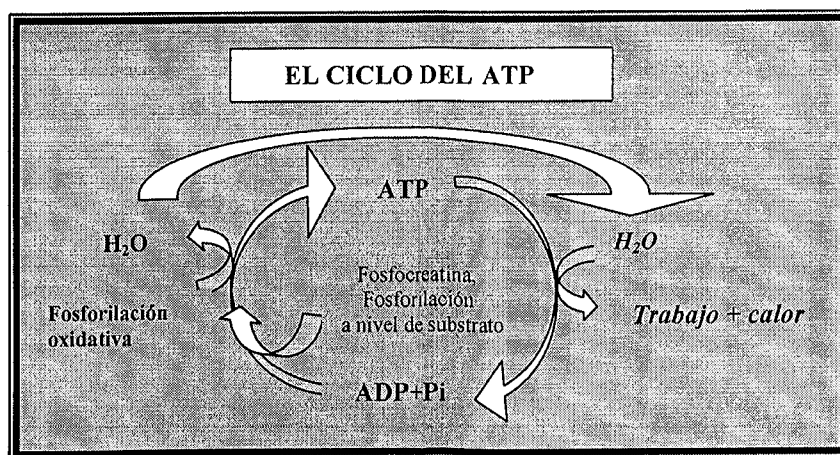


Figura I.1.- Ciclo del ATP.-

Dicha producción se consigue a través del metabolismo energético, representado por una serie de reacciones dirigidas a degradar los diferentes sustratos, liberando así la energía intrínseca en ellos contenida. Un importante principio del metabolismo energético del corazón es la habilidad de extraer energía de todos los sustratos presentes en el organismo mamífero ("el corazón es omnívoro"): carbohidratos (glucosa, lactato, piruvato), ácidos grasos (AGL), aminoácidos y cuerpos cetónicos, aunque estos dos últimos revisten poca importancia. El metabolismo miocárdico es esencialmente oxidativo, esto es, necesita oxígeno para las oxidaciones mitocondriales que son necesarias para la producción de ATP. Para esto, el miocardio humano extrae el 80% del oxígeno arterial. Una parte del metabolismo miocárdico se desarrolla en el citoplasma y otra parte en el interior de la mitocondria, en la matriz mitocondrial (Ferrari, 1992).

### ***1.1. Metabolismo de los carbohidratos.-***

Los carbohidratos de mayor importancia para el metabolismo energético cardíaco en situaciones fisiológicas son la glucosa y el lactato, como sustratos exógenos, y el glucógeno como sustrato endógeno (Taegtmeier, 1994).

La extracción de glucosa extracelular está regulada por el gradiente transmembrana y la concentración y actividad de los transportadores de glucosa en la membrana plasmática: GLUT 1 y GLUT 4 (Bell *et al.*, 1990). El gradiente transmembrana está determinado por la glucosa intersticial y las concentraciones intracelulares de glucosa libre. La concentración intersticial de glucosa está en función de la concentración arterial de glucosa y del flujo sanguíneo, de tal manera que los niveles de glucosa intersticial y el gradiente transmembrana están disminuidos durante la isquemia y aumentados durante la hiperglucemia (Hall *et al.*, 1996).

Una vez dentro de la célula, la glucosa libre es rápidamente fosforilada por una hexoquinasa para formar glucosa-6-fosfato, que resulta impermeable a la membrana celular. Esta glucosa-6-fosfato puede ser usada para sintetizar glucógeno (vía regulada por la concentración de glucosa-6-fosfato y la actividad de la glucógeno sintetasa), o puede ser utilizada para generar energía (ATP) mediante 2 vías metabólicas: la *glucólisis anaeróbica* y la *fosforilación oxidativa mitocondrial*.

La glucólisis anaeróbica (primera parte de la vía metabólica de la glucosa) es la vía más primitiva y el carácter anaeróbico es debido al hecho de que ninguna de las reacciones requiere la intervención de oxígeno. La vía glucolítica anaeróbica o de Embden-Meyerhoff

ocurre en el citoplasma y tiene fundamentalmente la capacidad de producir, a partir de una molécula de glucosa, ATP, NADH, piruvato y productos intermedios utilizables en diversos procesos de biosíntesis. A pesar de que la glucólisis anaerobia sólo contribuye al 5-10% de la producción de ATP en el corazón normal aeróbico, su producción tiene un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis del miocito (Lopaschuk, 1998).

La otra vía metabólica utilizada por el miocardio es la *fosforilación oxidativa*, en la que el piruvato obtenido en la glucólisis anaeróbica penetra libremente al interior de las mitocondrias, donde, previa transformación en acetil-CoA (gracias al complejo piruvato-deshidrogenasa), entra en el ciclo de Krebs (figura I.2).

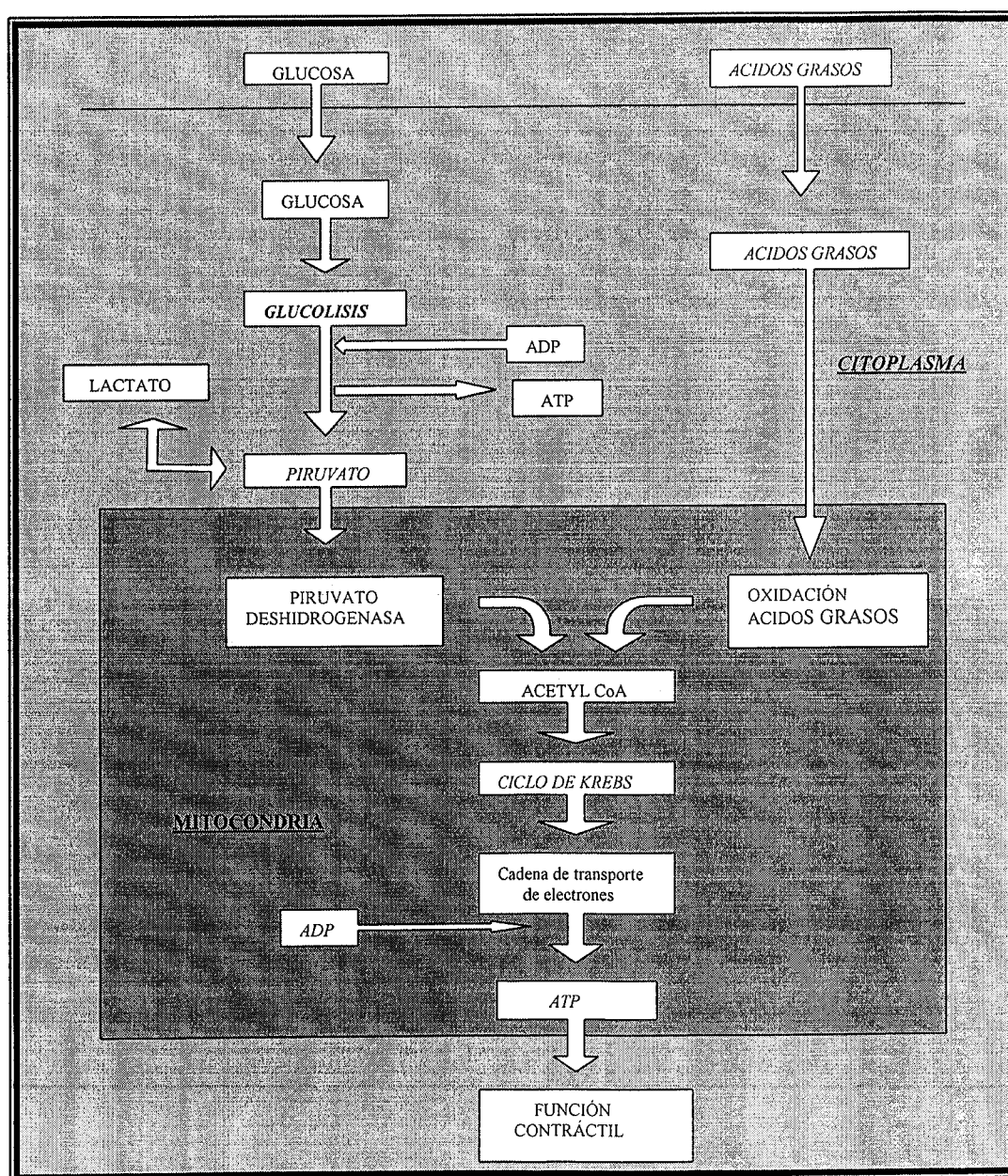
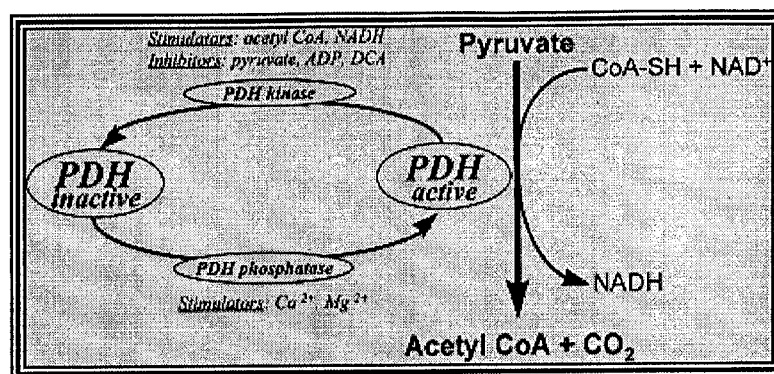


Figura I.2.- Esquema del metabolismo celular.

El complejo piruvato-deshidrogenasa representa el escalón limitante en la oxidación de la glucosa y es regulado estrictamente por un proceso quinasa/fosfatasa (inactivación/activación), sujeto a regulación alostérica. El acetilCoA y/o sus equivalentes reducidos generados por la oxidación de los ácidos grasos son capaces de reducir la actividad de la piruvato-deshidrogenasa a través de este mecanismo (Lopaschuk, 1999), mientras que dicha actividad está aumentada por la supresión de la oxidación de los ácidos grasos o por inhibición de la carnitina palmitoil transferasa (CPT-I), una enzima clave en la oxidación de los ácidos grasos (Lopaschuk *et al.*, 1994).



**Figura I.3.-** Regulación de la piruvato-deshidrogenasa (PDH). (Lopaschuk *et al.*, 1994).

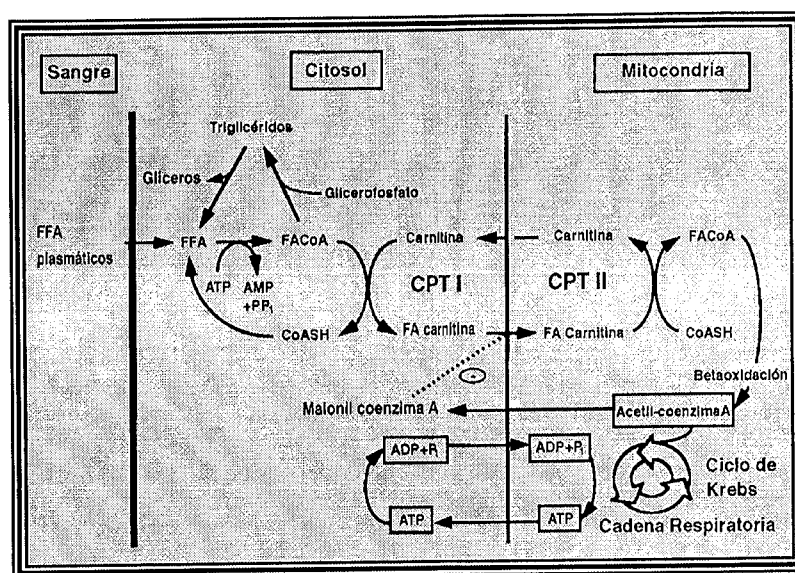
El metabolismo anaeróbico tiene una utilidad limitada para producir fosfatos de alta energía y resulta insuficiente para mantener la función cardíaca. Por cada mol de glucosa metabolizada en condiciones aeróbicas se obtienen 36 moles de ATP en contraste con solo 2 moles de ATP que se forman con metabolismo anaeróbico (Katz, 1977).

### 1.2.- Metabolismo de los ácidos grasos.-

Los ácidos grasos, esterificados como triglicéridos, representan la principal reserva corporal de combustible. Debido a que la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga libera más de 6 veces la cantidad de energía que una masa igual de glucosa, y debido a que la glucosa interviene en el metabolismo de formación de los ácidos grasos, éstos representan el combustible sustancial, si no el predominante, para la respiración en el músculo cardíaco, constituyendo la otra fuente principal de acetyl-CoA mitocondrial (Taegtmeier, 1994).

Los ácidos grasos son activados en el citoplasma para la formación de acil-CoA. Estos compuestos serán, posteriormente, transformados en el proceso de la  $\beta$ -oxidación. Este proceso es intramitocondrial, pero los acil-CoA no atraviesan la membrana mitocondrial interna. Para este fin es necesaria la intervención de la carnitina (carnitina/acyl-

carnitina translocasa y 2 carnitina-palmitoyl-transferasa). En la  $\beta$ -oxidación, los acil-CoA son transformados en acetil-CoA que entran en el ciclo de Krebs, un ciclo que, en esencia, produce  $H^+$ ,  $CO_2$ ,  $H_2O$  y ATP. La oxidación de los ácidos grasos también está estrictamente controlada, representando la translocación de los ácidos grasos dentro de la mitocondria un punto importante en su regulación. La carnitina-palmitoyl-transferasa es poderosamente inhibida por malonylCoA. Tan importante es que, durante la isquemia, el control del malonyl-CoA sobre la oxidación de los ácidos grasos disminuye, resultando en un incremento en la contribución de la oxidación de los ácidos grasos en la producción total de energía.



**Figura I.4.-**  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos. CPT: Carnitina-palmitoil-transferasa; FFA: ácidos grasos libres (Taegtmeier, 1994).

En esta fase común para la glucosa y los ácidos grasos, los  $H^+$  originados se acoplan en la cadena de transporte electrónico con el  $O_2$  para formar  $H_2O$  y liberar la energía necesaria para la síntesis de ATP a partir del ADP. También los  $H^+$  que se producen en el citoplasma son oxidados en el sistema de transporte de electrones. Los NADH citoplásmicos no pasan libremente la membrana mitocondrial y necesitan del ciclo malato-aspartato. El ATP que se forma no atraviesa la membrana mitocondrial interna, y su transporte del interior al exterior de la mitocondria es regulado por una enzima: la adenín nucleótido translocasa. En el citoplasma, el ATP se hidroliza a ADP, proporcionando la energía necesaria para las funciones celulares. El ADP es transportado de nuevo a las

mitocondrias, completando el ciclo. De este esquema se evidencia la importancia del oxígeno para mantener los diferentes procesos intramitocondriales (Ferrari, 1992).

A pesar de que los ácidos grasos constituyen el más importante sustrato miocárdio, produciéndose de su oxidación numerosas moléculas de ATP, se requiere una mayor cantidad de oxígeno que en el metabolismo de la glucosa. Cerca del 75% del oxígeno consumido por el miocardio es utilizado para la oxidación mitocondrial. Ello no conduce a una situación demasiado favorable, en especial durante y después de un episodio isquémico, en la que, como veremos más adelante, se produce una acumulación de productos derivados de la glucólisis, que requieren un gran consumo de ATP para su “aclaramiento”; consumo de energía con un fin “no contráctil”, lo que disminuye su eficiencia cardíaca (Lopaschuk, 1998).

El número de moles de ATP producidos por mol de carbono oxidado es aproximadamente un 29% mayor para los ácidos grasos en relación con la glucosa, pero el número de moles de ATP producidos por mol de oxígeno consumido es un 12 % mayor para la glucosa en relación con la oxidación de los ácidos grasos (tabla I.1). Cuando el oxígeno es abundante, como ocurre en condiciones de perfusión normal, es más eficiente para el miocardio aeróbico utilizar y oxidar los ácidos grasos libres; pero durante la isquemia, la glucosa pasa a ser mejor sustituto para el miocardio que los ácidos grasos.

SUSTRATO	CONSUMO DE O <sub>2</sub>	PRODUCCION ATP	O <sub>2</sub> x CADA ATP
Glucosa	5	32	0,156
Ácidos grasos	26	147	0,177
Lactato	-	2	-

**Tabla I.1.-** Producción energética.

### ***1.3.- La mitocondria.-***

La mitocondria ocupa el 30% del volumen de la célula cardíaca, lo que refleja la importancia de estos orgánulos para el normal funcionamiento del músculo cardíaco. Entre sus funciones más importantes encontramos la fosforilación oxidativa y producción de ATP y la regulación homeostática del calcio. Estos dos procedimientos están conducidos por la misma fuente de energía: el gradiente electroquímico de H<sup>+</sup>, generado por el transporte de electrones al interior de la membrana mitocondrial (Ferrari *et al.*, 1998).

Las mitocondrias cardíacas pueden tener formas diversas, aunque son en general elipsoidales, de aproximadamente 2-3 micras de largo por 1-1,5 micras de ancho. Están intercaladas entre las miofibrillas y, en general, se encuentran en la vecindad de los túbulos "T". Esta localización de las mitocondrias es óptima porque, por un lado están próximas al espacio extracelular (mediante el túbulo "T") y, por tanto, a la fuente de metabolitos, y por otro, a las estructuras que requieren ATP para su funcionamiento: los miofilamentos. Las mitocondrias se caracterizan por la presencia de dos membranas: una externa, que es lisa, elástica y no presenta pliegues, y otra interna que se invagina sobre sí misma formando unas protuberancias en el espacio mitocondrial interno, llamadas crestas (Flameng *et al.*, 1991).

Las crestas tienen la finalidad de aumentar la superficie de la membrana interna, donde ocurren los procesos de oxido-reducción y la fosforilación oxidativa. El número de crestas está en relación con la actividad respiratoria del tejido de origen, por lo tanto, en las mitocondrias cardíacas (tejido de elevada actividad respiratoria) las crestas son numerosas. Además, las crestas sufren notables cambios de configuración, según el estado respiratorio de las mitocondrias. La membrana mitocondrial interna (y por lo tanto las crestas) contiene al menos 60 proteínas biológicamente activas, inmersas en un sistema de fosfolípidos (70% de proteínas, 30% de lípidos). Estas proteínas comprenden: las enzimas de la cadena respiratoria, las enzimas relacionadas con la síntesis del ATP, diferentes dehidrogenasas y las enzimas relacionadas con el transporte de diferentes sustancias al interior de las mitocondrias.

Dado el alto *turnover* energético del músculo cardíaco, el volumen ocupado por las mitocondrias en las células cardíacas es mayor que en otros tejidos. Así mismo existe una relación lineal entre la masa mitocondrial por un lado y el consumo de oxígeno miocárdico por el otro. No sorprende que el daño estructural y funcional de la mitocondria sea una de las principales consecuencias deletéreas de la isquemia miocárdica (Ferrari, 1996), de ahí que en nuestro estudio nos hayamos centrado en su análisis.

## **2.-ISQUEMIA MIOCÁRDICA.-**

La isquemia miocárdica se define como un aporte de oxígeno arterial insuficiente para responder a las demandas metabólicas del tejido cardíaco (Jennings, 1970).

Aunque en el origen de este fenómeno se observa casi siempre un obstáculo al flujo coronario que conlleva una falta de perfusión del miocardio, las secuelas y gravedad

potenciales de la isquemia no dependen tanto del propio fenómeno hemodinámico como de las lesiones tisulares derivadas. La interrupción del flujo coronario conlleva, por un lado, una privación de oxígeno y sustratos metabólicos, y por otro, un déficit en el drenaje venoso y linfático de los metabolitos tóxicos que se acumulan en el espacio extracelular del área isquémica. Estos trastornos tendrán graves consecuencias a diferentes niveles: a nivel contráctil, metabólico, ultraestructural, iónico y electrofisiológico. Incluso a los pocos segundos de iniciada la isquemia se van a producir alteraciones a nivel metabólico que, en primer lugar, conducirán a alteraciones a nivel de la actividad eléctrica y la función contráctil de la célula cardíaca y que, cuando se prolonguen en el tiempo, comprometerán la propia supervivencia celular.

Los determinantes del daño por isquemia en el corazón incluyen la severidad, la duración y la secuencia temporal de la isquemia; así como del entorno físico y metabólico (hipotermia vs normotermia; contenido miocárdico de glucógeno; altas o bajas concentraciones de ácidos grasos libres). Cada uno de estos factores puede ser modificado para alterar la extensión de las consecuencias deletéreas de la isquemia (Taegtmeyer *et al.*, 1998).

Así podemos observar que la obstrucción completa del flujo condiciona una deplección de los fosfatos de alta energía, acumulación de lactato y acinesia, que si persiste, conducirá a necrosis del tejido. Sin embargo, si la reducción del flujo es moderada (20-60%) observaremos una disminución del consumo miocárdico de oxígeno (10-50%), un incremento transitorio de la glucólisis anaerobia (deplección de glucógeno y producción de lactato), una menor proporción de oxidación de ácidos grasos y una disfunción contráctil moderada o severa. Dependiendo de las demandas metabólicas, estas moderadas reducciones en el flujo no conducirán necesariamente a un daño tisular irreversible (Stanley *et al.*, 1997).

### ***2.1.Efectos de la isquemia sobre la contractilidad.-***

Hace más de 60 años que Tennant y Wiggers (1935) describieron, en un trabajo ya clásico de la Cardiología, la desaparición del acortamiento sistólico del miocardio isquémico tras un minuto de oclusión coronaria, para ser sustituido por una distensión pasiva, que retornaba a la normalidad tras restaurar el flujo sanguíneo. Desde entonces numerosos investigadores, incluido nuestro grupo, han observado que tras la interrupción del flujo coronario, la región isquémica pierde casi inmediatamente su función contráctil, apareciendo en su lugar una protusión o abombamiento sistólico (Printzmetal *et al.*, 1949; Theroux *et al.*, 1974; Pallarés, 1996). Este abombamiento o “bulbing” sistólico es debido a la incapacidad



de la zona isquémica para soportar la presión intraventricular generada por el miocardio normalmente perfundido. Simultáneamente, en la zona de miocardio no sometida a isquemia, se produce un incremento de la contractilidad segmentaria probablemente como mecanismo compensador de la disfunción que se está produciendo en la zona isquémica (Ohtsuka *et al.*, 1990).

Se podría pensar que este rápido deterioro de la función contráctil era debido a la detención del metabolismo oxidativo y al descenso consiguiente de la producción de ATP. Sin embargo se ha observado que durante el inicio de la isquemia, las reservas miocárdicas de fosfatos de alta energía permanecen intactas y, a pesar de ello, la función contráctil está ya deprimida (Braasch *et al.*, 1968). Posteriormente se puso de manifiesto que niveles elevados de fósforo inorgánico tienen un efecto depresor de la sensibilidad de las miofibrillas al calcio, lo que ha permitido descubrir la causa de la disfunción en las fases iniciales de la isquemia (Allen y Orchard, 1987).

Cuando la isquemia se prolonga en el tiempo, a ese defecto depresor del fósforo, se le unen el descenso de los niveles de ATP y una serie de alteraciones metabólicas e iónicas que describiremos posteriormente, principalmente la acidosis celular y el aumento de los niveles de calcio intracelular que alteran la interacción calcio-troponina inductora de la contracción (Katz y Hecht, 1969). A medida que la lesión isquémica progresa, otros mecanismos se van añadiendo al aumento de fósforo inorgánico, incluido el descenso de los niveles de ATP, que al llegar a ser extremadamente bajos en fases avanzadas favorecen la formación de enlaces estables entre los filamentos y la aparición de la contractura isquémica (García-dorado y Fernández, 1988).

La restauración completa de la función contráctil se alcanza cuando los niveles de ATP se normalizan y desaparece el exceso de ADP. No obstante, otros factores, incluyendo anomalías del flujo del calcio o alteraciones del metabolismo de los ácidos grasos libres, pueden ser responsables de la prolongada anomalía en la contracción tras la isquemia (Peng *et al.*, 1986). Existen evidencias de que las alteraciones pueden persistir en el miocito tras varios días de un episodio isquémico, a pesar de una adecuada perfusión. Anomalías tales como la deplección de glucógeno y ATP, edema mitocondrial y agrupamiento de la cromatina nuclear, se correlacionan con el empeoramiento de la función miocárdica tras la isquemia (*miocardio aturdido*) (Knight y Fox., 1995).

## 2.2. Efectos de la isquemia sobre el metabolismo.-

Es conveniente recordar que la función contráctil del corazón depende primordialmente del suministro de ATP por parte de las mitocondrias (fosforilación oxidativa). Esta importante vía metabólica está controlada principalmente por la disponibilidad de ADP, NADH, piruvato y ácidos grasos, además de la activación del ciclo de Krebs por  $\text{Ca}^{++}$  (Moreno-Sanchez y Torres-Marquez, 1991). La ausencia de oxígeno y sustratos oxidables durante la isquemia provoca la disminución de la actividad de la cadena respiratoria y, por ende, se reduce la síntesis de ATP.

La interrupción del flujo coronario provoca una disminución del aporte de oxígeno a nivel celular lo que conlleva una depresión de la vía aeróbica del metabolismo de la glucosa a través de la betaoxidación mitocondrial. En un intento de aumentar las fuentes energéticas, se produce una desviación hacia el metabolismo anaeróbico con activación de la glucogenólisis por acción, fundamentalmente, del AMPc (favorecida in vivo por estimulación simpática) a través de un aumento de la actividad de la enzima piruvato-cinasa. El aumento de la glucólisis anaerobia, insuficiente para cubrir las necesidades energéticas de la célula miocárdica, llega a multiplicar su ritmo en más de 20 veces durante el primer minuto de estado anaerobio, resultando en un gran aumento de la producción de piruvato y lactato (Hearse, 1980). Esta vía metabólica conduce a un descenso en el pH citosólico (que se estabiliza tras los primeros 10 minutos), la continuación del metabolismo anaerobio y la producción de una pequeña cantidad de ATP sin la utilización de oxígeno (Schwartz *et al.*, 1990). La producción de lactato ocurre, sin embargo, sólo en la fase precoz de la isquemia, bajo el control de enzimas citosólicas que son inhibidas por la acidosis.

A pesar de la disminución de la producción de ATP desde los primeros segundos de estado anaerobio, su concentración citoplasmática se mantiene gracias a la refosforilación de ADP, que se va produciendo mediante la utilización del radical fosfato (P) del creatin-fosfato en una reacción catalizada por la creatin-cinasa (CK).

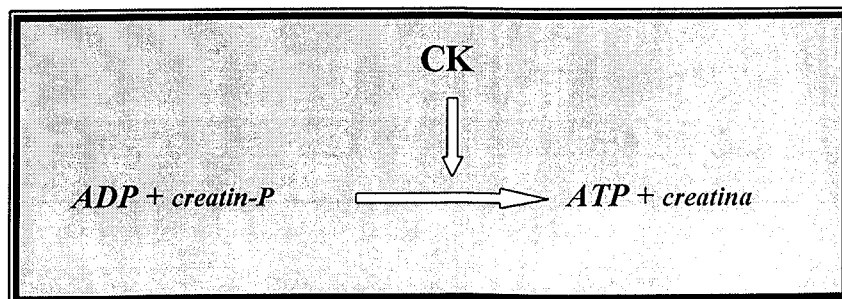


Figura I.4.- Síntesis de ATP a partir del ADP.

Ello conduce a una disminución de los niveles de fosfocreatina, hasta en un 40-60% en relación con los niveles basales (Camacho *et al.*, 1988). Los niveles de ATP permanecen estables en los momentos iniciales de la isquemia, sin observarse cambios significativos cuando la función contráctil ya se ha deprimido (Braasch *et al.*, 1968), y disminuyen en prácticamente un 50% a los 15 minutos de oclusión (si bien el grado de estos cambios varía en función de las variaciones intrínsecas entre los animales y las diferentes técnicas empleadas para su determinación). La caída de la concentración de ATP se acompaña de un incremento de la concentración de ADP y fósforo inorgánico, así como un aumento de AMP que se metaboliza por la vía adenosina-hipoxantina (Jennings *et al.*, 1987). La degradación de los nucleósidos da lugar a adenosina y a su metabolito hipoxantina que, a su vez, es transformado en xantina por la acción de la enzima xantino-oxidasa, con capacidad para la producción de radicales libres de Oxígeno (anión superóxido) (Bolli *et al.*, 1988a).

A medida que se prolonga la isquemia, se produce un mayor descenso en el pH intracelular y un progresivo incremento en la presión de reposo y el “agarrotamiento” miocárdico. El incremento precoz del lactato es seguido por un descenso junto con una mayor disminución del contenido de ATP y creatinfosfato. Ello sugiere que tras un estímulo inicial de la glucólisis anaerobia, ésta es inhibida por la acidosis intracelular severa. En este momento, profundos cambios iónicos ocurren, como la deplección de potasio y magnesio intracelular y un aumento del sodio y calcio citosólicos, como veremos posteriormente.

En isquemias inferiores a 20 minutos, y tras la reperfusión, los niveles de fosfocreatina, fósforo inorgánico y pH se recuperan en pocos minutos, mientras que la normalización del ATP a sus niveles basales es más lenta (Camacho *et al.*, 1988).

Se ha objetivado durante la isquemia una deceleración de la Beta-oxidación de los ácidos grasos, lo cual produce una disminución de la carnitina libre y un acúmulo extramitocondrial de los productos intermediarios del metabolismo lipídico, como acil-coenzima A y acil-carnitina (Reeves *et al.*, 1989). La acil-carnitina inhibe la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcoplásmico y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  del sarcolema, así como la bomba de  $\text{Na}^+$ , pudiendo activar también los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  e incrementar los niveles de AMP cíclico. Estas acciones pueden conducir a una sobrecarga celular de calcio, consumo de oxígeno y provocación de arritmias (Apstein, 1999). Este aumento de la concentración de acil-coenzima A conlleva 4 efectos importantes: a) favorece la síntesis y acumulación de triglicéridos en el citoplasma, en combinación con el aumento concomitante de la síntesis de glicerol (producto secundario de la glucólisis); b) disminuye la actividad de la adenin-nucleótido-translocasa, contribuyendo así a la disminución de los niveles de fosfocreatina y

ATP; c) disminuye la esterificación de los ácidos grasos libres y por tanto su captación, a pesar de lo cual la concentración de éstos aumenta finalmente como consecuencia de la lipólisis, que produce la activación de la fosfolipasa A<sub>2</sub> por el aumento del nivel de Ca<sup>++</sup> citoplasmático; y d) inhibición de la oxidación de los carbohidratos, agravando así la acidosis celular por el lactato y la acumulación de H<sup>+</sup> y la sobrecarga de calcio. Schelbert, mediante técnicas de tomografía por emisión de positrones, demuestra una prolongada anomalía en el aclaramiento del palmitato marcado-C<sup>11</sup> en el miocardio postisquémico, sugiriendo deterioro del metabolismo de ácidos grasos (Schelbert y Buxton, 1988).

Tras un infarto de miocardio, cirugía cardíaca o tras un episodio de isquemia-reperusión, se produce un aumento en los niveles circulantes de ácidos grasos (Lopaschuk *et al.*, 1994). Los efectos deletéreos, a nivel mecánico y electrofisiológico, de esta alta concentración en los niveles plasmáticos de ácidos grasos son conocidos hace más de 20 años (Olivier *et al.*, 1975). Estos altos niveles han demostrado también aumentar la severidad del daño isquémico en un gran número de modelos animales experimentales de isquemia cardíaca, así como una depresión de la función mecánica durante la fase de reperusión (Lopaschuk, 1998).

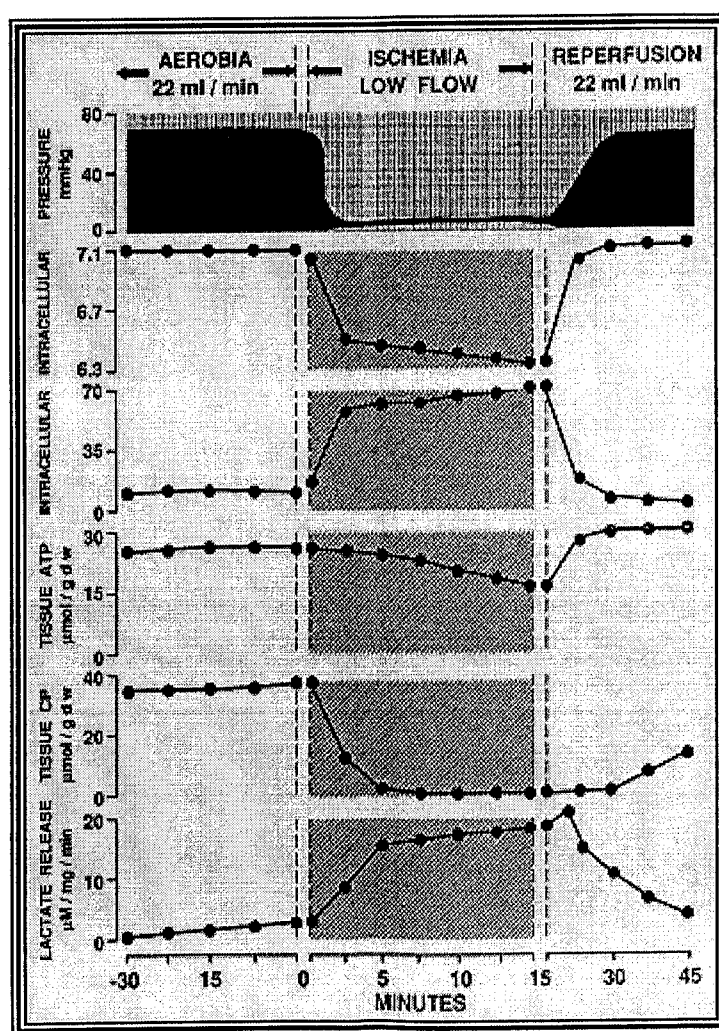
La degradación de los fosfolípidos puede dañar el sarcolema por sí misma o a través de un aumento de la concentración de lisofosfolípidos, productos de la fragmentación de los fosfolípidos con propiedades anfipáticas que pueden incluirse en las membranas celulares alterando su estructura. Existen otros mecanismos capaces de dañar los fosfolípidos de la membrana durante el episodio de la isquemia, destacando entre ellos, la acción de los radicales libres de Oxígeno. Todos estos fenómenos contribuyen a desorganizar y debilitar la estructura de las membranas y favorecen los desequilibrios iónicos y la pérdida de la homeostasis celular.

El metabolismo proteico, a pesar de la detención de la síntesis y degradación proteica, desempeña un papel menor en la génesis del daño por la isquemia. Sólo en fases avanzadas de la misma, con acidosis celular y aumento de la concentración citoplasmática de Ca<sup>++</sup> importantes, se produce activación de las enzimas lisosomiales y proteólisis (Bolli *et al.*, 1983).

La isquemia también está asociada a una liberación de catecolaminas, lo que empeora la situación metabólica al activar la lipólisis del tejido adiposo e inhibir la secreción de insulina, aumentando así la velocidad de la glucólisis anaeróbica y disminuyendo la relación plasmática glucosa/ácidos grasos libre (Knight y Fox, 1995).

Algunos investigadores han observado la liberación de creatinquinasa y de su isoenzima CK-MB en el miocardio aturdido por breves períodos de isquemia, con elevación significativa en sangre periférica y en ausencia de necrosis celular (Heyndrikx *et al.*, 1985; Capdevilla *et al.*, 2001).

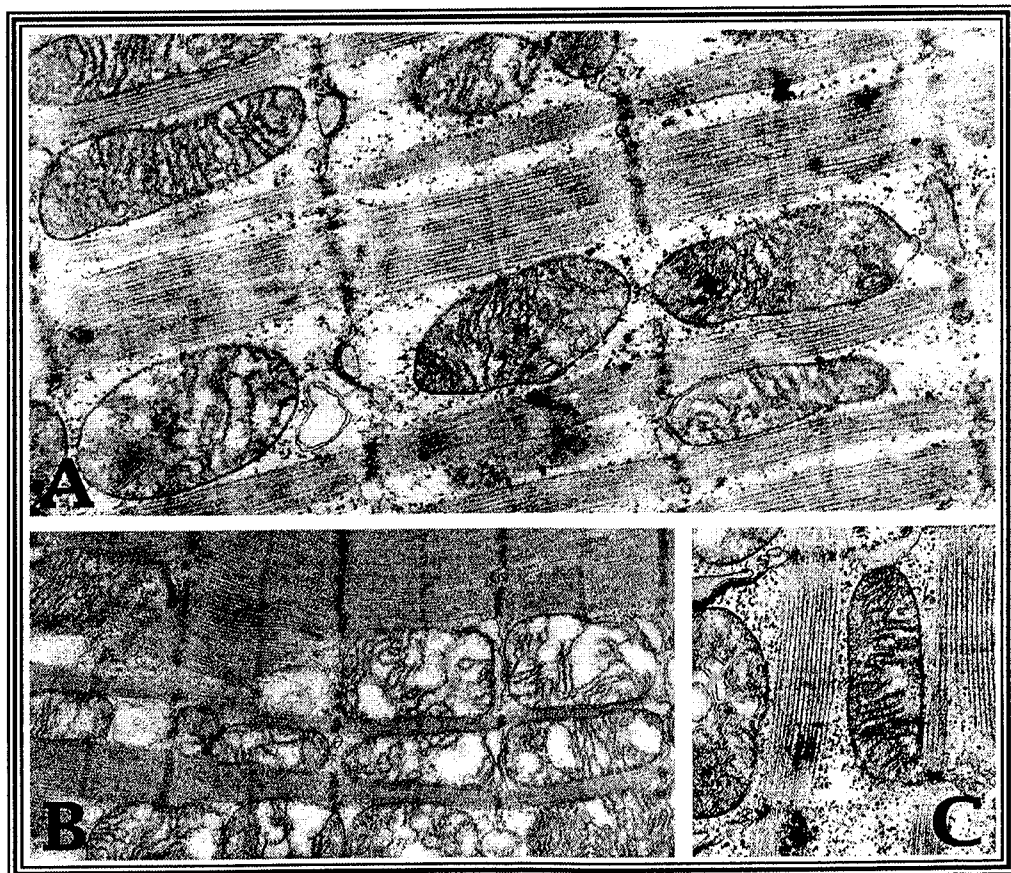
Así pues, la isquemia no solo origina un déficit de oxígeno y de sustratos para la producción de energía, sino que conlleva importantes alteraciones iónicas y acúmulo de productos resultantes del metabolismo celular (fosfolípidos, lactatos,...), que constituyen el sustrato de las alteraciones que se producen a nivel contráctil y electrofisiológico, y que, de prolongarse en el tiempo, conducirán a la muerte celular.



**Figura I.5.-** Cambios en el pH intracelular, fosfato inorgánico (Pi), ATP y fosfocreatina detectados mediante resonancia magnética nuclear durante un episodio corto de isquemia en el corazón aislado de rata (Ferrari *et al.*, 1998).

### 2.3. Alteraciones ultraestructurales.—

En series experimentales previas realizadas en nuestro laboratorio se ha observado en el tejido sometido a isquemias breves y repetidas (aparentemente íntegro en microscopía óptica y sin elevación enzimática que demuestre la presencia de necrosis) importantes alteraciones a nivel de la estructura mitocondrial, consistentes principalmente en un descenso de mitocondrias interfibrilares y en la densidad de la matriz con pérdida de gránulos mitocondriales, desorganización de crestas, vacuolización y disminución de su densidad numérica (Pomar *et al.*, 1995). Además se ha observado una gran proporción de mitocondrias fusionadas e hinchadas, con cambios de forma tendentes a esfericidad y que dan lugar a una densidad de volumen mitocondrial aumentada (figura I.6). En el núcleo se han observado cambios en la disposición de la cromatina, que pasa de una situación de predominio perinuclear (interfase) a una notable dispersión de dicha cromatina, así como de los acúmulos intranucleares. Esta situación refleja probablemente la intensa actividad que se está desarrollando en los núcleos a fin de enviar las órdenes necesarias para iniciar los procesos de restauración del daño mitocondrial provocado por la isquemia miocárdica.



**Figura I.6.-** Microfotografía electrónica de una sección de tejido miocárdico de perro sometido a isquemia (A: zona control; B: zona isquémica). Obsérvese que en la zona isquémica además de mitocondrias dañadas con aumento de su área (Figura B) también existe mitocondrias normales y procesos de vacuolización (Figura C, flecha). Las imágenes han sido tomadas entre 7000 y 12000X.

La presencia de alteraciones del aparato mitocondrial ha sido observada por diferentes autores utilizando periodos de isquemia más prolongados. Greve *y cols.* (1990), después de ocluir durante 10 minutos la arteria descendente anterior en gatos con tórax abierto, observan también mitocondrias hinchadas y un aumento de la fragilidad del sarcolema. Jennings *y cols.* (1985), utilizando un modelo de isquemia única de 15 minutos en perros anestesiados y con tórax abierto y tras 20 minutos de reperfusión, no observaron alteraciones con respecto al control, al igual que Nicklas *y cols.* (1985) con oclusiones repetidas de 5 minutos.

Estas diferencias entre los diversos autores podría estar justificada por los diferentes tiempos de reperfusión utilizados. Basuk *y cols.* (1986) estudian la ultraestructura celular en un primer grupo de perros después de una oclusión de 10 minutos de la arteria circunfleja y aprecian una ligera marginación de la cromatina nuclear junto a una ausencia de gránulos intramitocondriales y pérdida parcial de glicógeno; sin embargo en un segundo grupo con una oclusión de 10 minutos y 20 minutos de reperfusión observan como las alteraciones están totalmente recuperadas; y tampoco encuentran alteraciones en un tercer grupo tras 4 oclusiones separadas de 20 minutos de reperfusión entre ellas. Estos hallazgos refuerzan las experiencias de Wynsen (1991) sobre la importancia de los períodos de reperfusión en la aparición de disfunción postisquémica.

Otros cambios objetivados durante la isquemia hacen referencia a una rápida desaparición de los gránulos de glucógeno del sarcoplasma en los minutos iniciales de la isquemia para desaparecer por completo a los 4 minutos (Heggtveit, 1969). En el compartimento extracelular el único cambio notable y precoz es la tumefacción edematosa de las células endoteliales de los capilares, junto a la presencia de edema intersticial que ha sido interpretado como el resultado de una mayor permeabilidad microvascular a consecuencia de la retracción de los márgenes laterales de las células endoteliales de los vasos, proceso que ensancha los espacios intercelulares (Pilati, 1990).

Una isquemia más prolongada en el tiempo condiciona alteraciones a nivel de las miofibrillas, dehiscencia de los discos intercalados, así como la ruptura de la membrana plasmática con pérdida de las organelas hacia el espacio intracelular (necrosis).

Tanto las alteraciones metabólicas como ultraestructurales que se producen durante el periodo isquémico pueden recuperarse tras la restauración del flujo coronario, dependiendo del tiempo de isquemia así como de la reperfusión.

Autor	Animal	Oclusión	Nº	Isq	Rep	Núcleo	Citoplasma	Mitocondrias	Miofibrillas
Kloner et al. (1983)	Perro	D.A.	1	15'		Agregación cromatina	Edema Interfibrilar	>volumen Aclaramiento matriz	Relajadas
Kloner et al. (1983)	Perro	D.A.	1	15'	3 D	Disminución Glicógeno	Vacuolización y edema	>Volumen Disminución nº	
Jennings et al. (1985)	Perro	A.C.	1	15'		Agregación Cromatina	Menor densidad Lipofucsina	>Volumen Desorganización crestas	Relajadas Alargamiento Bandas I >Volumen
Nicklas et al. (1985)	Perro	D.A.	16	5'	10'	Agregación Cromatina			
Basuk et al. (1986)	Perro	A.C.	1	10'		Marginación Cromatina	Disminuye Glucógeno	<Gránulos intramitocondriales	
Zhao et al. (1990)	Perro	D.A.	12	5'	10'	Marginación Cromatina	Edema Interfibrilar	>Volumen	Alargamiento Bandas I
Greve et al. (1991)	Gato	D.A.	1	10'			Menor densidad	>Volumen	
Pallarés et al. (1995)	Perro	D.A.	20	2'	3'	Aclaramiento Cromatina	Aparece Lipofucsina	>Volumen	

**Tabla I.2.-** Efectos de la isquemia/reperfusión sobre la ultraestructura celular del miocardio en diferentes modelos animales. D.A.: Arteria descendente anterior; A.C.: Arteria circunfleja; Isq: Tiempo de isquemia; Rep: Tiempo de reperfusión.

#### 2.4. Alteraciones iónicas y del equilibrio ácido-base.-

La acidificación del medio intracelular durante la isquemia, combinada con la deplección energética, determina rápidamente una inhibición de casi todos los mecanismos enzimáticos de la célula, produciéndose numerosas alteraciones iónicas. Más concretamente desaparece la función de los "sistemas transmembrana de intercambio iónico", especialmente los ATP-dependientes, y manteniéndose sólo los movimientos iónicos pasivos.

Homeostasis del  $Na^+$ . La paralización de la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa produce un aumento de la concentración intracelular de  $Na^+$ . En condiciones normales, este aumento se acompañaría de un aumento de la concentración citoplasmática de  $Ca^{++}$  por inversión de los intercambiadores  $Na^+/Ca^{++}$  del sarcolema; sin embargo, durante la isquemia la importancia de este mecanismo es mucho menor por inhibición de dichos intercambiadores en presencia de acidosis y por concentraciones bajas de ATP (Guarnieri, 1985). El aumento de la concentración de  $Na^+$  se produce lentamente durante la primera media hora de estado anaerobio, y se acompaña de aumento del contenido celular de  $H_2O$ . El aumento del volumen celular puede causar por sí mismo una lesión severa del sarcolema, que parece manifestarse



inicialmente por disrupción de las conexiones sarcolema-túbulos T y la consiguiente aparición de vesículas subsarcolemales localizadas (Seenberg *et al.*, 1985).

Homeostasis del  $Ca^{++}$ . Los movimientos de los iones calcio también sufren graves perturbaciones, de mecanismo complejo y aún no bien conocido. Parece, sin embargo, que estas alteraciones son fundamentales puesto que el calcio es un factor esencial para la contractilidad del miocito y su regulación enzimática, actuando como mensajero en un gran número de procesos celulares que son puestos en marcha por un aumento de la concentración citoplásmica de este ión. Durante la isquemia su concentración aumenta lentamente, manteniéndose prácticamente normal durante los primeros 15-20 minutos. Dicho aumento se debe fundamentalmente a la incapacidad del retículo sarcoplásmico para captarlo, en contra del gradiente citoplasma-retículo, mediante la correspondencia ATPasa (Carafoli y Penniston, 1986). Peng y cols. (1986) refieren que el acúmulo de  $Ca^{++}$  intracelular observado en el tejido miocárdico isquémico y posteriormente reperfundido, estaba en relación inversa a la producción de ATP mitocondrial. La paralización de la bomba sarcolemal de  $Ca^{++}$ , de escasa capacidad aunque de alta sensibilidad (dedicada al ajuste fino de la concentración de  $Ca^{++}$ ) y la inversión de los mucho más capaces intercambiadores  $Na^+/Ca^{++}$  desempeñan un papel menor. En principio, la elevación considerable de la concentración de  $Ca^{++}$  en el citosol es debida fundamentalmente a la liberación de grandes cantidades de este ión que se almacena en el retículo sarcoplásmico. El trifosfato de inositol ( $IP^3$ ), producido por la hidrólisis del fosfolípido de membrana bifosfato de fosfatidilinositol por acción de la fosfolipasa C, es el responsable de la liberación de calcio a partir del retículo sarcoplásmico, al activar un canal de calcio situado en la membrana del retículo. Esta liberación aumenta con el descenso del pH y el aumento de la concentración de ADP (generado por el catabolismo de las reservas de ATP que no puede ser refosforilado en ausencia de metabolismo oxidativo). Las mitocondrias son capaces de achicar enormes cantidades de  $Ca^{++}$  durante la isquemia, gracias a un transportador monoiónico capaz de introducir este ión a favor del gradiente eléctrico citoplasma-mitocondria. Sin embargo, la captación de  $Ca^{++}$  por las mitocondrias se ve entorpecida por el aumento de la concentración de  $Na^+$  y por la acidosis, debido a la existencia de intercambiadores  $Na^+/Ca^{++}$  y  $Na^+/H^+$  en la pared mitocondrial. En fases avanzadas de la lesión isquémica, el  $Ca^{++}$  puede entrar en la célula por rutas anormales a través del sarcolema y discos intercalares.

Medidas del  $Ca^{++}$  intracelular durante la isquemia han mostrado que el descenso precoz en la fuerza contráctil no es debida a un tránsito anormal del  $Ca^{++}$ , sino más bien a una alteración en la sensibilidad del  $Ca^{++}$  de las proteínas contráctiles (Lee y Allen, 1992). Ha sido largamente reconocido que la sobrecarga intracelular de  $Ca^{++}$  conduce a arritmias,

fallo contráctil y finalmente, cuando supera un determinado umbral, muerte celular (Katz y Reuter, 1979).

Homeostasis del pH. La isquemia conduce a un importante incremento de la glucólisis en relación con la oxidación de la glucosa, resultando de ello una hidrólisis anaeróbica de ATP y la producción de un exceso de protones citosólicos. Ello, unido a la disminución del flujo coronario condiciona la acumulación de protones. Así mismo el aumento del nivel de NAD reducido (NADH) y de las concentraciones de metabolitos intermediarios de la vía glucolítica y del metabolismo de los ácidos grasos conduce a la acidosis celular, a la que también contribuye, aunque en menor medida, el aumento de la  $p\text{CO}_2$  por la detención de la respiración (Hearse, 1980).

Este exceso de protones es intercambiado por otros cationes, y ello conduce a un incremento en el exceso de calcio intracelular. La necesidad de usar ATP para restablecer la homeostasis de  $\text{H}^+$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{++}$  conduce a una disminución de la eficiencia cardíaca.

Los efectos iniciales de la acidosis pueden ser considerados como una respuesta adaptativa, al disminuir la fuerza de contracción de forma paralela a la reducción de la producción de energía. Sin embargo una acidosis severa y prolongada es deletérea y se ha demostrado que el grado de daño celular puede ser disminuido mediante inhibidores del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (amiloride, HOE 694) (Murphy *et al.*, 1991; Scholz *et al.*, 1993).

El exceso en la producción de  $\text{H}^+$  durante el metabolismo anaeróbico conlleva a una disfunción contráctil por mecanismos aún no completamente conocidos. Este efecto deletéreo en la contracción puede ser prevenido mediante la adición de drogas que promueven la oxidación del piruvato, reduciendo así su conversión a lactato ( dicloroacetato, ranolazina y probablemente también L-carnitina) (Taegtmeyer, 2000).

Homeostasis del  $\text{K}^+$ . Junto con los cambios anteriormente descritos en la cinética iónica, diversos estudios han observado una disminución significativa del  $\text{K}^+$  intracelular durante el estado anaeróbico, produciéndose un aumento a nivel extracelular (Harris, 1966). Se han descubierto la presencia de canales específicos para el  $\text{K}^+$  en la membrana sarcolemal que se activan cuando la concentración intracelular de ATP está severamente reducida (Noma, 1983).

INTRACELULARES	EXTRACELULARES
Aumento $Ca^{++}$ citoplasmático	Acumulación de $K^+$
Acumulo de $CO_2$ y $H^+$	Deplección ATP, AMP y CP
Aumento de lactatos	Liberación de catecolaminas
Aumento AMPc	Disminución NADH
Acumulación de lisofosfoglicéridos	Aumento de alfarreceptores

Tabla I.3.- Alteraciones del entorno celular durante la isquemia miocárdica.-

### 2.5. Alteraciones electrofisiológicas.-

Los principales efectos de la isquemia a nivel electrofisiológico están originados básicamente por las alteraciones que se producen a nivel iónico y metabólico, descritas anteriormente. Estas alteraciones dan lugar a un acortamiento en el potencial de acción y a una disminución de la velocidad de conducción, lo cual facilita el automatismo anormal. Sin embargo, la situación anaerobia favorece otros muchos mecanismos capaces de producir alteraciones electrofisiológicas como la aparición de postpotenciales en relación con el aumento de la concentración citoplasmática de  $Ca^{++}$  (Rosen *et al.*, 1987).

A los pocos segundos de la oclusión coronaria se observa una pérdida progresiva del potencial de reposo (despolarización) que, a los 10 minutos, puede alcanzar valores de -60 mV en el corazón del cerdo (Cinca *et al.*, 1980). A este trastorno se asocia un enlentecimiento y reducción de la amplitud de la fase de ascenso rápido del potencial transmembrana y un acortamiento de su duración. En fases más avanzadas el grado de despolarización llega a valores tales que la célula deviene inexcitable.

El acortamiento del potencial de acción es debido a la pérdida de  $K^+$  intracelular. Diversas investigaciones, utilizando electrodos sensibles al  $K^+$ , han demostrado que inmediatamente después de la isquemia se produce un acúmulo de  $K^+$  en el espacio extracelular debido a un aumento en su salida a causa de alteraciones de la permeabilidad al potasio (Weiss y Shine, 1981; Gaspardone *et al.*, 1986). La disminución de la velocidad de conducción está causada por una parte por la inhibición de los canales rápidos de  $Na^+$  con predominio de los canales lentos de  $Ca^{++}$  y de otra por la acumulación de AMP cíclico que se origina durante la isquemia. La aparición de zonas de conducción lenta junto con zonas de conducción normal facilita la aparición de arritmias por reentrada durante la isquemia miocárdica (Han, 1969).

La acumulación de metabolitos tóxicos y la activación del sistema simpático contribuiría a la producción de alteraciones electrofisiológicas en el tejido isquémico (Cinca, 1988).

### **2.6.- Otras alteraciones.-**

Se ha documentado que, en condiciones de isquemia, tiene lugar la liberación de sustancias susceptibles de agravar la isquemia local, como el tromboxano A<sub>2</sub>. Esta sustancia se produce, en parte, por acción de los radicales libres sobre los fosfolípidos de membrana y, en parte, por la activación plaquetaria como respuesta a la isquemia del miocardio.

El tromboxano A<sub>2</sub> posee varias propiedades que agravan la isquemia: es un potente agente vasoconstrictor por su acción sobre el músculo liso vascular; estimula la agregación plaquetaria y se sospecha además que interviene en la activación de los neutrófilos.

Por último, durante la isquemia grave y prolongada se observa una respuesta inflamatoria aguda caracterizada por la llegada y acumulación de neutrófilos polimorfonucleares en la zona isquémica del miocardio. Esta es la primera etapa de "limpieza" del tejido necrosado, necesaria para iniciar la cicatrización.

Se sospecha que la llegada de los neutrófilos agrava la lesión de isquemia, pues se ha demostrado en animales de experimentación que la deplección de polimorfonucleares circulantes se asocia a una disminución del tamaño del infarto, paralela a la menor infiltración del tejido por estas células (Ma *et al.*, 1992).

### **3.- LESIÓN POR REPERFUSIÓN.-**

Uno de los objetivos de la investigación cardiológica en los últimos años ha sido la búsqueda de procedimientos que permitan la restitución del flujo sanguíneo en las arterias coronarias que, al ocluirse, eran la causa de la isquemia; a este fenómeno se le llamó *reperusión*. Sin embargo, los estudios experimentales realizados en animales pusieron de manifiesto que, si bien la reperusión era capaz de salvar células miocárdicas en riesgo, también se producía una aceleración de cambios estructurales asociados con muerte celular durante esta fase (Herzog y Califf, 1995). Posteriormente estas observaciones pasaron del campo experimental al terreno de la cirugía cardíaca al observarse una disfunción contráctil del corazón tras el restablecimiento de la circulación normal después del uso de circulación

extracorpórea. Es a partir de estos hechos cuando Buckberg en 1983 establece por primera vez el concepto de *daño por reperfusión* para referirse a los diversos mecanismos que disminuyen el éxito e inclusive producen mayores alteraciones funcionales y estructurales durante el restablecimiento del flujo sanguíneo a través de una arteria coronaria previamente ocluida (Rosenckraz y Buckberg, 1983).

### **3.1. MECANISMOS DEL DAÑO POR REPERFUSIÓN.-**

Ya hemos visto anteriormente que la oclusión de una arteria coronaria provoca diversas alteraciones a nivel del metabolismo celular del tejido isquémico. Si dicha oclusión persiste, en ausencia de una adecuada circulación coronaria colateral, el déficit de reperfusión resultará de un daño estructural irreversible, y finalmente conducirá a las células miocárdicas a la muerte. Si la reperfusión ocurre antes de que el daño sea irreversible, la célula puede recuperarse. Sin embargo, en contra de lo esperado, algunas células miocárdicas sufren mayor daño a pesar de que el flujo coronario se haya restablecido. Las consecuencias de ello incluyen arritmias, miocardio aturdido y daño celular irreversible.

Este daño condicionado por la reperfusión ha sido motivo de múltiples investigaciones, habiéndose involucrado diferentes hipótesis entre las que destaca el aumento brusco del oxígeno y del calcio (Tellez *et al.*, 1996). A dichas hipótesis se les ha denominado "*paradojas*" pues resulta contradictorio que siendo el  $Ca^{++}$  y el oxígeno esenciales para la contracción del músculo cardíaco y la respiración celular respectivamente, sean dañinos para la célula durante la reperfusión. Ambos fenómenos son extraordinariamente parecidos, provocando cambios bioquímicos y ultraestructurales similares, si bien en el daño originado por el oxígeno la lesión celular es menos violenta y necesita un mayor tiempo de anoxia (30-40 minutos). A continuación describimos los diferentes mecanismos implicados en el daño por reperfusión.

#### **3.1.1. La paradoja del oxígeno: papel de los radicales libres.-**

*"Se denomina radicales libres a todas aquellas moléculas que tienen un electrón desapareado en su órbita más externa; esta circunstancia les confiere una capacidad de reacción extraordinariamente elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos con gran avidez, produciendo cambios en la conformación química o en la estructura de los elementos celulares que los hace incompatibles con la vida"* (Crystal y Ramon, 1992).

Entre los radicales libres con relevancia biológica, tienen peculiar importancia los que se derivan del oxígeno. Estos se producen de forma escalonada mediante la captación de 1, 2 ó 3 electrones por una molécula de  $O_2$ . La captación del primer electrón da lugar a la formación de superóxido ( $O_2^-$ ) que, al recibir un segundo electrón en presencia de  $H_2O$ , da lugar a la síntesis de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), compuesto oxidante que no es un radical libre, pero que captando un tercer electrón da lugar a la formación, siempre en presencia de  $H_2O$ , de grupos hidroxilo ( $OH^\cdot$ ), que además de ser un radical libre es un potente oxidante (McCord, 1984).

En condiciones normales, la mayor parte del oxígeno molecular es reducido por sistemas intracelulares tales como el complejo citocromo-oxidasa, localizado en la mitocondria (95% del  $O_2$ ). Sin embargo, una pequeña parte (3%) se escapa de esta vía metabólica, generándose productos tóxicos intermedios ( $O_2^-$ ,  $H_2O_2$ ,  $OH^\cdot$ ). Estas sustancias son neutralizadas rápidamente por enzimas endógenas con finalidad limpiadora (*scavengers*); el peróxido de hidrógeno es reducido por catalasas intracelulares mientras que la enzima superóxido dismutasa (SOD) detoxifica el radical superóxido mediante la reacción de la figura I.7 (Zarco, 1989). Otros antioxidantes endógenos como la vitamina E, ácido ascórbico y cisteína, también participan en estas acciones (Ferrari, 1990).

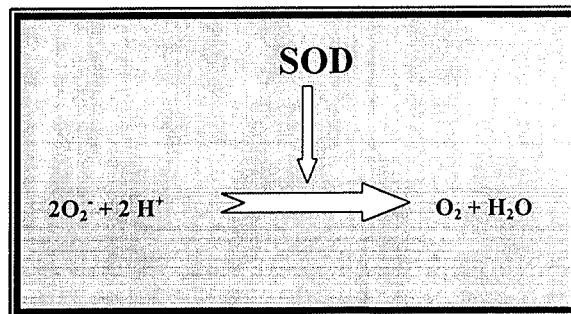


Figura I.7- Reacción de detoxificación del radical superóxido

De esta forma el miocardio aeróbico es capaz de manejar y sobrevivir a la continua producción de radicales libres derivados del oxígeno, gracias a la existencia de un delicado balance entre los sistemas celulares que generan oxidantes y aquellos que mantienen el mecanismo defensivo antioxidante.

Durante el proceso de isquemia-reperfusión se van a producir una serie de alteraciones metabólicas que van a condicionar, en último término, un aumento en la producción de radicales libres (Myers *et al.*, 1985; Zarco, 1989; Maupoil *et al.*, 1993):

- La reducción de los componentes de la cadena respiratoria como el citocromo  $c_1$ ;
- El aumento de AMP y de sus metabolitos (adenosina, inosina e hipoxantina) junto con la activación de la xantin- oxidasa durante la isquemia, por proteasas calcio-dependientes, constituye una fuente de aniones superóxido y peróxido de hidrógeno en la conversión de hipoxantina a xantina y su posterior metabolismo (figura I.8).

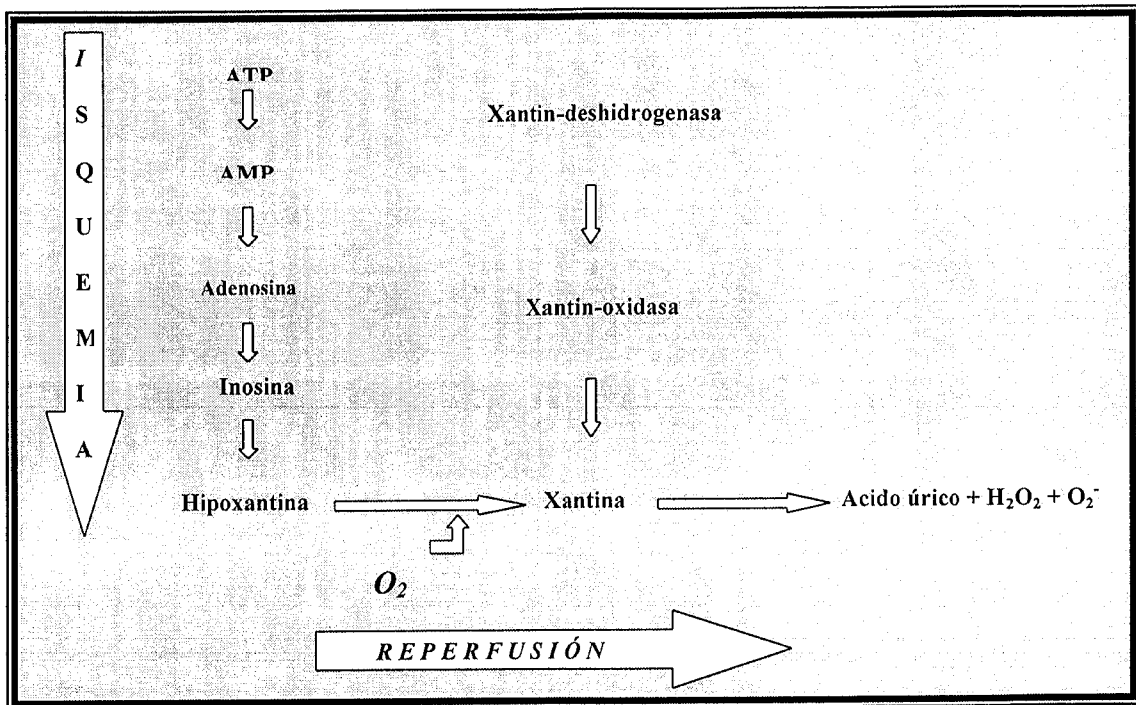


Figura I.8.- Metabolismo del ATP.

- las alteraciones del metabolismo de los lípidos, en especial la activación de fosfolipasas por la acumulación de  $Ca^{++}$  citosólico, puede inducir una liberación de ácido araquidónico, lo que estimula el metabolismo de este ácido y la formación concomitante de radicales libres por la ciclooxigenasa;
- la acumulación de equivalentes reductores durante la isquemia, como NADH, NADPH, flavoproteínas y el lactato, que pueden reaccionar entre ellos o con el oxígeno, induce la formación de radicales libres;

- Las catecolaminas liberadas durante la reperfusión podrían contribuir a la formación de radicales libres ya que, por auto-oxidación, generan electrones y compuestos de oxidación de radicales (adrenocromos);
- El proceso inflamatorio, y en especial la activación de los neutrófilos, constituye una fuente de radicales libres. Dichas sustancias pueden inducir la formación de factores quimiotácticos que provocan acúmulo de neutrófilos y su activación. La formación de agregados y el aumento de la permeabilidad vascular que favorece la aparición de edema, van a alterar la microcirculación y exacerbar el proceso isquémico;
- La lisis de hematies presentes en los capilares libera derivados del hierro que favorecen la formación de radicales libres;
- También se ha documentado la producción de radicales libres por la célula endotelial (Welbourn *et al.*, 1991).

El descenso progresivo de los sistemas de defensa encargados de la eliminación de los radicales libres contribuirá finalmente a una acumulación progresiva de estos compuestos. Se ha objetivado una disminución de la actividad SOD durante la hipoxia (50% de reducción en su actividad tras isquemia severa). Por otra parte, radicales oxigenados inactivan las enzimas encargadas de la degradación del peróxido de hidrógeno (glutathion peroxidasa y catalasa). A pesar de que las alteraciones de los sistemas de defensa enzimáticos no aparecen mas que tras períodos largos de isquemia y reperfusión, la disminución de eficacia de uno solo de sus componentes puede conducir a una perturbación de todas las defensas enzimáticas. El debilitamiento de los sistemas de defensa no enzimáticos, en especial los niveles de vitaminas E y C, podría igualmente participar en la acumulación de radicales libres.

Durante la reperfusión, la restauración de la disponibilidad de O<sub>2</sub> incrementa enormemente la formación de estos metabolitos tóxicos (Zarco, 1988). Mediante técnicas específicas para valorar la actividad de los radicales libres, se ha observado como en corazones sometidos a periodos breves de isquemia (15 minutos) se producen bajas concentraciones de radicales de O<sub>2</sub> durante la oclusión coronaria, con un aumento súbito en el momento de la reperfusión, un pico entre los 2-4 minutos posteriores para reducirse posteriormente de forma progresiva (Bolli, 1991). Utilizando este sistema se ha demostrado como la administración de productos intermedios reactivos del O<sub>2</sub> (como el peróxido de hidrógeno), la aplicación de sistemas generadores de radicales libres (hipoxantina más la



xantina oxidasa), o el empleo de promotores de la producción de radicales libres (como el hierro) desencadenan reducciones rápidas y graves de la función contráctil y/o cambios en diversos parámetros electrofisiológicos (McCord *et al.*, 1985; Pallandi *et al.*, 1987; Burton, 1988).

Los tres principales mecanismos de daño causado por los radicales libres son: la peroxidación de los lípidos, la oxidación de las proteínas y la ruptura del ADN (Ferez *et al.*, 1998). La peroxidación lipídica de las membranas produce un daño tanto estructural como funcional, debido a que condicionan un aumento en la permeabilidad de la membrana al calcio, lo que finalmente conlleva un incremento en el calcio intracelular.

Otro mecanismo lesional consecuencia de la reperfusión es la formación de endoperóxidos como resultado de la acción de los radicales libres derivados del O<sub>2</sub> (Peters y Footse, 1979). La generación de estos productos metabólicos favorece la producción de eicosanoides por la vía de la lipooxigenasa y la ciclooxigenasa (tromboxano A<sub>2</sub>, prostaciclina PGI<sub>2</sub> y el grupo de las prostaglandinas PGE y F). La consecuencia final de todas las secuencias metabólicas desencadenadas por la reperfusión tras un periodo de isquemia sería el inicio de fenómenos inflamatorios. Dicho proceso provocaría edema y acumulación de leucocitos que potenciarían los fenómenos de isquemia, cerrando el círculo vicioso (McCord, 1987).

Desde un punto de vista clínico existen estudios durante la realización de angioplastia coronaria transluminal que demuestran la presencia de marcadores indirectos de la producción de radicales libres a nivel del seno coronario, tales como el malonaldehído, ácido úrico y glutatión oxidado (De Scheerder *et al.*, 1991). También el stress oxidativo se va a poner de manifiesto en otras situaciones de la clínica diaria, como en la insuficiencia coronaria crónica y aguda, en la necrosis miocárdica y la trombolisis posterior así como en la protección del miocardio perioperatorio (Artigou *et al.*, 1993).

Aunque hay pocas dudas respecto a la generación de radicales libres de oxígeno durante la reperfusión, se mantienen ciertas posiciones de escepticismo con respecto a los beneficios clínicos de la limpieza de estos radicales libres como terapia adicional en el manejo de la reperfusión clínica. Algunos estudios han demostrado que la infusión de antioxidantes atenua la disfunción post-isquémica independientemente de si su administración fue iniciada antes de la isquemia o 1 minuto antes de la reperfusión; sin embargo su infusión tras un minuto de la reperfusión es inefectiva, sugiriendo que el daño crítico de los radicales libres ocurre en los primeros momentos de la reperfusión (Ferrari *et al.*, 1998).

### 3.1.2. La paradoja del calcio.-

Dicha paradoja, descrita por Zimmerman y Hulsmann (1966) pretende explicar el severo daño celular caracterizado por una marcada liberación de enzimas miocárdicas y formación de vesículas intracelulares, burbujas subsarcolémicas y las denominadas “*bandas de contracción*” tras la reintroducción de calcio durante la fase de reperfusión.

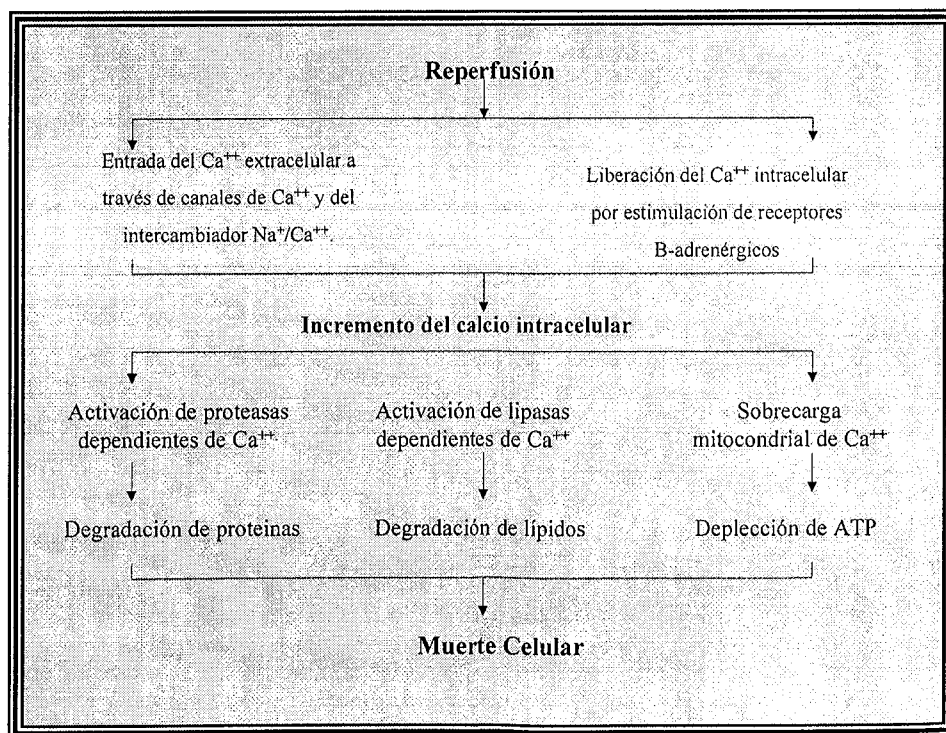
En la membrana celular existen diversos mecanismos que regulan el calcio citosólico. Entre estos mecanismos se encuentran los de entrada de  $\text{Ca}^{++}$  a la célula: a) el gradiente de calcio; b) el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ ; y c) la difusión pasiva de  $\text{Ca}^{++}$ . Para evitar la acumulación citosólica de dicho ión deben existir mecanismos de salida al exterior de la célula. Los dos más importantes son: a) el flujo de  $\text{Ca}^{++}$  a través del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$  (reacción reversible que depende del gradiente de concentraciones y del potencial de membrana); y b) una bomba de calcio activa situada en la membrana y ATP dependiente. Para que la función celular sea normal debe existir un fino equilibrio entre todos estos mecanismos.

Al ser privadas de oxígeno durante la isquemia, se produce disminución de los niveles celulares de ATP y un incremento del fosfato, lo que limita la salida del calcio de la célula y produce una acumulación del mismo en su interior. Se pierde así la capacidad para reestablecer la homeostasis del calcio. Este aumento citosólico de  $\text{Ca}^{++}$  deja como resultado una desensibilización relativa de las miofibrillas al  $\text{Ca}^{++}$ , debida probablemente a la degradación de las mismas (dependiente del  $\text{Ca}^{++}$ ) (Soei *et al.*, 1994).

Durante la reperfusión, el calcio libre en el citosol se incrementa excesivamente a niveles supranormales mediante la entrada de  $\text{Ca}^{++}$  externo a través de los canales de calcio y el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , así como por la liberación de  $\text{Ca}^{++}$  de almacenes intracelulares ocasionados por la estimulación de receptores B-adrenérgicos (Opie y Dphil, 1989). En condiciones normales, el  $\text{Na}^+$ , no se “cuela” a través de los canales del calcio a favor de su gradiente electroquímico, debido, muy probablemente, a que estos canales están permanentemente ocupados con más de un átomo de  $\text{Ca}^{++}$ . La activación del canal y su apertura conllevaría la unión de un átomo de  $\text{Ca}^{++}$  a su extremo exterior, lo que a su vez provocaría una deformación del canal y la expulsión del átomo de  $\text{Ca}^{++}$  al orificio interno (Carafoli y Penniston, 1986). Según este modelo durante la deprivación de  $\text{Ca}^{++}$  llega un momento en que el canal queda libre de  $\text{Ca}^{++}$ , y permeable por tanto al  $\text{Na}^+$ . La entrada de  $\text{Na}^+$  hace que su concentración intracelular aumente de forma importante y, al reinstaurarse la reperfusión con  $\text{Ca}^{++}$ , entran en funcionamiento los intercambiadores  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , produciéndose una rápida entrada de  $\text{Ca}^{++}$  al citoplasma. Esta entrada no puede ser absorbida

por el retículo sarcoplásmico ni por las mitocondrias, a pesar de la captación de importantes cantidades de  $\text{Ca}^{++}$  por estas últimas, y la elevación del  $\text{Ca}^{++}$  citoplásmico dispara todos los mecanismos de los que el  $\text{Ca}^{++}$  es mensajero, produciéndose la hipercontracción y la muerte celular (Hess y Manson, 1984; Persad *et al.*, 1995). Los mecanismos exactos mediante los cuales se produce una entrada masiva de calcio durante la reperfusión no se encuentran determinados con exactitud, pero es muy probable que las alteraciones en los sistemas de transporte del sarcolema sean los responsables de la acumulación de calcio.

La entrada incontrolada de calcio produce activación de fosfolipasas y proteasas que ocasionan daño a nivel del citoesqueleto y las membranas celulares, favoreciendo también la producción de radicales libres derivados del oxígeno (Tellez *et al.*, 1996). Algunos estudios han demostrado que la reoxigenación se encuentra asociada con una disminución de la eficiencia en la transferencia de electrones a nivel de la NADH-CoQ oxidoreductasa (sitio 1 de la cadena respiratoria) en la membrana interna mitocondrial, además de un incremento en el contenido de calcio mitocondrial (Moreno-Sanchez, 1985). Este incremento puede ser dañino para la mitocondria, pues induce una marcada disminución de la fosforilación oxidativa, por lo que se ha especulado que la muerte celular ocurre cuando la sobrecarga de calcio produce el fallo mitocondrial en la producción de ATP (Silverman, 1993).



**Figura I.9.-** Fisiopatología del daño celular inducido por el calcio durante la reperfusión.

La mejor base para la hipótesis de que la entrada de calcio en la célula contribuye a la producción de la disfunción post-isquémica es el hecho de que estudios realizados con bloqueadores de los canales del  $\text{Ca}^{++}$ , a dosis que no afectan la hemodinámica periférica ni el flujo regional miocárdico, mejoran la función del miocardio aturdido (como veremos posteriormente).

### 3.1.3. La paradoja del protón: el intercambiador sodio-hidrógeno.-

Este es un mecanismo más mediante el cual se puede producir el incremento del calcio intracelular durante la reperfusión. Este modelo postula que, durante la isquemia, en la célula se ponen en marcha mecanismos anaeróbicos los cuales generan ácido láctico con la consecuente producción de iones hidrógenos y el desarrollo de acidosis intracelular. Tal acidosis tiene un importante efecto inotrópico negativo por el que la célula miocárdica tiene que recurrir a varios mecanismos para mantener su pH intracelular. Uno de estos es el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de la membrana plasmática, que se activa por el incremento de hidrogeniones, con la finalidad de sacarlos del interior de la célula. De esta manera se incrementa la concentración intracelular de sodio; esta alta concentración de sodio estimula la actividad del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  e induce un aumento en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en el citosol desencadenando el daño anteriormente descrito (Karmazin, 1996).

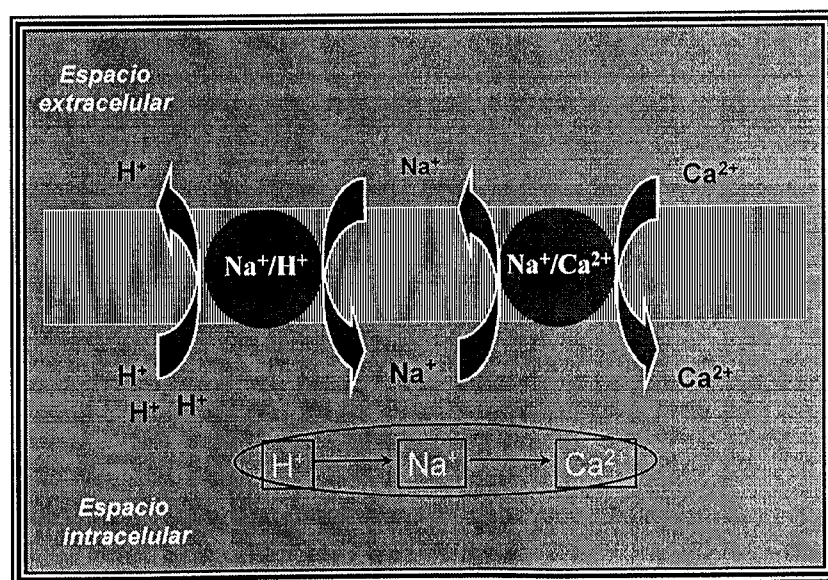


Figura I.10.- Intercambiador sodio-hidrógeno.

Un estudio experimental reciente indica que la acumulación intracelular de  $\text{Na}^+$  durante la isquemia es el sustrato para el daño por reperfusión, y que la cinética de la concentración intracelular de  $\text{Na}^+$ , acoplada al influjo del  $\text{Ca}^{++}$ , determinan un punto importante en el grado de lesión (Imahashi *et al.*, 1999).

Un punto importante en la demostración de que la bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  interviene en la producción del daño inducido por la isquemia-reperfusión ha sido la identificación de una serie de sustancias con capacidad para inhibir la vía de actuación de ésta. El amiloride (un agente utilizado en clínica como diurético) u otros derivados más potentes (dimetilamiloride, hexametilamiloride,...) producen una recuperación de la función contráctil después del evento de isquemia/reperfusión, junto con una reducción de las arritmias y de la necrosis celular (Scholz *et al.*, 1993; Meng *et al.*, 1993).

Otra sustancia que ha sido utilizada es el HOE 469 (3 methysulfony 1-4 piperidinobenzonyl guanidine hydrochloride; Hoescht AG, Germany), el cual también presenta un mecanismo de acción de bloqueo del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , demostrando una mejoría en la recuperación funcional, así como efectos antiarrítmicos, lo que podría tener su utilidad en farmacología clínica (Scholz *et al.*, 1993; Councillon *et al.*, 1993).

### **3.1.4. Papel de los ácidos grasos.-**

El incremento de los niveles de ácidos grasos han mostrado ser tóxicos para el miocardio isquémico, estando asociado con el aumento del daño de la membrana, arritmias y aceleración del deterioro funcional (Apstein, 1999). Durante la reperfusión, la oxidación de los ácidos grasos puede recuperarse rápidamente y dominar como fuente de producción de ATP, proporcionando más del 95 % de los requerimientos energéticos del corazón. Por una parte, el complejo piruvato-deshidrogenasa está inhibido por esas altas tasas de AG, con el resultado de una disminución entre la relación oxidación de la glucosa y glucólisis. Por otro lado, durante la isquemia y reperfusión, los niveles de malonylCoA también descienden, resultando en un incremento de la actividad carnitina-palmitoyl-transferasa (CPT-1) durante la reperfusión. El incremento de la CPT-1 y los altos niveles de AG que ocurren tras el episodio isquémico conducen a una alta tasa de oxidación de AG. Como resultado de todo ello, la oxidación de la glucosa permanece deprimida, la producción de protones por el metabolismo de la glucosa aumenta y el consumo relativo de oxígeno para realizar la contracción cardíaca se eleva. Ello conduce a una disminución de la eficiencia cardíaca durante la reperfusión. (Lopaschuk, 1999). Este desbalance relativo entre la oxidación de la glucosa y los AG durante la isquemia y la reperfusión puede ser un importante factor en el origen de la disfunción miocárdica asociada a la reperfusión. La estimulación de la

oxidación de la glucosa durante la reperfusión consigue aumentar la eficiencia cardíaca, con una mejora paralela de la función cardíaca (Liu *et al.*, 1996). Una forma de disminuir el metabolismo de los AG y aumentar la metabolización de la glucosa es disminuir los niveles circulantes de AG, como por ejemplo, con el empleo de soluciones de glucosa-insulina.

Estudios experimentales han mostrado que la activación de la piruvato-deshidrogenasa con dicloroacetato mejora la recuperación mecánica del corazón postisquémico, contrarrestando el efecto adverso de los ácidos grasos, disminuyendo la producción de lactato y evitando la acidificación del tejido (Lopaschuk *et al.*, 1998).

### **3.1.5. OTROS MECANISMOS.-**

#### **a) Papel del potasio.-**

En un gran número de estudios se ha observado una disminución significativa del potasio intracelular durante la fase de isquemia, produciéndose un incremento en el potasio extracelular (Harris, 1966; Cole *et al.*, 1991). Estos cambios en la homeostasis del  $K^+$ , objetivados desde los primeros segundos de producirse el evento isquémico, son un factor determinante en la arritmogénesis que se produce durante la reperfusión (Coronel *et al.*, 1988).

El mecanismo por el cual la célula pierde  $K^+$  ha sido motivo de diversos estudios, pero no es hasta el descubrimiento e identificación de los canales  $K_{ATP}$  sensibles en el corazón, cuando se produce un significativo avance. Hace más de una década se postuló que niveles bajos de ATP en el tejido postisquémico podrían inducir una apertura de los canales  $K_{ATP}$  reguladores, acortando la duración del potencial de acción y preservando los niveles de ATP miocárdico, protegiendo así al corazón contra la isquemia severa (Noma, 1983). Dicho acortamiento en la duración de la fase de meseta del potencial de acción, también disminuye el tiempo de entrada de  $Ca^{++}$  al interior de la célula y limita el daño por sobrecarga de  $Ca^{++}$ .

Estudios realizados con fármacos activadores de estos canales (como Nicorandil o Pinacidil) sugieren que dichas sustancias parecen tener un marcado efecto cardioprotector en el corazón isquémico al prevenir la hipercontracción, disminuir la incidencia de arritmias y ayudar significativamente a la recuperación de la tensión cardíaca originada (Mitani *et al.*, 1991). Nuevos estudios y la aparición de nuevas sustancias más específicas y potentes que modulen estos canales se proyectan en la actualidad como nuevas alternativas en el tratamiento del daño producido por la isquemia-reperfusión miocárdicas.

### ***b) Papel de los neutrófilos.-***

Actualmente se sabe que tras un periodo de isquemia miocárdica, la región afectada muestra hallazgos característicos de una respuesta inflamatoria, que incluye infiltración celular y edema; siendo la acumulación de los neutrófilos uno de los procesos más precoces. Los neutrófilos son atraídos en primer lugar al medio isquémico o reperfundido por medio de sustancias quimiotácticas específicas (componentes del complemento C3a y C5a activados e IL-8 ) que a su vez los activa y promueve su emigración al exterior de los vasos (Naka *et al.*, 1997). Los neutrófilos se unen a las células miocárdicas a través de moléculas especiales denominadas moléculas de adhesión. Una de éstas es el ICAM-1 (intercellular adhesion molecule), que aparece en la superficie de los miocitos como resultado de la estimulación de éstos por la Interleucina-6 (IL-6) (Kukielka *et al.*, 1995). Algunos estudios han observado un aumento rápido y sostenido de la producción de IL-6 y de su receptor tras un período breve de isquemia, lo que sugiere que tales factores pueden participar en la respuesta inflamatoria local tras la isquemia/reperfusión miocárdicas (Chandrashekhara *et al.*, 1999a). Los neutrófilos y monocitos activados y llevados hacia el miocardio durante la reperfusión, liberan diversas sustancias tóxicas para las células endoteliales y miocárdicas, incluyendo radicales libres derivados de oxígeno, proteasas, elastasas y colagenasas (Inauen *et al.*, 1990). El daño a las células endoteliales es capaz de producir alteraciones en la vasorelajación e interferir con los mecanismos antitrombóticos del endotelio. Al parecer los productos del ácido araquidónico también están involucrados en el daño por reperfusión mediante dos mecanismos propuestos: 1) el ácido araquidónico y sus productos como el leucotrieno B<sub>4</sub> y el tromboxano A<sub>2</sub> (como resultado del aumento en la actividad de la ciclooxigenasa y la lipooxigenasa), actúan como moléculas quimiotácticas induciendo la adhesión de los neutrófilos al endotelio (Catella-Lawson y Fitzgerald, 1997); y 2) los productos del ácido araquidónico, principalmente el leucotrieno B<sub>4</sub>, son potentes estimuladores para la producción de peróxido de hidrógeno y de elastasa de los neutrófilos (Kawabata *et al.*, 1996). Esta respuesta inflamatoria condiciona un incremento de la permeabilidad capilar, favorece la adhesión plaquetaria y la infiltración de más leucocitos hacia el miocardio.

Múltiples estudios han demostrado que la reducción de neutrófilos antes de la isquemia/reperfusión o la interferencia con su adhesión al endotelio pueden limitar el tamaño del infarto en animales de experimentación (Ma *et al.*, 1992). Incluso en modelos de isquemia/reperfusión cardíacas globales, como sucede durante el trasplante cardíaco, las terapias que interfieren con la adhesión de los neutrófilos y reducen la amplitud de la actividad de la mieloperoxidasa del injerto (que es un marcador específico de la presencia de aquellos) se asocian con una mejor supervivencia del injerto (Pinsky *et al.*, 1994).

Existen en la actualidad diversas sustancias en investigación, como el PS-519, inhibidor de la interacción entre la célula endotelial y la *P-selectina* leucocitaria, que parece comportarse como un potente y efectivo agente cardioprotector, preservando la función contráctil y la perfusión coronaria en un modelo experimental de isquemia-reperfusión. (Campbell *et al.*, 1999). Así mismo, la simvastatina ha mostrado también poseer un efecto cardioprotector al inhibir la interacción entre la célula endotelial y el leucocito, preservando así la función contráctil y la perfusión coronaria. Dicho efecto es independiente de su acción en la disminución del colesterol y parece estar mediada por un incremento en la liberación endotelial de óxido nítrico (Lefer *et al.*, 1999).

### *c) Disfunción endotelial y óxido nítrico. Fenómeno de “no-reflujo”.*

Durante muchos años el endotelio vascular fue visto simplemente como una barrera anatómica entre la sangre y el intersticio. Sin embargo, poco a poco se ha ido descubriendo la capacidad de dichas células para generar diversos compuestos que pueden actuar a nivel local para controlar los fenómenos de trombosis, trombolisis, interacciones celulares (plaquetas y leucocitos), así como para regular el tono vascular (Lüscher *et al.*, 1995). Dentro de dichas sustancias destacan el óxido nítrico (NO), sintetizado a partir del aminoácido L-arginina, y la endotelina, cuyo equilibrio mantiene el tono vascular.

El NO posee un papel importante en la regulación del tono vascular tanto en animales como en humanos, con un efecto vasodilatador, lo que explica que haya sido llamado “*factor relajante derivado del endotelio*” antes de conocerse su existencia (Moncada, 1994). Tiene además otras funciones como son la inhibición de la función plaquetaria, así como la inhibición de la proliferación y migración de las células del músculo liso. Dicha sustancia juega un papel controvertido en la producción del daño por reperfusión (Nonami, 1997). Por un lado, la ausencia de NO contribuye al daño por reperfusión, específicamente al fenómeno de *no-reflujo* (del cual hablaremos posteriormente), debido a que condiciona un incremento en el tono vascular coronario. Además, la ausencia de NO se ha relacionado con una mayor adhesividad de los neutrófilos al endotelio vascular con el subsecuente daño celular (Williams *et al.*, 1995). Es por ello que las sustancias donadoras de NO han demostrado tener un efecto cardioprotector durante la reperfusión.

Sin embargo, también existe evidencia de que el NO es capaz de condicionar daño miocárdico durante la reperfusión, a través de varios mecanismos, entre los que se encuentra la formación de radicales libres como el peroxinitrito. Por ello las sustancias inhibidoras de la formación de NO pueden también ser cardioprotectoras (Schulz y Wambolot, 1995;



Woolfson *et al.*, 1995), si bien su papel exacto en la producción del daño por reperfusión y el efecto de su manipulación farmacológica está aún por definirse.

#### *Fenómeno de "no-reflujo".-*

En 1986 Ludmer demostró que las arterias coronarias con lesiones ateroscleróticas presentaban una vasoconstricción paradójica ante la estimulación con acetilcolina, poniendo en evidencia por primera vez la función endotelial alterada (Ludmer *et al.*, 1986). A partir de entonces se ha acumulado suficiente evidencia para establecer la existencia de la disfunción endotelial (Celermajer, 1997).

El daño al endotelio vascular coronario se inicia en los primeros minutos de la reperfusión y progresa con el tiempo. Así, por ejemplo, Tsao y cols (1990) encontraron que, en gatos, la disfunción endotelial se inicia a los 2,5 minutos de la reperfusión y alcanza su máximo a los 20 minutos y no se correlaciona con el daño anatómico, es decir, que la disfunción endotelial antecede al daño estructural. La importancia de la disfunción endotelial consiste en que es el punto de partida del denominado fenómeno de no-reflujo.

Aunque inicialmente se pensó que la permeabilidad de los vasos coronarios epicárdicos garantizaba el flujo sanguíneo hacia los lechos microvasculares después de un infarto agudo de miocardio, Kloner (1974) demostró que en animales de experimentación (perros) podía existir disminución importante del flujo a nivel microvascular en la zona infartada, a pesar de existir permeabilidad de la arteria responsable del infarto. A este hecho se le denominó fenómeno de *no-reflujo* y ha sido observado posteriormente también en humanos (Ferez *et al.*, 1998). La alteración de la vasorelajación dependiente del endotelio, es decir un aumento en el tono vasomotor, explica la disminución de flujo coronario después de la reperfusión. Se han propuesto tres mecanismos para explicar esta disminución del flujo coronario (fenómeno de no-reflujo): 1) edema intracelular e intersticial que produce compresión extravascular de las arterias y arteriolas; 2) daño a las células del músculo liso coronario con aumento del tono vascular y falta de relajación al estímulo con acetilcolina y 3) disminución de la liberación de óxido nítrico que se acompaña de aumento del tono vascular (Pearson *et al.*, 1992).

Estudios en seres humanos con microesferas marcadas con talio-201 y Tc-99m han mostrado que los defectos de perfusión persisten incluso durante varias semanas tras una trombolisis eficaz de la oclusión de arterias coronarias en seres humanos (Schofer *et al.*, 1985).

#### ***d) Restauración abrupta de la presión osmótica extracelular.-***

Durante la isquemia miocárdica, la fragmentación molecular y la acumulación de metabolitos en el espacio extracelular conducen a un aumento de la presión osmótica intra y extracelular. Con la reperfusión se produce el lavado del espacio extracelular y la normalización de su presión osmótica, estableciéndose un gradiente osmótico, tanto más importante cuanto más severa y prolongada es la isquemia, entre el interior y el exterior de las células (tanto miocitos como células endoteliales). A favor de este gradiente se produce la entrada de agua en las células, que se edematizan y aumentan su volumen (Klein *et al.*, 1985). Esta sobrecarga osmótica puede provocar la muerte de miocitos viables durante la reoxigenación (Ruiz-Meana *et al.*, 1995).

Este proceso se ve favorecido por el deficiente control de la homeostasis del H<sub>2</sub>O que presentan las células isquémicas, y puede ser suficiente para producir la rotura del sarcolema (Seenberg *et al.*, 1985). Además, el aumento del volumen celular comprime el lecho microvascular y puede comprometer el flujo del territorio reperfundido. El edema de las células endoteliales puede contribuir a este resultado, y en el caso de que llegue a producirse su rotura, a la extravasación de hematíes (hemorrágica intramiocárdica) (Capone y Most, 1978).

### **3.2. EVENTOS ASOCIADOS AL DAÑO POR REPERFUSIÓN .-**

#### **3.2.1. Arritmias cardíacas.-**

El restablecimiento de la circulación en un área previamente isquémica produce profundos cambios electrofisiológicos y metabólicos tanto en las células isquémicas como en las células normales de la vecindad, que serán responsables de arritmias ventriculares letales y de alteraciones anatómicas severas. Estas alteraciones son consecuencia del cambio brusco en el sustrato electrolítico y metabólico del espacio extracelular producido por el arrastre o lavado que ejerce la reperfusión del área isquémica (Cinca, 1988). Los efectos de la reperfusión coronaria dependerán de: a) la rapidez con la que se restablezca el flujo coronario, ya que la reperfusión gradual atenúa la incidencia de arritmias; b) la duración del período previo de isquemia, puesto que éste condiciona la magnitud de la alteración electrolítica y metabólica del espacio intersticial y, por tanto, su osmolaridad; c) la extensión del área de isquemia; y d) la frecuencia cardíaca, ya que su aceleración aumentaría el grado

de heterogeneidad que produce la reperfusión del intersticio isquémico (García y Sanchez, 1993).

El mecanismo por el que se producen las arritmias de reperfusión coronaria se basa fundamentalmente en la recuperación súbita y heterogénea de las alteraciones electrolíticas y metabólicas. Así, el restablecimiento desigual de la concentración de  $K^+$  extracelular y del pH local determinan una recuperación heterogénea del potencial de reposo de la membrana entre células vecinas. Estas diferencias conllevan diferencias paralelas en la excitabilidad y refractariedad que son la base para el desarrollo de arritmias por reentrada. Sin embargo, en la génesis de las arritmias de reperfusión debe considerarse el hecho de que durante la isquemia aumenta el número de receptores alfaadrenérgicos y por tanto en el momento de la reperfusión existirá un aumento del  $Ca^{++}$  intracelular inducido por aquellos, que puede ocasionar arritmias por mecanismos focales (Witkowski y Corr, 1984). También la difusión de  $K^+$  y  $H^+$  hacia el interior del área normal, que es posible durante la reperfusión, podría inducir actividad repetitiva en las células del área sana y por tanto arritmias ventriculares. A favor de que durante la reperfusión coronaria las arritmias son básicamente debidas a fenómenos focales de aumento del automatismo o de aparición de actividad repetitivas está la observación de ritmos idioventriculares acelerados durante la reperfusión (Kaplinsky *et al.*, 1981), similares a los de la clínica humana durante el tratamiento fibrinolítico en el infarto agudo de miocardio (Gressin *et al.*, 1993). En el modelo de mapeo tridimensional en estudios experimentales en el gato se ha demostrado que el 75% de los casos de taquicardia ventricular inducida durante la reperfusión coronaria se inicia y se mantiene por mecanismos no reentrantes originados en el subendocardio de las zonas limítrofes; sólo en algunos casos se detectó un mecanismo de reentrada intramiocárdica (Pogwzd y Corr, 1987).

En diversos estudios se ha demostrado que las oscilaciones de  $Ca^{++}$  en la fase de reperfusión coinciden con la aparición de arritmias; el incremento de  $Ca^{++}$  durante dicha fase pudiera tener efectos electrofisiológicos que incluyen la aparición de ritmos cardíacos anormales (Verrier y Hagestad, 1986). Por el contrario, Hearse y Tosaki (1988) han propuesto que la generación de arritmias se encuentra relacionada con la formación de radicales libres que provocarían las arritmias a través del daño en la membrana celular, con los consecuentes cambios electrofisiológicos en los potenciales de acción. Al final estos autores concluyen que probablemente el  $Ca^{++}$  y los radicales libres derivados del oxígeno colaboren en el desarrollo de arritmias. Aiello *y cols.* (1995) demostraron que el tejido miocárdico sometido a reperfusión se acompañaba de despolarización y recuperación lenta de la duración del potencial de acción, mientras que el tejido tratado con "barredores" de radicales libres antes de la isquemia mostraba una recuperación más rápida del potencial de

acción transmembrana después de la despolarización, con una menor incidencia de taquiarritmias.

A nivel del corazón isquémico, las modificaciones de la cinética de liberación y del metabolismo de las catecolaminas juegan un papel importante en la génesis de las arritmias inducidas por la isquemia-reperfusión. La concentración de catecolaminas es máxima durante los primeros minutos de la perfusión. Esta liberación brutal de noradrenalina es paralela al desencadenamiento de arritmias ventriculares (Rochette y Maupoil, 1993).

Las arritmias ventriculares no son muy frecuentes cuando se induce la perfusión en el hombre, a diferencia de su elevada aparición en modelos animales (rata). Algunas explicaciones de estas diferencias son: 1) la velocidad de perfusión, la cual es mayor cuando se elimina abruptamente una obstrucción experimental (Yamazaki *et al.*, 1986); 2) la ausencia de enfermedad coronaria en algunos modelos experimentales, ya que existe mayor flujo cuando las arterias reperfundidas se encuentran estructuralmente normales que cuando no están sanas; 3) las diferencias en la actividad enzimática, por ejemplo la xantina oxidasa se incrementa en algunos animales de laboratorio pero no en humanos (Opie y Dphil, 1989); 4) en algunos modelos, como en el corazón aislado, los corazones son reperfundidos con diversas soluciones libres de células, por lo que no hay plaquetas ni neutrófilos que puedan contribuir al taponamiento de los capilares incrementando la severidad de la isquemia y a la disminución en la posibilidad de perfusión total (Engler *et al.*, 1986).

Ciertamente las arritmias de perfusión no representan un problema importante para el clínico, dado que su incidencia es muy baja y pueden ser fácilmente tratadas (Piper *et al.*, 1998).

### **3.2.2. Miocardio aturdido.**

Es en el año 1975 cuando el grupo dirigido por el profesor Vatner describe por primera vez, en el laboratorio experimental, tras una oclusión coronaria de 15-20 minutos (período no sujeto a muerte celular) y a pesar de un completo restablecimiento del flujo sanguíneo, la persistencia durante horas o días de una anomalía de la motilidad regional de la pared ventricular (Heyndrickx *et al.*, 1975). En perros anestesiados y con tórax abierto sometidos a una oclusión coronaria de la arteria descendente anterior de 15 minutos de duración seguida por perfusión, la función contráctil regional del miocardio previamente isquémico no regresa a valores basales normales tras la restauración del flujo sanguíneo. En su lugar la función contráctil sistólica permanecía deprimida –o “aturdida”- a niveles de

entre 0-30% de los valores de preoclusión durante las horas iniciales después de la reperfusión (Bolli *et al.*, 1988b). Igualmente se ha observado que dicho aturdimiento ocurría en otras muchas situaciones: tras episodio de isquemias repetidas (Basuk *et al.*, 1986), tras episodio de isquemia parcialmente irreversible (infarto subendocárdico) (Lavalley *et al.*, 1983), tras isquemias globales durante la cardioplejia (Illes *et al.*, 1989), así como tras isquemia inducida por el ejercicio (Homans *et al.*, 1986).

El miocardio aturrido es, básicamente, un acontecimiento postisquémico que se caracteriza por una depresión transitoria de la función del miocardio amenazado, y que ha sido salvado gracias a la reperfusión antes de que el episodio de isquemia haya tenido tiempo suficiente para provocar un daño irreversible. El miocardio no tiene una recuperación rápida después del período de isquemia y se ha observado que ésta puede durar hasta 3 semanas. Este concepto debe respetar dos puntos esenciales: a) que la alteración de la contractilidad sea reversible y b) que la disfunción miocárdica esté presente con un flujo dentro de un rango de normalidad (Bolli, 1992).

Para explicar la causa de la disfunción mecánica se han propuesto diferentes mecanismos: 1) disminución en la síntesis de ATP (Braunwald y Kloner, 1982); 2) anomalías en la excitación miocárdica (Levine *et al.*, 1987); 3) disminución en la actividad de la creatinafosfoquinasa (CPK) (Greenfield y Swain, 1987); 4) alteración de la homeostasis del  $Ca^{++}$  (Ito *et al.*, 1987); 5) insensibilidad de los miofilamentos al  $Ca^{++}$  (Mubagwa, 1995); 6) participación de los radicales libres de oxígeno (Marban, 1991); 7) daño en la matriz del colágeno (Zhao *et al.*, 1987) y 8) denervación simpática funcional (Ferrari, 1998).

Sin embargo, actualmente los mecanismos más plausibles parecen relacionarse con el daño derivado de los radicales libres en las primeras fases de la reperfusión y las alteraciones en el metabolismo del calcio.

Es importante enfatizar que los mecanismos del  $Ca^{++}$  y de los radicales libres no son excluyentes, y, al igual que en las arritmias de reperfusión, pueden representar 2 facetas del mismo fenómeno. De hecho, Bolli (1990) sugiere que los radicales libres pueden causar disfunción del retículo sarcoplásmico y sarcolema, así como alteraciones de la distribución del  $Ca^{++}$  y con ello, finalmente, exacerbar el daño inicial de los radicales y promover la formación de nuevos radicales.

La severidad de la isquemia puede gobernar el daño subsecuente por reperfusión ya que durante la isquemia ocurre: 1) liberación significativa de enzimas; 2) acumulación de

palmitoil-coenzima A que produce la apertura de canales de calcio, lo cual puede exacerbar el daño (Spedding y Mir, 1987); 3) producción de radicales libres; y 4) un incremento de la frecuencia cardíaca que puede aumentar la aparición de arritmias (Schaper *et al.*, 1987). Por último es importante mencionar que la velocidad de la reperfusión incrementa la aparición de arritmias y también disminuye la recuperación mecánica (Yamazaki *et al.*, 1986). Es prudente considerar que el fallo mecánico miocárdico posterior a la reperfusión no ha sido completamente reproducido en las preparaciones experimentales sujetas a la reperfusión gradual, tal y como aparece en la terapia trombolítica clínica.

Un estudio experimental reciente sugiere que los cardiomiocitos aislados de corazón "aturdido" por una isquemia-reperfusión, poseen una función contráctil y un tránsito de  $Ca^{++}$  normales, atribuyendo a factores no-miocitarios, como son las anomalías en la matriz extracelular o el acoplamiento anormal entre el tejido intersticial y el miocito, un papel importante en la génesis de la disfunción miocárdica en el corazón aturdido (Chandrashekhar *et al.*, 1999b).

Según algunas observaciones durante la realización de una angioplastia coronaria transluminal percutánea, las condiciones que pueden llevar al aturdimiento miocárdico son las que producen una aperfusión tisular miocárdica por espacio mayor de 120 segundos. Las oclusiones menores de dicho período de tiempo producen alteraciones en la movilidad regional miocárdica pero con el restablecimiento de la función ventricular sistólica en un tiempo de 5 minutos. Debe señalarse que la disfunción en la relajación diastólica persiste durante más tiempo tras la angioplastia, lo que sugiere que las anomalías en la función diastólica son marcadores más sensibles de aturdimiento miocárdico, debido a que pueden persistir hasta 7 días después de la reperfusión (Wijns *et al.*, 1986).

Algunas intervenciones clínicas o experimentales tales como el uso de catecolaminas, teofilina, ouabaína o el activador de canales de  $Ca^{++}$  BayK 8644, estimulan la función contráctil en el corazón aturdido postisquémico. Sin embargo dichas drogas conducen eventualmente a un incremento del daño cardíaco al incrementar la desenergización del tejido celular (consumo de ATP y creatinfosfato) (Tellez *et al.*, 1996). Existen algunas intervenciones que parecen prevenir la desenergización del tejido cardíaco durante la reperfusión, facilitando la recuperación funcional. Así, por ejemplo, la adición de glucosa o de glucosa + piruvato durante la reperfusión de corazones sometidos a una isquemia global produce una recuperación casi total de la función contráctil y preserva los niveles normales de ATP y creatinfosfato (Lerch, 1993; Vanoverschelde *et al.*, 1994). Estos datos sugieren que se requiere de una glicolisis funcional (presencia de glucosa) que mantenga niveles elevados de piridín nucleótidos reducidos en el citosol (NADPH, NADH),

junto con una síntesis activa de ATP mitocondrial (adición de piruvato) para evitar el daño postisquémico.

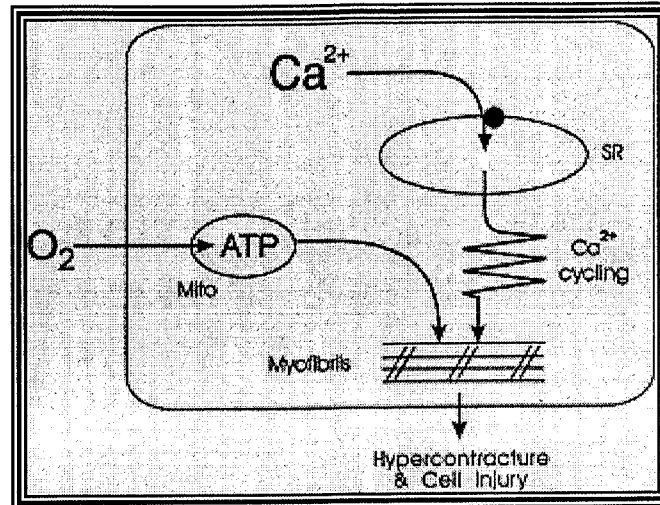
### **3.2.3. Daño celular letal. Hipercontractura.**

El daño letal en la reperfusión se define como la lesión provocada por la restauración del flujo tras un episodio isquémico que conduce a la muerte de las células, que sería solo reversible durante el episodio isquémico precedente. Para que ello ocurra, la isquemia debe de producirse sin ocasionar lesión irreversible en torno a ella. Ello lleva implícito que las alteraciones isquémicas celulares son un requisito necesario para la lesión letal, pero no suficientes por ellas mismas para producir muerte celular.

Fue Jennings quien describió por primera vez el frente de onda de la necrosis, describiendo la muerte celular desde el subendocardio hacia el epicardio en relación al tiempo de duración de la isquemia (Sommers y Jennings, 1964) . La observación que dio pie al concepto de la existencia de daño celular letal postreperfusión fue el hecho de que los cambios celulares ocurrieron más rápidamente cuando se reperfundía que si se dejara de reperfundir el tejido isquémico.

Desgraciadamente es técnicamente imposible evaluar las manifestaciones de la lesión irreversible en la misma pieza miocárdica, antes y después de la reperfusión. Tampoco es factible distinguir en el análisis del daño desarrollado en el miocardio reperfundido si éste es producido por completo por la isquemia o la reperfusión. A pesar de ello, existen criterios indirectos que permiten estudiar la muerte celular durante la reperfusión, basados en que la modificación de las condiciones de reperfusión pueden prevenir la muerte celular. Con todo, la lesión letal postreperfusión continua siendo controvertida (Piper *et al.*, 1998).

Durante la reperfusión, la mitocondria empieza a resintetizar energía para, entre otras cosas, reducir la sobrecarga de calcio que se ha acumulado durante la fase isquémica. Estos 2 factores (restauración de la síntesis de ATP en presencia de elevada concentración de  $Ca^{++}$ ) van a provocar una activación exagerada y no controlada de las miofibrillas, ocasionando un acortamiento irreversible de la célula, denominado hipercontractura, con alteraciones en los elementos del citoesqueleto y que constituye el principal mecanismo de muerte celular durante la reperfusión. En el tejido, la hipercontracción de las células adyacentes puede conducir a una mutua disrupción celular y necrosis.



**Figura I.11-** .Mecanismos involucrados en la hipercontractura celular (Piper *et al.*, 1998).-

Existen 2 vías principales demostradas de forma experimental para proteger esta forma de hipercontractura durante la primera fase de la reoxigenación: 1) por una interferencia directa con las miofibrillas, es decir, inhibiendo la formación de puentes cruzados durante el tiempo necesario para permitir una recuperación normal del calcio (ej. 2-3 butanonedionomoximel -BDM) (Siegmund *et al.*, 1991); y 2) actuando sobre la liberación de calcio sarcoplásmico (ej. halotano) (Siegmund *et al.*, 1997). Otra sustancia analizada recientemente son los suplementos de L-arginina que han demostrado reducir la necrosis secundaria y la hipercontractura en la isquemia/reperfusión (Padilla *et al.*, 2000).

#### 4.- APOPTOSIS.-

En 1972, Kerr, Wyllie y Currie describieron la existencia de dos tipos de muerte celular con evidencias morfológicas diferentes: la muerte patológica, conocida con el término de *necrosis*, y que ocurría en el centro de una lesión aguda producida como consecuencia de algún trauma o accidente isquémico; y la muerte celular *fisiológica* que ocurría en el organismo en tres circunstancias: a) durante el período prenatal y tras el nacimiento para contrarrestar los efectos de la proliferación celular, b) en determinados tejidos para mantener la arquitectura tisular y c) en algunos estados patológicos (Kerr *et al.*, 1972). En el caso de la muerte necrótica, las células y sus organelas se hinchaban, perdían su estructura completamente y terminaban por romperse provocando una reacción inflamatoria en el lugar donde acontecía el proceso que con el tiempo se convertía en una cicatriz



fibrosa. Por el contrario en el caso de muerte *no necrótica* las células se arrugaban y se condensaba su contenido, las organelas y la membrana plasmática retenían su integridad estructural, y se producía una discreta fragmentación celular liberándose pequeños cuerpos, que eran rápidamente fagocitados por las células adyacentes o por macrófagos cercanos sin que se liberase su contenido, y, por lo tanto, sin inducir una respuesta inflamatoria. Con todos estos hallazgos, ese mismo año Kerr y sus colegas acuñaron el término de "*apoptosis*" (del griego, caída de las hojas) para nombrar a este tipo de muerte celular, activada a través de un programa genético y necesaria para la fisiología normal de los organismos, y que determinados agentes desencadenantes podían convertirla en un proceso patológico. Lo más destacable de este tipo de muerte programada es el hecho de que conlleva un gasto energético así como la síntesis de ARN y de proteínas, a diferencia de la necrosis.

<i>Aspectos</i>	<i>Muerte apoptótica</i>	<i>Muerte no apoptótica</i>
Significado	Fisiológico y patológico	Patológico
Estímulo	Intra y extracelular Hipoxia ligera, ausencia de factores de crecimiento, etc.	Extracelular Isquemia, toxinas, ausencia de ATP, etc.
Gasto energético	Dependiente de ATP	Ninguno
Morfología	Disminución del volumen celular, condensación de la cromatina, formación de cuerpos apoptóticos	Aumento del volumen celular, lisis del núcleo y de la célula, destrucción de orgánulos
Patrón de fragmentación del ADN	Internucleosomal	Al azar
Membrana plasmática	Alteraciones en la composición, arrugamiento, mantiene su integridad	Lisada
Final del proceso	Fagocitosis de los cuerpos apoptóticos	Reacción inflamatoria
Histología	Desaparición de células aisladas No hay señales histológicas residuales	Desaparición masiva de células, restos de inflamación, cicatriz fibrosa

**Tabla I.4.-** Diferencias entre los procesos de muerte celular apoptótica y no apoptótica (Diez *et al.*, 1999)

#### 4.1.- Apoptosis en la cardiopatía isquémica.-

En los últimos 10 años se han publicado hallazgos que sugieren que la regulación de la apoptosis puede estar alterada en diversas enfermedades del corazón, como la cardiopatía isquémica. Aunque clásicamente se ha considerado que en las situaciones de disminución del aporte de oxígeno y sustratos al músculo cardíaco se producía exclusivamente necrosis de las células miocárdicas, existen evidencias crecientes de que, tanto en la fase aguda del infarto de miocardio, como en las situaciones de isquemia-reperusión miocárdica, la pérdida de células es debida tanto a necrosis como a apoptosis (Best *et al.*, 1999).

Diversos estudios han mostrado que la isquemia/reperusión miocárdica está asociada con un aumento de la apoptosis celular. Sin embargo, el mecanismo exacto de la inducción del proceso apoptótico y sus consecuencias a largo plazo no son completamente conocidas: condiciones de hipoxia, estimulación de receptores de muerte (Fas) y el stress oxidativo han sido sugeridos como estimuladores de la apoptosis durante la isquemia/reperusión (Kajstura *et al.*, 1996; Aikawa *et al.*, 1997).

Está abundantemente documentado que las alteraciones celulares y subcelulares que se asocian a la isquemia y a la reperusión del miocardio son consecuencia, respectivamente, de la reducción en la disponibilidad de ATP y del aumento en la producción de especies reactivas del oxígeno. La clave para entender que la apoptosis y la necrosis coexistan en la cardiopatía isquémica puede estar en la valoración de la intensidad de la reducción de los niveles de ATP y de la sobreproducción de especies reactivas del oxígeno que se generan cuando la disponibilidad de oxígeno está alterada. Así, cuando el nivel de ATP está muy disminuido, la célula carece de la energía suficiente para entrar en apoptosis, por lo que se activa la vía energéticamente menos costosa de la necrosis. Por otra parte, cuando se produce una gran cantidad de especies reactivas del oxígeno está preferentemente estimulada la vía de la apoptosis. Evidentemente, el impacto final de ambos mecanismos dependerá de la localización topográfica de la célula con respecto a la oclusión vascular y del tipo de célula de que se trate (Díez, 1999).

Hoy por hoy aún sigue controvertido si la apoptosis es estimulada durante la isquemia o durante la reperusión. Gottlieb *y cols.* (1994) detectaron rastro de apoptosis en el miocardio isquémico tras 30 minutos de isquemia y 4 horas de reperusión en el conejo, pero no en el miocardio únicamente sometido a isquemia, sugiriendo que la apoptosis es expresada únicamente durante la reperusión. Otros estudios han mostrado, en el miocardio de rata, que la apoptosis inducida por isquemia permanente puede ser detectada tras 2 horas

de oclusión coronaria (Kajstura *et al.*, 1996), y que el proceso apoptótico es acelerado tras 45 minutos de isquemia seguidos de una hora de reperfusión (Fliss y Gattinger, 1996), indicando que la apoptosis puede empezar tras una isquemia prolongada sin reperfusión o tras un breve período de isquemia seguido de reperfusión.

Recientemente Zhao *y cols.* (2000), en un modelo canino, no hallaron muerte celular apoptótica en el miocardio isquémico sin reperfusión, mientras que ambas formas de muerte (necrosis y apoptosis) se encontraban tras isquemia/reperfusión.

Los datos obtenidos mediante estudios *in vitro* muestran que la isquemia puede poner en marcha el proceso apoptótico, sin embargo es durante la reperfusión cuando el proceso llega a su término, debido a que entonces se restablecen los procesos metabólicos imprescindibles para la consecución de la muerte celular por apoptosis (Haunstetter e Izumo, 1998). Además durante la reperfusión se produce  $O_2^-$  merced a la disponibilidad de oxígeno, sin embargo, aunque el  $O_2^-$  puede inducir apoptosis en determinadas condiciones, no es estímulo suficiente para la misma si no hay disponibilidad de factores de crecimiento o de glucosa, algo que acontece también durante la reperfusión.

Por otra parte, en estudios *in vivo* se ha comprobado que durante la reperfusión, el tejido cardíaco es infiltrado por leucocitos que pueden inducir a la apoptosis de los cardiomiocitos induciendo la expresión de la molécula *Fas*, o debido a los efectos de las citoquinas que liberan, como es el caso del *TNF- $\alpha$* , si bien el efecto preciso de la acumulación de neutrófilos sobre la apoptosis permanece aún desconocido (Albertine *et al.*, 1994; Zhao *et al.*, 2000).

#### **4.1.1.- Hallazgos celulares.-**

En estudios *postmortem* efectuados en corazones de pacientes fallecidos de un infarto agudo de miocardio se ha observado que las células apoptóticas son predominantemente cardiomiocitos y que se localizan en la región hipoperfundida de la periferia del infarto. En estudios experimentales efectuados en ratas se ha comprobado que tras la oclusión coronaria aguda la apoptosis es la primera forma de muerte de los cardiomiocitos, afectando al 86% de la población de células muertas en las primeras 2 horas y siendo seguida a continuación por la muerte necrótica, que a las 4-5 horas será ya predominante (Kajstura *et al.*, 1996). A partir de este tiempo no se producirán variaciones cuantitativas sustanciales en la muerte de los cardiomiocitos.

Estudios efectuados en conejos han demostrado que a los dos días de la oclusión coronaria aguda, se inicia la apoptosis de las células inflamatorias que infiltran la región isquémica (leucocitos y macrófagos) y de los miofibroblastos del intersticio correspondiente. La pérdida de estas células vía apoptosis se prolonga durante 2-4 semanas, hasta la casi completa desaparición de las mismas. También se ha descrito apoptosis de las células endoteliales de los pequeños vasos intramiocárdicos que irrigan la región isquémica (Díez, 1999).

#### **4.1.2. Hallazgos moleculares.-**

La isquemia produce en el medio intracelular y en el medio extracelular de los cardiomiocitos diversas alteraciones bioquímicas que pueden inducir la apoptosis, especialmente hipoxia y acidosis. En concreto, *in vivo* e *in vitro* se ha comprobado que la hipoxia se asocia al aumento en la expresión del receptor proapoptótico *Fas* y de la proteína proapoptótica *p53* y al aumento de la transactivación transcripcional de genes dependiente de la proteína *p53* en los cardiomiocitos.

Aunque el papel de la acidosis intracelular está menos claro, estudios recientes han documentado que durante la isquemia miocárdica se inhibe la actividad de la  $H^+$ -ATPasa vacuolar. En experimentos efectuados *in vitro* se ha comprobado que la inhibición de dicha enzima da lugar a la acidificación del citoplasma celular, la inducción de la expresión de la proteína *p53* y a la apoptosis de los cardiomiocitos (Long *et al.*, 1998).

Recientes estudios han demostrado los papeles de la proteína antiapoptótica *Bcl-2* y la proteína proapoptótica *Bax* en la regulación de la muerte celular programada. Así se ha documentado en los cardiomiocitos que presentan apoptosis en la perifería de un infarto un aumento en la expresión de la proteína proapoptótica *Bax*, mientras que en los cardiomiocitos del centro del infarto se detecta la expresión de la proteína antiapoptótica *Bcl-2*. Ello permitiría pensar que los segundos son resistentes a la apoptosis y mueren por necrosis, mientras que los primeros son muy sensibles a la apoptosis (Sawa *et al.*, 1995).

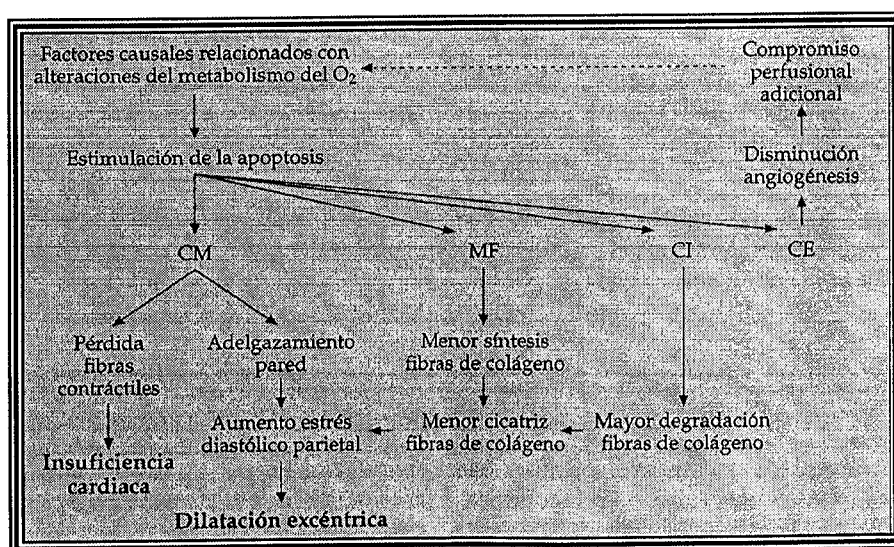
En diversos modelos animales se ha observado que la reperfusión intensifica la apoptosis de los cardiomiocitos en un miocardio previamente isquémico. Por otra parte, se sabe que el daño tisular que se produce en situaciones de reperfusión está mediado por la hiperproducción de especies reactivas del oxígeno. Dado que se ha comprobado *in vitro* que estas moléculas inducen la apoptosis de los cardiomiocitos, parece razonable asumir que ellas serán las que aceleran el proceso apoptótico en situaciones de isquemia-reperfusión del miocardio (Aikawa *et al.*, 1997).

### 4.1.3. Implicaciones fisiopatológicas.-

La pérdida de cardiomiocitos, por apoptosis, necrosis, o la combinación de ambas, se ha propuesto como el principal factor responsable del adelgazamiento de la pared ventricular, del aumento del estrés diastólico parietal y de la dilatación de la cámara ventricular en las cardiopatías crónicas, sean o no de origen isquémico. La pérdida de cardiomiocitos, bien sea segmental, focal o difusa, puede constituir el principal factor determinante de la hipertrofia ventricular excéntrica descompensada y puede condicionar su evolución hacia la insuficiencia cardíaca.

Los miofibroblastos son células de reparación tisular, con propiedades estructurales de células musculares lisas y de fibroblastos, que tras un insulto isquémico del miocardio proliferan y crean una cicatriz cuya contracción median. La desaparición de estas células por apoptosis puede contribuir a comprometer aún más la dinámica contráctil del miocardio infartado.

La apoptosis de las células inflamatorias infiltrantes facilita la liberación al medio extracelular de sustancias con gran poder de degradación, por ejemplo, metaproteinasas de matriz que degradan las fibras de colágeno de la cicatriz postinfarto, facilitando el debilitamiento de la pared y su ulterior dilatación. Finalmente la apoptosis de las células endoteliales puede ser responsable de la pérdida progresiva de vasos sanguíneos y del compromiso adicional de la perfusión del miocardio que se está reparando (Diez *et al.*, 1999).



**Figura I.12.-** Esquema representativo de las consecuencias de la apoptosis de las células del miocardio en la isquemia/reperfusión. (CM: cardiomiocitos; MF: miofibroblastos; CI: células inflamatorias; CE: células endoteliales) (Diez *et al.*, 1999).

## 5.- CITOPROTECCIÓN MIOCÁRDICA.-

Durante años se ha pensado que las únicas vías capaces de contrarrestar los efectos de la isquemia se conseguían con la disminución de la precarga, la postcarga, la potencia de contracción y la frecuencia cardíaca, y merced a ellos la reducción de consumo de oxígeno por parte del miocardio. Hoy día sabemos que existen otros mecanismos sobre los que podemos influir para tratar de evitar el deterioro funcional y estructural que causa la isquemia; así podemos intervenir sobre el tono vasomotor coronario, mejorando la perfusión sanguínea de las zonas isquémicas, e incluso sobre mecanismos que actúan directamente sobre el metabolismo de la célula miocárdica, protegiéndola y acelerando los procesos de recuperación ultraestructural que, en el fondo, son la base fisiopatológica de todos los efectos deletéreos de la isquemia (CITOPROTECCIÓN).

En los últimos años el interés se ha centrado en estos mecanismos fisiopatológicos, y en particular en el posible papel de la sobrecarga de calcio citosólico y en la formación de radicales libres. A continuación comentamos algunos de los tratamientos farmacológicos que han mostrado ser de utilidad en la prevención y disminución del daño por isquemia-reperfusion.

### 5.1.- Antagonistas del Calcio.-

Desde un punto de vista puramente histórico, la primera prueba experimental documentada en relación a la capacidad de los antagonistas del calcio de proporcionar un papel protector bajo condiciones de perfusión coronaria inadecuada pueden encontrarse en un artículo de Nayler y Szeto publicado en la década de los 70 (Nayler y Szeto, 1972). La prueba modelo se realizó en un perro toracomizado, observándose que el verapamil, cuando se utiliza de forma profiláctica, mejoraba la eficacia cardíaca al reducirse el consumo de oxígeno miocárdico. Estos hallazgos fueron seguidos por otros estudios que establecieron que el verapamil, cuando se administraba previamente a un episodio isquémico, reducía la sobrecarga de  $Ca^{2+}$ , preservando la capacidad de la mitocondria cardíaca de regenerar ATP y creatinfosfato durante la perfusión coronaria y mejorando así la recuperación funcional y morfológica (Nayler *et al.*, 1980).

A partir de estos estudios preliminares, se han realizado otras numerosas investigaciones, utilizando diversos criterios para determinar si la cardioprotección puede obtenerse en modelos animales de isquemia cardíaca mediante el empleo de calcioantagonistas. Los hallazgos incluyen :

- Reducción en la liberación de creatincinasa.
- Atenuación de la elevación del segmento ST.
- Atenuación de la ganancia de  $\text{Ca}^{2+}$ .
- Reducción del tamaño del infarto identificable morfológicamente.
- Preservación de precursores de adenina.
- Preservación de la función de bombeo cardíaca.
- Mantenimiento de las reservas tisulares de ATP y creatinfosfato.
- Preservación de la ultraestructura.
- Reducción en la movilización inducida por la isquemia de las reservas cardíacas de catecolaminas.
- Mantenimiento de la función mitocondrial.

Tan importantes como estos resultados son quizás los hallazgos más recientes relacionando la capacidad de los antagonistas del calcio de prevenir el aumento precoz de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico que se presenta cuando el miocardio se muestra isquémico, lo cual proporciona la clave de por qué estos fármacos pueden proporcionar protección en el corazón isquémico (Nayler, 1998).

Nuestro grupo ha estudiado los efectos del *nifedipino* en un modelo de isquemias repetidas de muy breve duración y de muy breve reperfusión, administrando el fármaco antes de iniciar las oclusiones y posteriormente manteniendo una perfusión continua del mismo hasta finalizar el experimento. No hemos observado diferencias significativas con el grupo no tratado en cuanto al deterioro de la contractilidad segmentaria durante los periodos de isquemia-reperfusión, aunque sí hemos visto diferencias en la recuperación del segmento con disfunción postisquémica, mostrando el grupo tratado con *nifedipino* una mejor recuperación tanto de la longitud segmentaria como de la fracción de acortamiento. Posteriormente en el análisis de la ultraestructura, observamos como las alteraciones producidas a nivel del aparato mitocondrial son menos manifiestas que las observadas en las series que no fueron tratadas, lo que sugiere que el mantenimiento de la función

mitocondrial es de gran importancia para la recuperación del miocardio con disfunción postisquémica (Pomar, 1992).

El *nisoldipino* también ha demostrado mejorar la función miocárdica administrándolo en los primeros 5 minutos de la reperfusión (Kloner y Przyklenk, 1990). En cambio se observó un mayor deterioro de la función cuando el fármaco se administró más tarde, después de establecida la reperfusión. Estos resultados sugieren que el *nisoldipino* puede atenuar el aumento de calcio citosólico durante la fase inicial de la reperfusión. Durante la reperfusión tardía, cuando el calcio citosólico vuelve a ser normal, el *nisoldipino* puede inducir una reducción del mismo, dando lugar a un agravamiento del aturdimiento miocárdico.

Resultados similares se han obtenido utilizando otros calcioantagonistas (*verapamil, diltiazem, felodipino*), siempre y cuando la administración se realice de forma preventiva (Przyklenk y Kloner, 1988; Higginsol *et al.*, 1991). En una serie experimental realizada por nuestro laboratorio el *amlodipino*, administrado desde una semana antes de la aplicación del protocolo isquémico, ha demostrado modificar de modo importante el comportamiento de la fracción de acortamiento durante todo el período de seguimiento. Durante la aplicación del protocolo isquémico dicha fracción se mantuvo en valores de hipocinesia, en contraste con los niveles de discinesia que se observaron en la serie control; así como un menor deterioro durante el seguimiento. En el estudio ultraestructural se observó en el grupo tratado con *amlodipino* un incremento mantenido y muy importante en el porcentaje de mitocondrias interfibrilares emparejadas durante el seguimiento (expresión de un proceso de mayor recambio mitocondrial) (Pallarés, 1996).

Así pues podemos observar que la mayoría de los estudios realizados indican que los antagonistas del calcio son eficaces en la mejoría del aturdimiento miocárdico siempre y cuando su administración se realice de forma preventiva antes o durante el período de isquemia, pero su papel durante la reperfusión continúa siendo en la actualidad un punto de controversia.

Pese a los claros beneficios observados en los estudios experimentales de isquemia-reperfusión, no debemos de olvidar que el modelo fisiopatológico utilizado es diferente al que nos encontramos en la clínica habitual, y es por ello que los calcioantagonistas han decepcionado cuando se analiza la incidencia de eventos clínicos graves, mortales o no, en el hombre, ejerciendo en algún caso un efecto negativo (como el *nifedipino* en el post-infarto) (Lièvre y Boissel, 1993).



## 5.2.- Inhibidores de la enzima convertidora de la angiotensina (IECAs).-

Estudios clínicos y experimentales han establecido el beneficio terapéutico de los IECAs en la reducción del tamaño del infarto, reinfarto y prevención de las arritmias por reperfusión (Pfeffer *et al.*, 1992). Los IECAs mejoran la función contráctil del miocardio aturdido por breves períodos de oclusión coronaria, aunque su mecanismo de acción está por resolver. Experiencias utilizando Captopril y Zofenopril antes de la oclusión o durante la reperfusión mejoraron la función contráctil (Westin y Mullane, 1988; Przyklenk *et al.*, 1989). Sin embargo los resultados utilizando Enalapril han sido menos concluyentes (Jay *et al.*, 1991).

La disminución de las arritmias de reperfusión provocada por los IECAs ha sido frecuentemente constatada en animales de experimentación, ya sea *in vivo* (rata y perro) o *in vitro* en el corazón aislado de rata, independientemente de la vía de administración (oral o intravenosa) (Galinier y Bounhoure, 1993).

En el modelo experimental desarrollado por nuestro grupo, hemos ensayado el efecto del Captopril en perros anestesiados, administrando una dosis de 0.25 mg/Kg de peso en bolo intravenoso durante 2 minutos antes de iniciar el protocolo isquémico (oclusión total de 1 minuto y parcial de 1 y 2,5 minutos), comparándolo con un grupo placebo. Hemos observado una mejoría significativa de los parámetros de función regional afectados durante la isquemia breve y transitoria en relación con el grupo placebo (Cosin *et al.*, 1992); sin embargo la disfunción postisquémica a los 60 minutos de la reperfusión y las alteraciones ultraestructurales han sido semejantes a las del grupo no tratado (Pomar, 1992).

El mecanismo de acción de los IECA en el contexto de la isquemia transitoria seguida por reperfusión es incierto, pero puede deberse, al menos en parte, a un aumento de la producción miocárdica de prostanoides. De hecho se ha demostrado que la infusión de prostaglandina E1 o elevadas dosis del análogo de la prostaciclina "Iloprost", tienen efectos beneficiosos similares sobre la función contráctil del miocardio aturdido (Farber *et al.*, 1988; Farber y Gross, 1989). En dicho efecto cardioprotector se ha implicado también la capacidad de los IECAs para atenuar la degradación de bradicininas endógenas (con capacidad de inducir aumento en la circulación coronaria) y descender la síntesis de Angiotensina II a partir de angiotensina I, lo que disminuiría la necrosis miocárdica y proliferación de fibroblastos (Tan *et al.*, 1991). El *cilazaprilato* parece contribuir a la preservación del metabolismo energético y a la cardioprotección en la isquemia-reperfusión gracias a una acumulación de bradicininas y a un aumento en la producción de óxido nítrico inducido por la NO sintetasa, favoreciendo la síntesis de cGMP (Matoba *et al.*, 1999).

Se ha sugerido también que los IECAs que poseen en su estructura un grupo sulfidrilo (*captopril* y *zofenopril*) pueden actuar también como barredores de los radicales libres de oxígeno, aunque esta hipótesis sigue en controversia (Westin y Mullane, 1988). El efecto beneficioso de los IECAs sobre la lesión de reperfusión parece ser debido más bien a una disminución en la formación de radicales libres, debida a su acción anti-isquémica, y a una protección a nivel de las membranas lisosomales (Galinier y Bounhoure, 1993). En un estudio realizado por KukreKa y cols. (1990) sobre la acción del *captopril* sobre los radicales libres concluyen que dicho fármaco no es un “barredor” directo del superóxido, sino que ejerce, en virtud de su grupo sulfidrilo, una acción antioxidante inespecífica, probablemente al reducir un intermediario en la compleja oxidación de epinefrina a adenocromo (reducción del citocromo c).

El tratamiento crónico con *quinapril* ha demostrado mejorar la severidad del daño miocárdico producido en un modelo de oclusión/reperfusión en conejos alimentados con dieta hipercolesterolémica. Dicha mejoría está asociada con una reducción de la acumulación de leucocitos en el miocardio, probablemente debida a una inhibición de la expresión miocárdica de *P-selectina* (molécula de adhesión entre leucocito y endotelio), lo que condicionaría un aumento en la producción de NO a través de una reducción en la degradación de las bradicininas. Dicho efecto favorable del *quinapril* es revertido por la utilización de bloqueadores de los receptores de bradicininas o inhibición de la NO-sintetasa. (Hoshida *et al.*, 1999). Todo ello traduce el posible efecto favorable del *quinapril* en aquellas situaciones que cursan con aumento en la expresión de P-selectina y deterioro de la relajación dependiente de endotelio (EDR), condiciones comunes observadas en pacientes con aterosclerosis.

Los IECAs, al igual que los antagonistas del calcio, se comportan como potentes vasodilatadores y como reductores de la postcarga, lo que plantea la posibilidad de que las modificaciones favorables del aporte y/o demanda de oxígeno puedan ser los responsables de los efectos beneficiosos de estos agentes en el contexto de la isquemia –reperfusión. Sin embargo se han obtenido mejoría significativas de la función contráctil del miocardio aturdido con *nifedipino* y *zofenopril* en ausencia de alteraciones concomitantes del flujo coronario o de los parámetros hemodinámicos sistémicos (Przyklenk *et al.*, 1989a; Przyklenk *et al.*, 1989b). De la misma forma, estudios utilizando un potente agente reductor de la postcarga como el Nitroprusiato sódico tras la reperfusión, han demostrado que no ejerce efecto sobre la recuperación de la función contráctil del miocardio aturdido.

### 5.3.- Beta-bloqueantes. Carvedilol.-

Se ha demostrado que la reducción de la demanda de oxígeno miocárdico mediante la utilización de  $\beta$ -bloqueantes, en algunos casos, atenúa la disfunción contráctil postisquémica. A este respecto, tanto la infusión de esmolol antes y durante la oclusión coronaria (Kloner *et al.*, 1985), como el pretratamiento con propranolol (Rivera *et al.*, 1992), mejoran de forma significativa el acortamiento segmentario del tejido isquémico previamente aturdido. Observamos pues que un aumento del aporte de oxígeno miocárdico y una reducción de la demanda durante el episodio de isquemia puede mejorar la recuperación de la función contráctil postisquémica, presumiblemente reduciendo la severidad de la isquemia.

Independientemente de sus acciones hemodinámicas, dichos fármacos han demostrado ejercer también un efecto metabólico. Al antagonizar los efectos de la estimulación catecolaminérgica durante la isquemia, disminuyen la liberación de ácidos grasos libres por parte de los adipocitos y mejoran la utilización de la glucosa, derivando el metabolismo hacia un mayor uso de los carbohidratos y una menor utilización de los ácidos grasos libres, pudiendo conducir a un beneficio teórico en el miocardio isquémico (Nielsen *et al.*, 1986).

En un trabajo reciente sobre corazones de cerdo, el grupo perfundido con metoprolol presentó unos niveles de malondialdehído menores en relación con el grupo control, así como mayores niveles de glutatión, lo que puso de manifiesto una reducción del daño isquémico al prevenir la peroxidación lipídica y reducir la demanda energética a través del descenso de la frecuencia cardíaca (Kalaycioglu *et al.*, 1999).

Así mismo el tratamiento crónico con propranolol mostró un efecto protector contra la isquemia/reperfusión en un modelo de corazón aislado de rata, sin ejercer ningún efecto betabloqueante, junto con un aumento en la actividad enzimática de los antioxidantes endógenos que podrían justificar este efecto beneficioso del fármaco (Khaper *et al.*, 1997).

Los  $\beta$ -bloqueantes han mostrado claramente tener un efecto beneficioso en la supervivencia a largo plazo en la enfermedad coronaria. Así se ha visto que su administración intravenosa aguda en estudios a pequeña escala han obtenido un efecto beneficioso en el IAM y en el post-IAM. Los mecanismos de dicho efecto son desconocidos, pero tal vez estén relacionados tanto con efectos hemodinámicos como metabólicos (Hjalmarson, 1997).

Otra sustancia ampliamente estudiada ha sido el carvedilol. Es un fármaco  $\beta$ -bloqueador no selectivo con propiedades especiales: alfa-1-bloqueador, inhibidor *in vitro* de los radicales libres derivados de oxígeno mediante peroxidación lipídica, así como barredor de radicales libres (Yue *et al.*, 1992a). Se ha comprobado que el carvedilol atenúa la apoptosis (muerte celular programada) (Narula *et al.*, 1996), así como también puede inhibir la proliferación de células de músculo liso (Sung *et al.*, 1993). Este efecto antiproliferativo puede evitar o incluso prevenir la progresión de la remodelación vascular que tanta importancia tiene en las anormalidades hemodinámicas coronarias. A lo anterior se añade su capacidad para reducir la inflamación gracias a que disminuye la infiltración neutrofílica (Yue *et al.*, 1992b). Tomando en consideración todas estas acciones, no es de sorprender que el carvedilol ha demostrado reducir el tamaño del infarto y la apoptosis, así como disminuir la mortalidad en modelos experimentales de daño miocárdico (isquemia-reperfusión) (Ruffolo y Feuerstein, 1997).

Se ha observado que el efecto antiapoptótico del carvedilol es más intenso que el ejercido por el propranolol, lo cual sugiere que no está relacionado exclusivamente con el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos del corazón. A partir de diversos hallazgos experimentales se ha propuesto que dicho efecto antiapoptótico sería el resultado combinado de la inhibición de la expresión del receptor proapoptótico *Fas*, del bloqueo de la vía de señales intracelulares mediada por proteínas de estrés y de sus propiedades antioxidantes (Yue *et al.*, 1998)

#### **5.4.- Inhibidores de la bomba $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .**

Diversos autores han comunicado los beneficios de reducir la entrada de  $\text{Na}^+$  a la célula, inhibiendo la bomba de intercambio  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  o mediante el bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$ , en cuanto a la recuperación de un corazón postisquémico. Entre estas sustancias encontramos como prototipo el *Amiloride* (un agente utilizado en la clínica como diurético) (Meng *et al.*, 1993) y una serie de análogos de éste como el Dietilamiloride (Meng y Pierce, 1991) y metil-isobutilamiloride (Moffat y Karmazyn, 1993). Todas estas sustancias han demostrado ejercer ciertos efectos durante la isquemia-reperfusión, como son: mejora de los parámetros hemodinámicos, mejora de la función contráctil y la presión diastólica final, así como una disminución en la liberación intracelular de enzimas, con menor daño ultraestructural, disminución de arritmias y una menor utilización de energía (ahorro de glucógeno y preservación de los depósitos de fosfatos). Pese a ello, no suelen utilizarse en clínica dado los frecuentes efectos secundarios que conllevan: interacción con los canales lentos de calcio y potasio, disminución de la tensión generada en el corazón, etc. (Pierce *et al.*, 1993).

Otro agente no antiarrítmico, pero no obstante con propiedades bloqueantes del sodio es el R 56865 (N- (1-(4-(4-fluorop-henoxy) butyl)-4 piperidiny)-N-methyl-2-benzothiazolamine; Jansen Research Foundation, Belgium). Este agente ha demostrado mejorar la recuperación de la función, preservando la ultraestructura y suprimiendo las arritmias postreperusión en el conejo (Chen *et al.*, 1993). Su mecanismo es la modulación de la entrada de  $\text{Na}^+$  a través de los canales rápidos de  $\text{Na}^+$ .

Recientemente un inhibidor de la bomba  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , el SM-20550 ha mostrado un efecto cardioprotector al reducir el tamaño del infarto, el sangrado intramiocárdico y la aparición de fibrilación ventricular en un modelo canino de isquemia-reperusión, debido, en parte, a un efecto protector a nivel microvascular (Ito *et al.*, 1999).

### 5.5.- Óxido nítrico (NO).-

El NO es un modulador esencial en los sistemas biológicos, incluyendo el sistema cardiovascular. Numerosos estudios han demostrado el efecto beneficioso y perjudicial de los efectos del NO en la regulación fisiológica y control del sistema cardiovascular (Xi *et al.*, 1999). Por una parte, el NO es por sí un radical libre y puede formar peroxinitrito, un potente oxidante que puede causar la peroxidación lipídica de la membrana celular, originando disfunción miocárdica (Wang y Zweier, 1996). En contraste, el NO es el modulador del tono del músculo liso vascular, pudiendo ejercer una acción cardioprotectora durante la isquemia/reperusión mediante la vasodilatación coronaria y la reducción del consumo de oxígeno miocárdico a través de la regulación del GMPc (Weis *et al.*, 1994). El tratamiento previo con donantes de NO se ha relacionado con un efecto beneficiosos sobre el miocardio isquémico, así como un efecto antiarrítmico y anti-infarto (Nakanishi *et al.*, 1992). Recientemente, se ha sugerido un posible efecto iniciador y mediador del NO en el preconditionamiento isquémico (Qiu *et al.*, 1997).

El efecto cardioprotector del NO puede realizarse tanto a través de mecanismos dependientes del GMPc como independientes. Puede modular los canales de potasio ATPdependientes ( $\text{K}_{\text{ATP}}$ ) a través del segundo mensajero GMPc. Éste es capaz de fosforilar los canales  $\text{K}_{\text{ATP}}$  para proteger al miocardio. La apertura de estos canales parece ejercer una acción protectora al incrementar la corriente de potasio hacia el exterior, acortando así el potencial de acción y permitiendo una menor entrada de calcio al miocito a través de los canales voltaje-sensibles (Gross y Auchampach, 1992). El descenso de la sobrecarga intracelular de calcio puede reducir el daño isquémico y conducir a una mejor preservación miocárdica.

## 5.6. Fármacos antioxidantes.-

Los antioxidantes miocárdicos son definidos como sustancias que inhiben o retrasan el daño oxidativo a las proteínas celulares, carbohidratos, lípidos y ADN. Estas sustancias pueden actuar a través de diferentes mecanismos: a) “barredores” de los radicales libres o sus precursores, b) inhibidores de la formación de radicales libres, c) atenuando la catalisis de la generación de radicales libres a través de la unión con metales, d) incrementando la producción de antioxidantes endógenos y e) reduciendo la muerte celular apoptótica a través de la estimulación de genes antiapoptóticos (*Bcl-2*) (Dhalla *et al.*, 2000).

Apoyando la importancia de los radicales libres como mecanismo causante de aturdimiento, numerosos investigadores han demostrado que agentes barredores de radicales libres como la superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa, administrados antes y durante los episodios de isquemia, atenúan la disfunción postisquémica (Jeroudi *et al.*, 1990; Bolli, 1991). Este “barredor” de radicales libres fue utilizado inicialmente con entusiasmo, sin embargo su beneficio en humanos no ha sido totalmente satisfactorio. En un estudio llevado a cabo por Flaherty *y cols.* (1994) donde se utilizó el SOD en pacientes sometidos a angioplastia directa o de rescate, no se encontró mejoría sustantiva en el grupo tratado con SOD, a excepción de una menor incidencia de arritmias en el grupo tratado en las horas tempranas post-angioplastia, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas en la incidencia general de taquicardia y fibrilación ventriculares.

Otra sustancia analizada es la vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol). Ratas tratadas con vitamina E mostraron un descenso en la mortalidad y el tamaño del infarto debido a la oclusión coronaria en aproximadamente un 50%, comparado con el grupo control; así mismo las alteraciones arrítmicas también fueron atenuadas de forma significativa (Sethi *et al.*, 2000). Adicionalmente, los suplementos de vitamina E previnieron la depresión de la función ventricular izquierda, así como la elevación de malondialdehído en el corazón infartado, indicando que los efectos beneficiosos de la vitamina E pueden deberse a una reducción del stress oxidativo. A pesar de la evidencia del efecto protector de la vitamina E en modelos animales de isquemia/reperfusión, siguen siendo contradictorios los datos obtenidos en estudios observacionales y epidemiológicos en el hombre (Spencer *et al.*, 1999; Dhalla *et al.*, 2000). La hipótesis que sugiere que la vitamina E puede actuar en una segunda línea defensiva puede explicar en parte estos datos contradictorios. El efecto beneficioso estaría en relación con el grado de producción de radicales libres y consecuentemente con la severidad de la enfermedad coronaria (ej. La vitamina E sería más eficaz en pacientes con infarto de miocardio masivo que en pacientes con angina de pecho).

El *alopurinol* inhibe la xantina-oxidasa, oponiéndose así a la producción de aniones superóxido en el curso de la isquemia. Los resultados son discordantes, habiendo fracasado en el hombre al ser casi inexistente esta vía metabólica (Eddy *et al.*, 1987).

Los quelantes de los metales, como la *deferoxamina*, son utilizados para disminuir la producción de radicales hidroxil en el curso de la reacción de Fenton. Se han obtenido resultados interesantes en el curso de la protección miocárdica quirúrgica (Menasche *et al.*, 1990)

Otros neutralizadores de radicales libres como la *dimetiltiourea*, han demostrado mejorar la disfunción contráctil del miocardio aturcido por breves episodios de isquemia. Así Bolli *y cols.* (1987), administrándola en el corazón del perro sometido a una oclusión de 15 minutos, iniciando la infusión de dimetiltiourea tres minutos antes de la oclusión y manteniendo ésta durante 45 minutos, observaron tras 4 horas de reperfusión una mejoría significativa en la recuperación de ese miocardio. Sin embargo, su empleo en el hombre está limitado por su toxicidad (Zimmerman, 1991).

Recientemente, el *transresveratrol*, un antioxidante presente en el vino tinto, ha mostrado poseer una acción protectora en un modelo experimental de isquemia-reperfusión en el corazón aislado de ratas, atribuido a una actividad "scavenger" de los radicales peroxilo (Ray *et al.*, 1999).

## **5.7. Otros fármacos.-**

### **5.7.1.- Adenosina.-**

La observación de que tanto la isquemia regional como la global se asocian a una rápida deplección de fosfatos de alta energía, incluyendo ATP, sugiere que una de las causas de la disfunción contráctil postisquémica es una deficiencia en el aporte energético. Por ello se han investigado en la isquemia-reperfusión sustancias como la adenosina (nucleótido purínico producido endógenamente), que aceleran la replección de ATP después de la isquemia global o regional (Randhawa *et al.*, 1993) Así Bolling *y cols.* (1990) demuestran que la administración de adenosina en una solución cardiopléjica e infundida a corazones aislados de conejo sometidos a 120 minutos de isquemia global, repleccionaban de forma significativa el ATP, asociándose a una mejoría de los parámetros funcionales, tanto sistólicos como diastólicos, de la función ventricular. La adenosina ha demostrado disminuir los requerimientos basales de oxígeno, la secreción de catecolaminas e inhibir la activación de plaquetas y neutrófilos, así como un efecto beneficioso a nivel de la

vasodilatación coronaria directa e inhibición de la síntesis de tromboxano (Forman *et al.*, 1993). En modelos animales se ha encontrado disminución del tamaño del infarto al utilizar adenosina antes de la reperfusión (Olafsson *et al.*, 1987). Hasta la fecha, se sigue estudiando su seguridad en humanos.

#### 5.7.2.- Ketorolaco.-

Dado que la sobrecarga de calcio en el citosol ejerce un efecto fundamental en la lesión de isquemia/reperfusión, resulta de gran importancia la utilización de fármacos que eviten dicha acumulación en el citoplasma, como el Ketorolaco [ácido(+) 5benzoil-2,3-dihidro-1H-pirrolizina-1carboxílico]. Este analgésico no esteroideo parece proteger a las células miocárdicas contra el daño inducido por la reperfusión en corazones isquémicos, evitando el desencadenamiento de arritmias ventriculares letales junto con una menor elevación enzimática, restaurando en último término todas las funciones celulares con la oxigenación (Pichardo *et al.*, 1994).

#### 5.7.3.- RheothRx (Poloxámero 188).

El Poloxámero 188 es un co-polímero no iónico tensoactivo que posee efectos hemorreológicos, originando una reducción de la agregación celular eritrocitaria y un incremento del flujo sanguíneo microcirculatorio. En animales de experimentación ha demostrado la disminución del daño por reperfusión, probablemente debido a la inhibición de la función de los neutrófilos. Este compuesto ha sido probado en un estudio aleatorizado que incluyó a 114 pacientes con IAM, los cuales fueron sometidos a infusión de poloxámero durante 48 horas al inicio de la terapia trombolítica. Los resultados señalaron la presencia de infartos significativamente menores, mayor salvación de tejido miocárdico determinado por medicina nuclear, mejor función ventricular y una menor incidencia de reinfaros intrahospitalarios (Schaer *et al.*, 1996).

#### 5.7.4.- Sulfato de magnesio.-

Muchos estudios en animales y estudios clínicos sugieren que el uso de magnesio, un bloqueador fisiológico de los canales de  $Ca^{++}$ , puede ser eficaz para disminuir el daño miocárdico por reperfusión. A pesar de los resultados previamente satisfactorios, el estudio ISIS-4 aportó datos contradictorios acerca del beneficio terapéutico del magnesio en el daño por reperfusión (Steurer *et al.*, 1996). Sin embargo el estudio LIMIT-2, que incluyó a 2.316 pacientes demostró una disminución significativa en la incidencia de disfunción ventricular izquierda (11.2% vs 14.9%  $p=0.009$ ) y supervivencia a 28 días (10.3% vs 7.8%  $p=0.04$ ) en



el grupo tratado con magnesio vs placebo, respectivamente (Woods *et al.*, 1992). Se necesitan aún mayores estudios con un diseño más estricto para determinar el beneficio real del magnesio.

#### 5.7.5.- Indapamida.-

La *indapamida*, un agente antihipertensivo con actividad diurética y vasodilatadora directa, posee efectos en diferentes sistemas interrelacionados que contribuyen a la protección del aparato cardiovascular: entre otros estimula la síntesis de prostaciclina, reduce la agregación plaquetaria y estimula la vasodilatación a través del factor relajante derivado del endotelio en presencia de bradicininas (Campbell y Brackman, 1990). La *indapamida* y su metabolito *5-hydroxyindapamida*, parecen poseer cierto efecto en la “amortiguación” de la actividad de los radicales libres, muy similar al  $\alpha$ -tocoferol e inhibir la peroxidación del ácido linoleico provocada por el superóxido originado por la hipoxantina-xantina oxidasa (Tamura *et al.*, 1987). El mecanismo de protección de la *indapamida* contra los radicales libres es desconocido.

#### 5.7.6.- Nuevos fármacos antiapoptóticos.-

Las caspasas constituyen una familia de proteasas que juegan un papel esencial en la ejecución de la apoptosis. Diferentes sustancias que inhiben dichas proteasas, como el *ZVAD-fmk*, el *IGF-1* y el *YVAD-cmK*, han demostrado en estudios experimentales una disminución de la apoptosis miocárdica en situaciones de isquemia, así como una reducción del área del infarto y un menor remodelado de la pared ventricular (Yaoita *et al.*, 1998; Holly *et al.*, 1999). En conjunto todos estos estudios indican que es posible bloquear el proceso de la apoptosis de los cardiomiocitos durante el insulto isquémico del miocardio y que en el futuro podrían desarrollarse las estrategias terapéuticas correspondientes.

## 6.-TERAPIA METABÓLICA.-

### 6.1.- Moduladores metabólicos.-

Ya hemos visto que el metabolismo energético del miocardio durante la isquemia y durante la reperfusión están íntimamente relacionados con la función cardíaca, constituyendo un punto importante de intervención terapéutica. Ésta se puede conseguir actuando a 3 niveles: 1) Aumentando la glucólisis miocárdica, ya sea incrementando la extracción de glucosa durante la isquemia o bien aumentando los niveles de glucógeno antes del procedimiento quirúrgico que condicione isquemia (ej. cirugía de bypass o trasplante cardíaco); 2) Directamente activando el complejo piruvato-deshidrogenasa y aumentando la oxidación de los carbohidratos; o 3) Inhibiendo la oxidación de los ácidos grasos, aumentando así la oxidación de los carbohidratos.

#### 1) Aumentar el suplemento de glucosa al corazón.-

La presencia de glucosa durante el periodo hipóxico también juega un papel importante en la prevención del daño por reoxigenación. Cuando el músculo papilar cardíaco es privado de glucosa y oxígeno, aparecen arritmias dependientes de  $Ca^{2+}$ , y cuando la glucosa es añadida durante el periodo hipóxico previene el desarrollo de arritmias en el periodo de reperfusión, así como la contractura isquémica producida en dicho periodo. Esto se ha explicado por dos mecanismos; en uno de ellos se propone que la glucosa interviene como un agente antioxidante, manteniendo el flujo a través de la vía de las pentosas (y, por lo tanto, niveles altos de NADPH y, en consecuencia, de glutathion reducido); en el otro mecanismo se propone que la glucosa mantiene un continuo aporte de energía y con esto se conserva el control de  $Ca^{2+}$  citosólico (Opie *et al.*, 1985). Un efecto adicional consiste en el hecho de que aportar glucosa e insulina puede disminuir las concentraciones sanguíneas de ácidos grasos al inhibir la lipólisis (Opie, 1995).

Los niveles plasmáticos de insulina regulan directamente el metabolismo miocárdico de carbohidratos a través de la estimulación del transporte de glucosa al interior del miocito (al incrementar la incorporación de GLUT 1 y GLUT 4 a la membrana sarcolémica), e indirectamente al inhibir la lipólisis en los adipocitos y disminuir así los niveles de ácidos grasos (Young *et al.*, 1997). La insulina también estimula la actividad de la hexokinasa y la síntesis de glucógeno, resultando de ello un aumento en la fosforilación de la glucosa y en la síntesis de glucógeno. El mecanismo de este efecto en el corazón es desconocido, pero probablemente pueda ser debido en parte a un incremento en la glucosa y

la glucosa-6-fosfato, que ocurre tras la estimulación de los transportadores de glucosa por parte de la insulina.

Se ha demostrado que agregar glucosa durante la reperfusión produce una recuperación casi total de la función contráctil y preserva los niveles de ATP y fosfocreatina (Vanoverschelde *et al.*, 1994).

Aunque inicialmente concebida como *solución "polarizante"* por Sodi-Pallarés (1962) y posteriormente propuesta como *barredor de radicales libres* por Hess (1983), la solución de glucosa-insulina-potasio (GIK) ha sido utilizada con la finalidad de mejorar la función contráctil del miocardio isquémico. Con este fundamento teórico, Gradinac *y cols.* (1989) utilizaron dicha solución en sujetos con evidencia preoperatoria de disfunción ventricular izquierda, sometidos a cirugía de revascularización coronaria con circulación extracorpórea. Lograron demostrar que aquellos a los que se administraba dicha solución presentaban un mayor incremento en el índice cardíaco y requerían menos tiempo el balón de contrapulsación aórtica y menor apoyo inotrópico. En forma indirecta el estudio DIGAMI parece apoyar la utilidad de glucosa para prevenir el daño por reperfusión en el sentido de que estos investigadores lograron demostrar una menor mortalidad a un año (18.6%) en los sujetos diabéticos tratados con infusión de insulina y glucosa, en las primeras 24 horas del infarto, seguida por inyecciones subcutáneas en múltiples dosis diarias por 3 meses, en comparación con los que recibieron terapia estándar (26.1%) (Malmberg *et al.*, 1995). Un beneficio similar se puso de manifiesto en el reciente estudio ECLA (Estudios Cardiológicos Latinoamérica), un gran estudio prospectivo y randomizado que valoró la utilidad de la GIK en el IAM, y que objetivó una disminución del 66% en el riesgo de mortalidad relativa intrahospitalaria al añadir GIK a la reperfusión (95% trombolisis, 5% angioplastia primaria) en relación con la reperfusión sola; el riesgo de mortalidad absoluta descendió del 15,2% al 5,2% (Díaz *et al.*, 1998). Esta reducción de mortalidad solo se observó en el grupo de 252 pacientes que recibieron terapia de reperfusión conjuntamente; por contra los pacientes que no recibieron reperfusión no obtuvieron beneficio con la GIK.

Los beneficios de la GIK también se han objetivado en otras situaciones, como es la cirugía aortocoronaria. En un estudio prospectivo y randomizado sobre pacientes con angina inestable sometidos a cirugía, el grupo tratado con GIK (antes y hasta 12 horas después de la cirugía) mostró un 40% de incremento en el índice cardíaco en relación con el grupo control ( $p < 0.0001$ ), así como una menor necesidad de soporte inotrópico (Lazar *et al.*, 1997).

## 2) Estimular la oxidación de la glucosa.-

Numerosos estudios experimentales han demostrado que la estimulación de la oxidación de la glucosa durante y tras la isquemia puede beneficiar al corazón isquémico (Taetgmeyer *et al.*, 1998). Al mejorar el acoplamiento de la glucólisis a la oxidación de la glucosa, la producción de protones disminuye, resultando un descenso en la acidosis del tejido y una mejoría en la eficiencia cardíaca. Farmacológicamente la oxidación de la glucosa puede aumentarse directamente estimulando la piruvato-deshidrogenasa o, indirectamente, disminuyendo la ratio intramitocondrial acetyl CoA/CoA:

### A) *Activador del complejo piruvato-deshidrogenasa.*

*Dicloroacetato*, el prototipo de esta clase, actúa inhibiendo la piruvato-deshidrogenasa quinasa, previniendo la fosforilación-inactivación del complejo piruvato-deshidrogenasa. Ello conduce a un aumento en la oxidación de la glucosa y del lactato, y una elevación del acetyl CoA mitocondrial derivado de los carbohidratos. Dicho fármaco ha mostrado reducir el MVO<sub>2</sub> y los indicadores de estrés isquémico en un modelo canino de oclusiones breves (Khales *et al.*, 1982). También ha demostrado una mejoría en la recuperación de la función mecánica tras la isquemia en estudios experimentales sobre corazones de rata (McVeigh y Lopaschuk, 1989). La eficacia clínica del *dicloroacetato* como agente antiisquémico también ha sido mostrada en pacientes coronarios. Desgraciadamente dicho fármaco no es demasiado potente y se requieren altos niveles sanguíneos para aumentar la oxidación de la glucosa por parte del miocardio. Otra limitación de la sustancia es su corta vida media tras administración oral e intravenosa (Stacpoole, 1989).

### B) *Disminución de la ratio acetyl CoA/CoA.*

Un agente que ha suscitado interés en cuanto a su aplicación en el aturdimiento ha sido la *Carnitina*. Como hemos visto previamente, la isquemia produce una rápida inhibición de los procesos oxidativos y reducción de la carnitina libre con el consiguiente aumento de ácidos grasos libres y metabolitos intermediarios (como el Acyl-Coa de cadena larga). El acúmulo de estos metabolitos dará lugar a efectos perjudiciales sobre las células (desintegración de membranas, inhibición de la actividad enzimática) (Opie, 1979). La acción de *L-carnitina* se lleva a cabo a nivel mitocondrial, favoreciendo el transporte de dichos ácidos grasos al interior de la mitocondria, donde se encuentran los enzimas necesarios para llevar a cabo el proceso de oxidación con la consiguiente producción de energía (ATP). Además de este papel metabólico crítico, L-carnitina también es importante

en la regulación de la oxidación del piruvato en el corazón, y su administración ha mostrado aumentar la oxidación de la glucosa. Ello ocurre secundariamente a un aumento de la actividad del complejo piruvato-deshidrogenasa, debida a una disminución de la relación mitocondrial acetil CoA/CoA (Broderick *et al.*, 1993).

Diversos trabajos han demostrado tanto a nivel experimental como clínico la acción beneficiosa de la *L-carnitina* en la isquemia miocárdica, ejerciendo un efecto cardioprotector (Liedtke *et al.*, 1988). En un estudio realizado por nuestro grupo sobre perros, se objetivó como la serie pretratada con *L-carnitina* mostró durante la inducción de los procesos de isquemia/reperfusión pocas diferencias con respecto al grupo control en cuanto a la fracción de acortamiento. Ello contrastó con una recuperación de dicha fracción de acortamiento mucho más precoz en el grupo tratado con *L-carnitina*, así como un porcentaje de mitocondrias dañadas significativamente inferior a la serie control en el estudio estructural, junto con un gran incremento en el número de mitocondrias emparejadas durante todo el período de seguimiento (interpretado como un aumento en la actividad mitocondrial y su renovación inducida por el tratamiento) (Pallarés, 1996).

Clínicamente, *L-carnitina* y *propionyl L-carnitina*, han mostrado poseer propiedades antiisquémicas. Ambas sustancias pueden disminuir la depresión del segmento ST y la presión ventricular telediastólica durante la prueba de stress en pacientes con enfermedad coronaria (Thomsen *et al.*, 1979; Bertels *et al.*, 1994).

En un estudio multicéntrico el tratamiento con *L-carnitina* iniciado de forma precoz en el IAM y continuado durante 12 meses fue seguido de una atenuación de la dilatación ventricular izquierda, traducido en un menor volumen ventricular izquierdo (Iliceto *et al.*, 1995).

Además de sus efectos directos cardíacos, ambas sustancias tienen capacidad de alterar la función metabólica en el músculo esquelético. Un estudio multicéntrico en pacientes con claudicación intermitente mostró que *propionil L-carnitina* mejoraba significativamente la distancia máxima de marcha en un test de esfuerzo con treadmill (Brevetti *et al.*, 1995). Queda por determinar si dichas sustancias incrementan la oxidación de la glucosa en el músculo esquelético de forma similar a la del corazón.

### 3) Inhibidores de la oxidación de los ácidos grasos.-

Dado que el aumento de la oxidación de los ácidos grasos disminuye la oxidación de la glucosa, una aproximación para aumentar la oxidación de la glucosa es la inhibición de los ácidos grasos. Ésta se puede conseguir mediante 2 mecanismos:

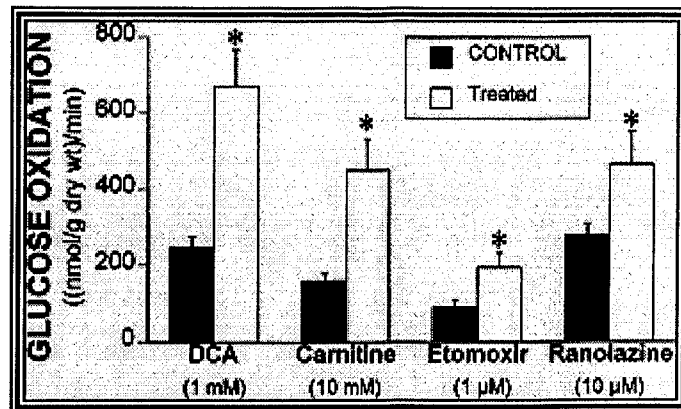
#### A) *Inhibiendo directamente la $\beta$ -oxidación.*

La *ranolazina* es un nuevo agente anti-isquémico (de estructura similar a la trimetazidina, que veremos después) que ha demostrado efectos cardioprotectores beneficiosos en el corazón isquémico, sin alterar los parámetros hemodinámicos ni contráctiles basales *in vivo* e *in vitro* (McCormack *et al.*, 1996). Estudios clínicos han confirmado los resultados experimentales y han mostrado que dicha sustancia, además de tener una buena tolerancia, posee propiedades anti-isquémicas. En pacientes con angina crónica estable, la *ranolazina* disminuye la frecuencia de las crisis anginosas y el consumo de nitroglicerina, así como incrementa el tiempo de ejercicio en la prueba de esfuerzo. Estas mejoras en los parámetros de la prueba de esfuerzo son comparables en magnitud al efecto de los  $\beta$ -bloqueantes y los antagonistas del calcio, produciéndose en ausencia de cambios en la frecuencia cardíaca y la presión sanguínea (Cocco *et al.*, 1992). Recientes evidencias han mostrado que la *ranolazina* actúa mediante la optimización del metabolismo energético, con disminución de la oxidación de los ácidos grasos en el corazón y aumento en la oxidación de la glucosa, tanto en condiciones de normoxia como de hipoxia. El mecanismo de acción es desconocido, pero tal vez sea debido a una inhibición directa de la  $\beta$ -oxidación de los ácidos grasos (McCormack *et al.*, 1996).

#### B) *Inhibiendo la carnitina-palmitoyl-transferasa.*

Dado que la carnitina-palmitoyl-transferasa I es el principal escalón limitante en la oxidación de los ácidos grasos, representa un lugar con un importante potencial terapéutico para reducir la oxidación de los ácidos grasos durante la reperfusión. Uno de estos fármacos es la *oxfenicina*, la cual ha demostrado bloquear efectivamente cualquier incremento de la utilización miocárdica de ácidos grasos asociado a elevaciones de los ácidos grasos libres en el plasma en un modelo porcino durante normoxia (Schwartz *et al.*, 1994). Durante la isquemia en un modelo aislado de ratas, sin embargo, solo se ha obtenido una pequeña mejoría en la función durante la reperfusión, y un pequeño descenso en la acumulación de intermediarios de ácidos grasos de cadena larga (Meehan y Higgins, 1994). Otro fármaco, el *etomoxir*, ha demostrado poseer eficacia antiisquémica, con mejoría de la función cardíaca durante la recuperación de la isquemia. Sin embargo su administración

prolongada se ha asociado con problemas tóxicos, y en particular la producción de hipertrofia cardíaca (Rupp *et al.*, 1995).

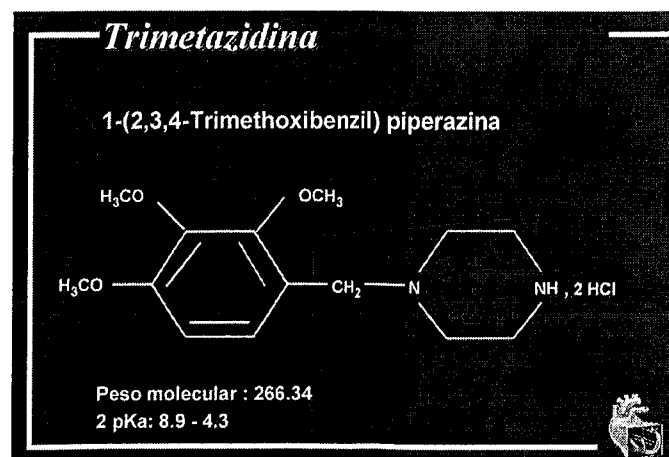


**Figura I.13.-** Efectos del tratamiento con dicloroacetato (DCA), carnitina, etomoxir y ranolazina en la oxidación de la glucosa en ratones aislados de rata bajo condiciones no isquémicas (Stanley *et al.*, 1997). \*  $p < 0.05$ .

## 6.2.- TRIMETAZIDINA.-

La trimetazidina ( 1-(2,3,4-trimetoxibencil) piperacina, diclorhidrato) se introdujo en Medicina hace más de 30 años para el tratamiento clínico de la isquemia. Desde esa fecha numerosas investigaciones experimentales han analizado esta droga para determinar su mecanismo de acción. Parece ser que, en contraste con las clásicas drogas antianginosas, la TMZ actúa directamente sobre la célula isquémica.

### 6.2.1.- Fórmula desarrollada.-



**Figura I.14.-** Fórmula de la TMZ.

### 6.2.2.- Farmacocinética.-

Los estudios de farmacocinética realizados en adultos sanos (De Greave y Campbell, 1985; Royer, 1986) demuestran que la TMZ:

- Se absorbe rápidamente, y en casi su totalidad, a nivel del aparato gastrointestinal, con una biodisponibilidad elevada al presentar un metabolismo de primer paso hepático mínimo;
- El porcentaje de unión a proteínas plasmáticas es muy bajo, y limita el riesgo de interacción con otros fármacos de elevada unión a proteínas plasmáticas;
- Su cinética es independiente de la vía de administración (oral o IV) y del tiempo, de manera que no existen riesgos de acumulación tras una administración prolongada del fármaco;
- Presenta una relación lineal entre su cinética y la dosis;
- Tiene un amplio volumen de distribución;
- No se metaboliza de forma importante en el hombre, presentado un aclaramiento hepático reducido y eliminándose rápidamente, fundamentalmente por vía urinaria.

-Semi-vida plasmática( $t_{1/2}$ ): $5.95 \pm 0.50$ h.
-Constante velocidad de eliminación ( $\lambda$ ): $0.1249 \pm 0.097$ h <sup>-1</sup>
-Biodisponibilidad oral: $0.971 \pm 0.173$
-Aclaramiento total: $39.36 \pm 3.53$ l/h.
-Volumen distribución: $313.3 \pm 49.1$ l.
-Concentración plasmática máxima ( $C_{max}$ ): $27.5 \pm 13.0$ ng/ml.
-Plazo obtención $C_{max}$ : $0.300 \pm 0.037$ h.
-Constante de absorción digestiva: $1.881 \pm 0.346$ h <sup>-1</sup> .

**Tabla I.5.-** Parámetros farmacocinéticos (Royer, 1986).



### 6.2.3.- Actividad farmacológica.

Los trabajos experimentales realizados en células, tejidos u órganos aislados y en el animal entero demuestran que la TMZ actúa a nivel del metabolismo celular, oponiéndose, punto por punto, a todas las consecuencias que el déficit de oxígeno induce en la célula isquémica, comportándose como un verdadero agente antiisquémico. Así se ha observado que la TMZ:

1. Limita la acidosis intracelular (Lavanchy *et al.*, 1987);
2. Reduce la acumulación de Na<sup>+</sup> y Ca<sup>++</sup> (Renaud, 1988);
3. Mantiene las concentraciones intracelulares de ATP y disminuye la liberación de creatinfosfocinasa (Alliberdi *et al.*, 1998);
4. Protege frente al daño de la membrana celular inducido por radicales de oxígeno libres (Maridonneau-Parini y Harpey, 1987).
5. Inhibe la infiltración de neutrófilos (Williams *et al.*, 1993).

### 6.2.4.- Tolerancia y toxicidad-

Todos los estudios de toxicología efectuados con el diclorhidrato de trimetazidina revelan que (Bromont P, Servier):

- La dosis letal 50 representa, por vía IV, de 70 a 120 veces la dosis prevista en terapéutica humana y alcanza 1600 veces la dosis terapéutica después de la administración oral;
- La dosis máxima tolerada es superior a 2.000 veces la dosis terapéutica;
- La sintomatología clínica comprobada con dosis importante de diclorhidrato de trimetazidina está en relación con una actividad farmacológica inductora de vasoplegía, conocida y observada únicamente en presencia de dosis elevadas de la sustancia;

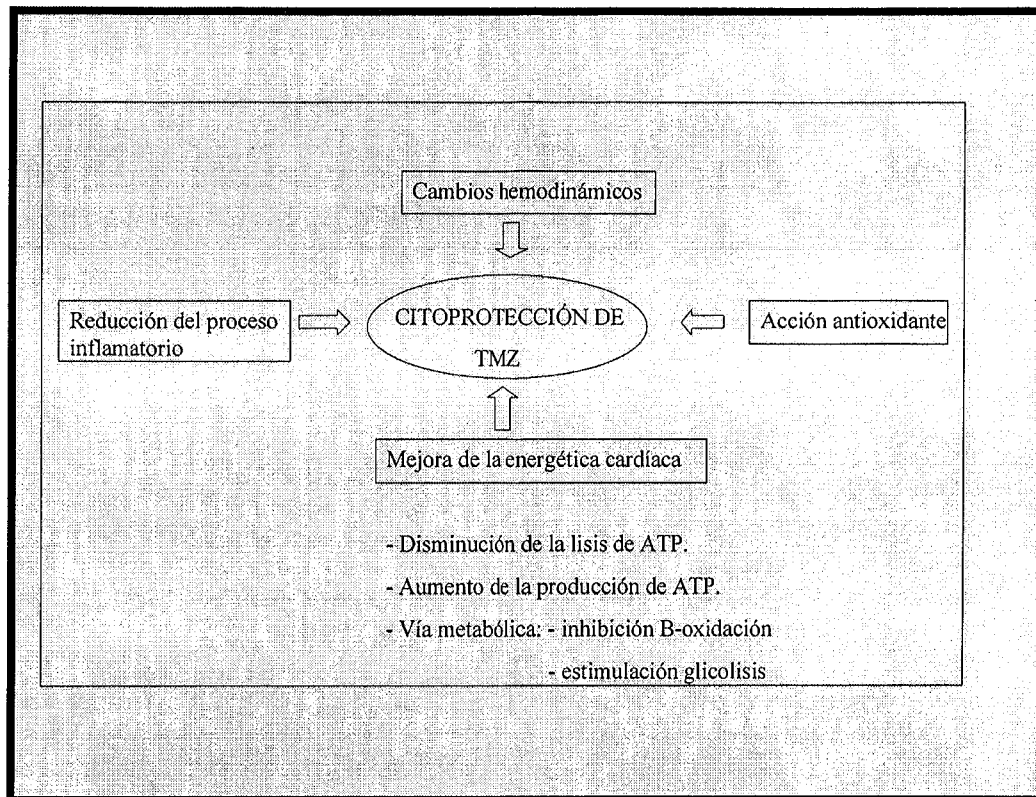
- La administración oral de dosis que alcanzan hasta 100 veces la dosis prevista en terapéutica humana no genera ninguna modificación de las funciones de la reproducción; fertilidad, fecundación, gestación, embriogénesis, lactancia, desarrollo peri y postnatal y capacidades reproductoras de los animales salidos de la generación tratada;
- El diclorhidrato de trimetazidina no presenta ninguna toxicidad genética.

Desde el inicio de los ensayos clínicos en 1979, la TMZ ha sido objeto de numerosos estudios clínicos en diferentes indicaciones. Estos estudios han permitido valorar a más de 7000 pacientes tratados con dicho fármaco durante períodos que oscilaron entre algunas horas (administración única) y 6 meses. La tolerancia a la TMZ en el conjunto de estos estudios ha sido buena. Se han descrito algunos efectos indeseables raros, tales como náuseas, epigastralgia, prurito o cefalea, siempre banales y que sólo excepcionalmente han obligado a interrumpir el tratamiento (menos del 1%).

Si se examinan con más detalle los estudios controlados, se observa que el número de efectos secundarios de la TMZ no difiere significativamente del obtenido con placebo, siendo de origen funcional en ambos casos y sin modificación alguna de los parámetros biológicos. Incluso cuando se ha comparado con otros antianginosos, la TMZ ha presentado una mejor tolerancia (Monpere *et al.*, 1990).

#### **6.5.- Hipótesis del mecanismo de acción.-**

El lugar preciso de acción de la TMZ y el orden cronológico de los efectos descritos no se conoce aún en profundidad. Los diferentes mecanismos de acción de la TMZ que se implican en su efecto cardioprotector están recogidos en la figura I.15.



**Figura I.15.-** Hipótesis del mecanismo de acción de la TMZ.

**1).- A través de cambios hemodinámicos.**

Esta hipótesis puede ser eliminada. El efecto inotrópico y cronotrópico negativo es evidente solo a altas dosis ( $10^{-4}$  M), cuando la molécula probablemente ejerce un efecto en la membrana no-específico, con reducción en el flujo lento de  $Ca^{++}$ . Clínicamente a dosis relevantes, entre  $3\text{mg.Kg}^{-1}$  y  $10\text{ mg.Kg}^{-1}$ , incluso en administración intravenosa, la TMZ no afecta a los parámetros hemodinámicos, a pesar de su acción citoprotectora en animales de experimentación ni en pacientes con enfermedad coronaria (Pornin *et al.*, 1990). Así mismo, tampoco parece influir en la circulación coronaria (Timour *et al.*, 1990). Desde este punto de vista, la acción de la TMZ es innovadora con respecto a otros antianginosos clásicos como los calcioantagonistas y los betabloqueantes.

**2).- Reducción de la toxicidad de radicales libres derivados del oxígeno.-**

Ya hemos visto que durante la realización de una isquemia marcada y prolongada, se produce un deterioro de los mecanismos defensivos de la toxicidad del oxígeno, en particular el descenso de la actividad de la superóxido-dismutasa y la deplección del

contenido de glutatión reducido. La reoxigenación postisquémica provoca una marcada formación de radicales libres que no pueden ser eliminados por los miocitos previamente isquémicos. Ello conduce a un estrés oxidativo y secundariamente a un daño lipoperoxidativo a nivel de las membranas.

Algunos autores han hipotetizado que la TMZ podría interferir, directamente o mediante metabolitos, en la reducción de dicha toxicidad. Esta hipótesis es interesante, pero no está fuertemente avalada por los datos disponibles ni por la estructura química de la molécula. Algunas publicaciones han descartado el efecto antioxidante o "barredor" de la TMZ. A pesar de ello, existen otras publicaciones que evidencian un posible efecto barredor por parte de la TMZ (Maridonneau-Parini *et al.*, 1987), si bien los métodos utilizados son bastante criticados, como es la determinación de malonaldehído durante la reperfusión mediante técnica del ácido tiobarbitúrico.

### **3).- Reducción de la reacción inflamatoria.-**

Se ha propuesto que la TMZ puede tener un efecto favorable en la isquemia miocárdica al reducir la infiltración de neutrófilos, si bien solo es avalada por una única publicación científica (Williams *et al.*, 1993). Se precisan estudios más profundos antes de avalar esta hipótesis.

### **4).- Mejora en el metabolismo energético.**

Datos de Guarnieri y cols. (1997) sugieren que, en condiciones fisiológicas, la TMZ incrementa la eficiencia de la fosforilación mitocondrial a través de un aumento de la extracción de  $Ca^{++}$  fisiológico, estimulando secundariamente diversas enzimas de la cadena respiratoria. Indudablemente esto es un efecto importante e innovador. Sin embargo, la cantidad de ATP producido a través de éste mecanismo y la posibilidad de que éste se produzca en la administración in vivo todavía necesita ser clarificada.

Desgraciadamente no está aclarado que este mecanismo ocurra en casos de isquemia. Sin embargo, en estas condiciones, la TMZ ha mostrado reducir la acidosis intracelular significativamente, principalmente debido a una acumulación de NADH secundario para mantener los defectos en la oxidación mitocondrial. Actualmente existe evidencia indirecta de que la TMZ mejora la función mitocondrial residual bajo condiciones de isquemia. Más aún, la TMZ ha mostrado mejorar la refosforilación de los nucleótidos de alta energía durante la reperfusión, lo que sugiere que existe un efecto específico sobre la

función mitocondrial, que es más evidente bajo condiciones de reoxigenación (Aussedat *et al.*, 1993). A pesar de ello, el valor de estos efectos debe ser confirmado por otros estudios.

**5).- Reducción de la utilización de los ácidos grasos a favor de los carbohidratos.-**

Esta es la hipótesis más creíble. Datos de Fantini *y cols.* (1994) indican que la TMZ administrada a miocitos hipóxicos inhibe la fosforilación oxidativa en presencia de palmitoil-carnitina como sustrato. Si el piruvato es usado como sustrato, este efecto inhibitorio ya no está presente, sugiriendo una posible inhibición de la beta-oxidación. En este camino, la TMZ estimula la actividad de la piruvato-deshidrogenasa, con la consecuente mayor utilización de carbohidratos en la vía anaeróbica. De esta forma se optimiza el metabolismo celular permitiendo una producción rentable de ATP a pesar del reducido aporte de oxígeno que llega a la célula durante el episodio de isquemia. La TMZ retrasará así el paso a la glucólisis anaerobia que sería la directa responsable de todas las consecuencias negativas anteriormente descritas. Más recientemente se ha confirmado este incremento en el metabolismo de la glucosa inducido por la TMZ en otro modelo experimental, utilizando el corazón isquémico del perro (ligadura de la arteria coronaria descendente anterior) y evaluando la actividad metabólica mediante tomografía de emisión de positrones (PET). En este último estudio se demostró un mayor consumo de glucosa, tanto por parte del miocardio isquémico como del no isquémico, sin poder determinar si ese incremento es a expensas del metabolismo oxidativo o a través de la glucólisis. La ausencia de cambios en el metabolismo oxidativo total medido a través de [<sup>11</sup>C] acetato sugieren 2 posibilidades: 1) incremento del metabolismo de la glucosa a través de la glucólisis; o 2) incremento de la oxidación de la glucosa con reducción similar de la oxidación de los ácidos grasos (Mody *et al.*, 1998). Sin embargo en un estudio experimental sobre corazón aislado de ratas donde la TMZ redujo la contractura isquémica, no se objetivó ninguna modificación en la utilización de glucosa exógena por parte del miocardio (Boucher *et al.*, 1994). La interpretación más creíble de estos datos negativos es que el autor induce una isquemia marcada con valores de pH inferiores a 6,8 lo que provoca una inhibición de todas las enzimas de la glucólisis anaerobia. Así mismo ambos estudios no pueden ser comparados dado que las condiciones experimentales fueron distintas (corazón aislado y perfundido vs corazón *in vivo*), así como las dosis de TMZ utilizadas.

Según los resultados de un estudio realizado *in vivo* e *in vitro* en un modelo de rata, el efecto cardioprotector de la TMZ parece estar relacionado con una redirección de la utilización de los ácidos grasos hacia la neosíntesis de fosfolípidos; como consecuencia de

ello, la disponibilidad de los ácidos grasos está reducida y se produce un incremento en la utilización de sustancias no-lipídicas para la obtención de energía (Sentex *et al.*, 1998).

En un modelo de isquemia subtotal, el pretratamiento con TMZ redujo el incremento de acil-carnitina inducido por la isquemia (indicando una menor utilización de los ácidos grasos por las células cardíacas) (El Banani *et al.*, 1998). Esto se asociaba a una menor disminución del pH intracelular y a un menor incremento en la presión diastólica durante la reperfusión tras un episodio isquémico. Bajo estas condiciones de menor acidosis intracelular producida por la TMZ, la actividad de intercambiadores como el  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (y probablemente otros canales de  $\text{Na}^+$  -dependientes) pueden ser menos estimulados durante la reperfusión. Ello podría disminuir la entrada de  $\text{Na}^+$  y consecuentemente en intercambio de  $\text{Ca}^{++}$  a través de la bomba  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ , resultando de ello no solo un menor incremento de la presión diastólica, sino también un descenso de la disfunción sistólica (miocardio aturdido).

Más recientemente Kennedy *y cols.* (1998), sobre un modelo experimental en ratas, ponen en duda la inhibición de la carnitina palmitoyltransferasa-1 (lo que inhibiría la oxidación de la cadena larga de los ácidos grasos) como mecanismo de acción antiisquémico de la TMZ. Llama la atención que la isquemia inducida en estos experimentos es regional. Por tanto es posible que la formación de circulación colateral induzca el aclaramiento de metabolitos permitiendo que la TMZ ejerza su actividad en el metabolismo de la glucosa.

Durante y después de la isquemia, los niveles elevados de ácidos grasos circulantes compiten con eficacia con la glucosa como fuente de energía. Ello provoca una acidosis acelerada en el músculo y un incremento de las necesidades de energía con fines no contráctiles (es decir, reducción de la eficiencia cardíaca). La TMZ ha demostrado inhibir directamente la oxidación de los ácidos grasos, lo que se traduce en un incremento de la oxidación de la glucosa. Empleando corazones de rata latientes y aislados, Lopaschuk y Kozak (1998) han determinado directamente que la TMZ puede evitar las acciones perjudiciales de los ácidos grasos en el corazón. La adición de TMZ a corazones perfundidos con ácidos grasos produce una inhibición significativa de la oxidación de ácidos grasos y una estimulación de la oxidación de la glucosa, de tal suerte que la glucosa se convierte en la principal fuente de energía empleada por el corazón para mantener la función contráctil. Este efecto de la TMZ se acompaña de un aumento importante de la piruvato-deshidrogenasa, la enzima reguladora en la oxidación de la glucosa. El aumento de la oxidación de la glucosa disminuye la producción de acidosis en el miocardio, lo que probablemente justifica los efectos cardioprotectores de la TMZ que se han observado en muchos estudios clínicos y experimentales.

Todos estos datos apuntan hacia un aumento de la oxidación de la glucosa junto con una disminución de la oxidación de los ácidos grasos, resultando de ello unos requerimientos metabólicos de oxígeno menores.

Recientemente se ha realizado un estudio de los efectos de la TMZ sobre el metabolismo de los ácidos grasos y de la glucosa en corazones de rata aislados y latientes y sobre la actividad de varias enzimas que intervienen en la oxidación de los ácidos grasos. Los autores llegan a la conclusión que los efectos antianginosos de la TMZ pueden obedecer a una inhibición de la actividad de la 3-cetoacil CoA tiolasa de los ácidos grasos de cadena larga, y no de los de cadena media o corta. Esta inhibición de la oxidación de los ácidos grasos de cadena larga se acompaña de un aumento en la actividad de la piruvato-deshidrogenasa, que se traduce en un incremento significativo de la tasa de oxidación de la glucosa (Kantor *et al.*, 2000).

La dificultad de aclarar el mecanismo de acción de la TMZ estriba en: 1) La dificultad intrínseca en el estudio de las complejas vías metabólicas que la TMZ puede influenciar; 2) la pérdida de homogeneidad en los diferentes modelos animales, 3) las diferentes dosis y vías de administración, y 4) la ausencia de respuesta estándar a la droga. (Cargnoni *et al.*, 1999).

En conclusión la más creíble hipótesis es aquella en la que los mecanismos anteriormente expuestos no son exclusivos sino interrelacionados en la eficacia de la TMZ.

# ***HIPÓTESIS Y OBJETIVOS***



El miocardio aturdido, como hemos desarrollado a lo largo de la introducción de este trabajo, se caracteriza por un estado de disfunción contráctil que sigue a un episodio de isquemia severa transitoria que es, más o menos, duradero en el tiempo y espontáneamente reversible.

La producción del miocardio aturdido en su forma clásica se realiza mediante la aplicación de un episodio único de isquemia severa, entre 5 y 20 minutos (episodios mayores provocan daño irreversible), y seguido por un período de reperfusión más o menos prolongado, produciéndose un estado de disfunción ventricular que, con el tiempo, llega a recuperarse. Posteriormente se ha observado que el fenómeno de aturdimiento también ocurre tras episodios de isquemias breves y repetidas, observándose, en algunos de los protocolos, efectos acumulativos que incrementan la lesión (Bolli *et al.*, 1995).

En la Unidad de Cardiología Experimental hemos desarrollado un modelo canino de isquemias de muy breve duración (2 minutos), seguidas por períodos cortos de reperfusión (3 minutos) y repetidas hasta 20 veces que provoca un deterioro progresivo de la función regional de la zona isquémica; la fracción de acortamiento (FA) de la zona isquémica sufre un descenso progresivo con cada oclusión, hasta alcanzar valores del 19% respecto al basal tras el último episodio isquémico ( $p < 0.05$ ). La observación del tejido isquémico mediante microscopia óptica no evidenció muerte celular ni alteraciones morfológicas con respecto a las muestras de tejido control. Sin embargo, cuando el estudio se realizó utilizando microscopia electrónica de transmisión, el tejido isquémico mostró un aumento en el volumen mitocondrial, con importantes alteraciones en su ultraestructura (aclaramiento de la matriz y vacuolización, rotura de membranas,..). Estos resultados muestran que cuando el miocardio es sometido a isquemias breves y repetidas, existe un deterioro progresivo de la función sistólica junto con alteraciones estructurales, principalmente a nivel mitocondrial, que persisten tras 24 horas de finalizado el protocolo isquémico. Estas alteraciones podrían ser las responsables de la disfunción sistólica transitoria y/o crónica en ausencia de infartos previos (Pomar, 1995).

En los últimos años se ha iniciado una nueva línea de investigación centrada en conocer la cascada de fenómenos metabólicos que conduce de la isquemia a la lesión del miocito, así como en la investigación de tratamientos farmacológicos que demostraran ser de utilidad en la prevención y disminución del daño por isquemia/reperfusión, con el enorme interés que supone proteger al miocardio en todos los pacientes coronarios, limitando las secuelas y la gravedad de la isquemia, cuando ésta, pese a todo, se produce.

La trimetazidina (TMZ) es un nuevo fármaco antiisquémico con actividad metabólica y sin efectos sobre los parámetros hemodinámicos que, en diferentes estudios experimentales, ha demostrado poseer importantes acciones citoprotectoras sobre el miocardio isquémico.

La pregunta de investigación a la que queremos responder con la realización de este proyecto es:

*¿ Es capaz la trimetazidina de proteger y/o facilitar la recuperación del miocardio sometido a isquemia/reperfusión mediante la reducción de la disfunción postisquémica y de los cambios ultraestructurales en los miocitos.?*

Para contestar a esta cuestión se han planteado una serie de OBJETIVOS parciales concretos:

1. Confirmar las alteraciones que se producen a nivel de la función regional y a nivel mitocondrial del miocardio sometido a dos modelos de isquemia/reperfusión diferentes: un modelo de isquemia única y prolongada (15 minutos) seguido de 1 hora de reperfusión; y otro modelo de isquemias breves (2 minutos) y repetidas seguidas de reperfusión (3 minutos) que provocan aturdimiento miocárdico.
2. Estudiar la acción de la trimetazidina sobre la isquemia y sobre la recuperación funcional del miocardio sometido a esos dos modelos diferentes de isquemia/reperfusión
3. Estudiar la acción de la trimetazidina sobre las alteraciones ultraestructurales que se producen a nivel mitocondrial en los diferentes modelos isquémicos (análisis cuantitativo y cualitativo).
4. Estudiar los efectos de la TMZ sobre los parámetros hemodinámicos.

***MATERIAL Y***

***MÉTODO***

## **1. MATERIAL.-**

### **1.1.- Animales de experimentación.-**

Se han utilizado un total de 30 perros mestizos de ambos sexos (23 machos y 7 hembras), con unos pesos comprendidos entre los 18 y 39 Kgs.

Dichos animales cumplen las condiciones que sobre protección de los animales de experimentación están establecidas por Real Decreto 223/1988.

Ninguno de los animales ha sido utilizado previamente en algún estudio de investigación.

### **1.2.- Área experimental.-**

Todos los experimentos se han desarrollado en un quirófano destinado a la cirugía experimental en animales, localizado en el Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe, contando con la colaboración de un equipo de personal estable y dedicado en exclusiva a este tipo de técnicas.

### **1.3.- Material quirúrgico.-**

El instrumental quirúrgico utilizado ha sido el siguiente:

- Mesa de quirófano.
- Bisturí eléctrico KYRTO 280 para corte y cauterización.
- Bisturíes de uso único.
- Pinzas de disección con dientes (1x2).
- Pinzas de disección sin dientes.
- Pinzas Hemostáticas Crile-Slim y Pean-Slim.
- Pinzas para preparaciones rectas y curvas.
- Tijeras para cirugía general y vasculares.
- Pinzas de campo Backhaus.
- Sondas acanaladas.
- Separador autostático para costillas Finochietto.
- Clamp vascular atraumático "Bull-Dog".
- Aspirador Red-O-Pack VIGON.
- Jeringas desechables de 5 y 10 cc.

- Aguja punción trocar (calibre 1.6 mm).
- Llaves de tres vías.
- Porta-agujas de diversos tamaños.

#### **1.4.- Ventilación mecánica.-**

- Laringoscopio: Mango porta-pilas  $\phi$ 30 mm- 14 cm y Espátula # 4-130 mm.
- Tubos de RUSH (n° 34-38) para intubación orotraqueal.
- Respirador Volumétrico TEMEL, adaptado para utilización en anestesia, con rotámetros paralelos que permiten ajustar la mezcla gaseosa de oxígeno y protóxido de nitrógeno durante el experimento.

#### **1.5.- Registro de señales.-**

- Polígrafo de 8 canales HEWLETT-PACKARD 7758 B de inscripción térmica con:
  - \*preamplificadores bioeléctricos (8811 A) dotados de filtros universales (0,1-100 Hz; 40- 500 Hz).
  - \*preamplificadores de ECG y de presión (8805 C).
  - \*módulo de cálculo de derivadas (8814 A Derivate Computer).
- Osciloscopio de 2 canales HEWLETT-PACKARD 1201 B para visualización continua de señales (ECG, curvas de contractilidad segmentaria, dP/dt, etc,...) durante el experimento.
- Cables para registro electrocardiográfico de derivaciones estándar periféricas con electrodos (agujas para inserción subcutánea).
- Transductores de presión HEWLETT-PACKARD Quartz Transducer (1290 A).

#### **1.6.- Catéteres y guías.-**

- Catéteres de presión Pigtail 7F (varias marcas).
- Catéteres de vena G14 L50 cm 1,5-2 mm Vygon.
- Guías 0,34" (varias marcas).
- Catéter transductor de presión MICRO-TIP MILLAR.

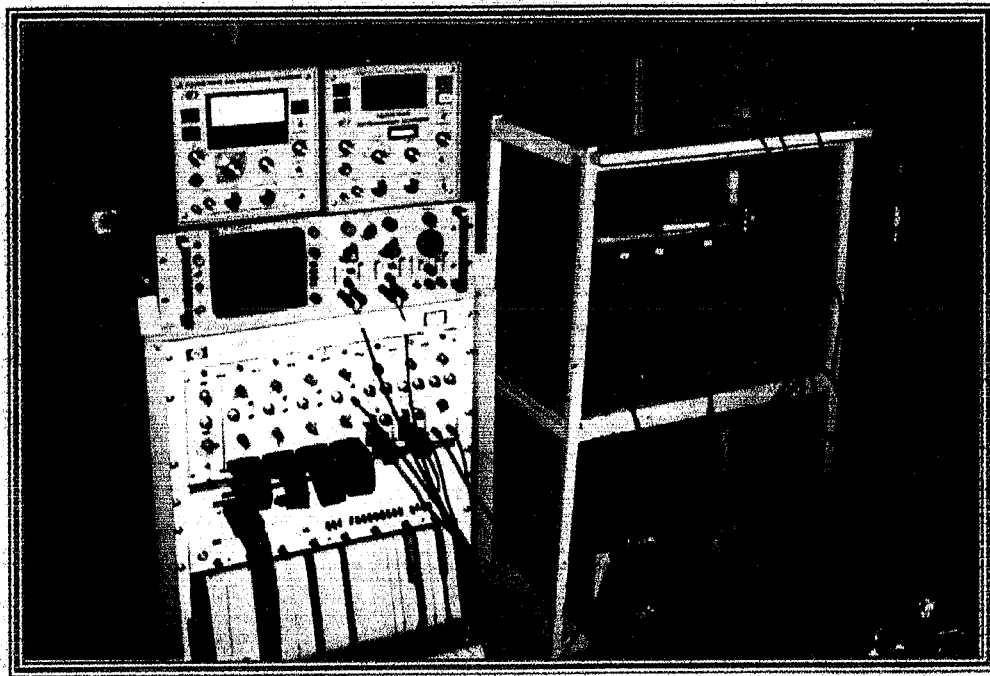


Figura M.1.- Polígrafo de registro y los medidores de flujo (izquierda) y el medidor ultrasónico y osciloscopio para análisis de la señal ultrasónica (derecha).

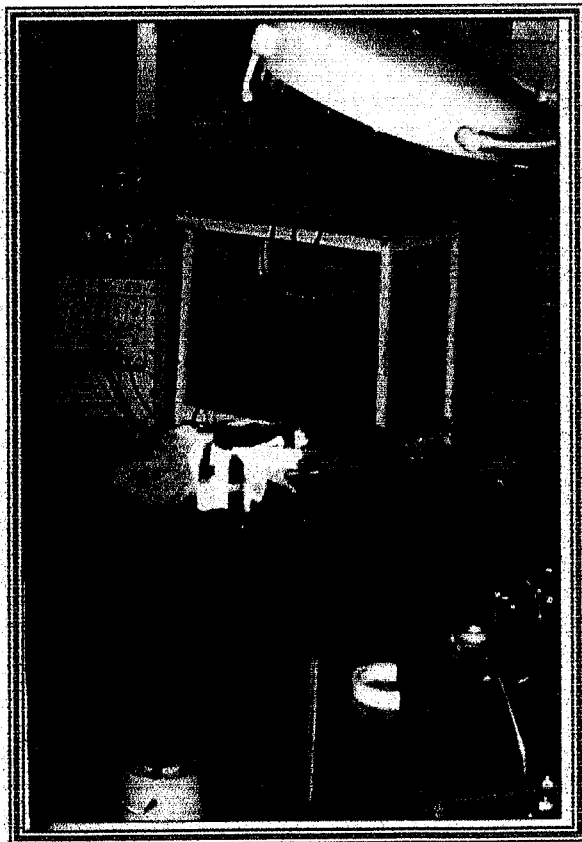


Figura M.2.- Vista panorámica del quirófano Experimental.

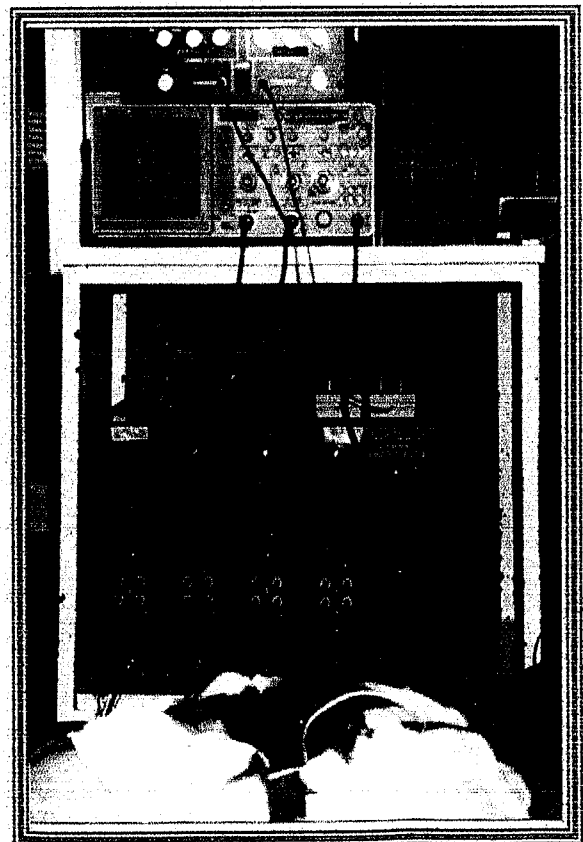


Figura M.3.- Sonomicrómetro y osciloscopio.

### **1.7.- Medida de flujo coronario.-**

- Medidor de Flujo para investigación animal Modelo T206 Serie T206X-93-0480, Transonic Systems Inc., doble canal 16 lbs., 90-130 volts., 50-60 Hz.
- Flowprobe implantable perivascular para estudios agudos en animales Serie S Tipo 2S; Sensor: frecuencia 3,6 MHz, cero de compensación 3 con un porcentaje de precisión absoluta de 15 y relativa de 2.

### **1.8.- Medidores de función regional miocárdica.-**

- Microcristales piezoeléctricos Segment Length Xducer P/N SL 5-2 (5 mm de 2 MHz), Triton Technology Inc.
- Medidor ultrasónico de movimiento Ultrasonic Dimension System model 401 de Schuessler and associates, USA.
- Osciloscopio Tektronics 2236 de 2 canales y banda ancha de frecuencia (BW 100 MHz) con entradas DC acopladas.
- Cables conectores entre medidor ultrasónico y osciloscopio y con polígrafo.

### **1.9.- Bombas de infusión continua.-**

Se ha utilizado una bomba de infusión continua Braun Perfusor Melsungen A.G.

### **1.10. Fármacos y fluidos.-**

- Mantenimiento de una vía periférica:  
\*Suero fisiológico.
- Mantenimiento de presión venosa central estable:  
\*Dextrano de peso molecular medio.
- Limpieza de catéteres:  
\*Suero fisiológico heparinizado (1 cc de Heparina al 1% en 500 cc de suero).
- Lavado de pieza y muestras cardíacas:  
\*Suero fisiológico.

- Fármacos para inducción de anestesia:
  - \*Pentobarbital sódico.
  - \*Cloruro mórfico.
  - \*Succinilcolina.
  - \*Protóxido de nitrógeno.
  - \*Oxígeno.
  
- Fármaco a estudio:
  - \*Trimetazidina.

### **1.11.- Sacrificio del animal.-**

Mediante electroestimulación, utilizando un estimulador programable Device: Devices Limited (animal anestesiado).

### **1.12.- Estudios ultraestructurales.-**

Han sido realizados mediante microscopía óptica y electrónica de transmisión utilizando técnicas convencionales.

El material utilizado ha sido:

- Microscopio Optico Olympus BX-50.
- Microscopio electrónico de transmisión (Philips mod. CM 100).
- Fijador grado ultrapuro para Microscopia Electrónica, Glutaraldehido 25% y Formaldehido 16%.
- Tampón cacodilato 0,1 y 0,05 M (pH 7,4).
- Solución al 1% de OsO<sub>4</sub>.
- Solución al 1% de K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>.
- Solución al 2 % de acetato de uranilo.
- Solución al 2,7% de citrato de plomo.
- Resinas tipo Epon 812 y Lowicryl K4M.
- Placas fotográficas 6x9 cm. AGFA GEVAERT (Scentia film).



## **2.- METODOLOGÍA GENERAL.-**

### **2.1.- Preparación de los animales de experimentación.-**

Los perros proceden de un centro suministrador de animales de laboratorio, ubicado en la provincia de Barcelona, reconocido y bajo control de la Generalitat de Catalunya. Dichos animales cumplen las condiciones que sobre protección de los animales de experimentación están establecidas por la Administración (R. D. 223/1988).

Los animales son proporcionados con su documentación sanitaria personalizada, vacunados e identificados mediante tatuaje individual.

A su llegada al estabulario del Centro de Investigación son valorados por personal Veterinario especializado, realizándose un control de la documentación del animal para verificar el tipo de vacunas que se le han administrado y fecha de las mismas, comprobación de desparasitación y examen clínico del animal antes de su aceptación por el Centro. Una vez aceptado el animal se procede a su lavado y a una nueva desparasitación externa e interna mediante vermífugos orales.

Todos los perros utilizados se han estabulado un mínimo de 7 días antes de la realización de los experimentos. El día previo a la experimentación se rasura el tórax y se traslada a una jaula individual donde se le mantiene en ayunas.

### **2.2.- Criterios de selección y exclusión.-**

Tras el control veterinario, los perros fueron randomizados (*a doble ciego*) a los diferentes grupos de estudio (protocolo de isquemias breves o única, y dentro de ellos a TMZ o placebo). La lista de randomización fue proporcionada por I.R.I.S. (Institut de Recherches Internationales Servier) y únicamente fue descodificada al final del estudio.

#### *Criterios de exclusión:*

- Desarrollo de fibrilación ventricular durante el primer período de reperfusión.
- Hemorragia 12 horas antes de la intervención.
- Complicaciones arrítmicas graves o de otra clase durante el procedimiento.
- Ausencia de caída de la FA de la zona isquémica durante la obstrucción coronaria (por circulación colateral o medición de zona periisquémica).

### **2.3.- Anestesia.-**

Tras canalizar con una cánula intravascular FEP TEFLON de 1.7 mm de diámetro la vena cefálica de la extremidad delantera derecha, se induce la anestesia mediante la administración en forma de bolo intravenoso de: pentotal sódico (30 mg/Kg de peso); cloruro morfíco (0.01 gr/5 Kg de peso) y succinilcolina (0.5 mg/Kg de peso).

Una vez inducida la anestesia, con el animal sedado y relajado en apnea, se procede a intubación orotraqueal y conexión inmediata a ventilación mecánica.

La ventilación se mantiene durante todo el experimento con una mezcla de 60% de Oxígeno y 40% de Protóxido de Nitrógeno, en forma mecánica controlada, con un volumen-minuto de 4,5-6 litros; presión de insuflación de 30-40 mmHg y con una frecuencia de 16-20 respiraciones por minuto. Se realizan controles gasométricos para vigilancia de parámetros ventilatorios.

Durante todo el experimento se mantiene la relajación muscular y la analgesia mediante la administración continua con bomba de perfusión de succinilcolina y cloruro morfíco en dilución con suero fisiológico ( 7,5 mgr. de succinilcolina más 20 mgr. de cloruro morfíco en 46,5 cc de suero fisiológico) a una velocidad media de 6 ml/hora.

Tras finalizar el experimento y extraer la pieza cardíaca, se retira la bomba de perfusión así como la ventilación mecánica.

### **2.4.- Monitorización ECG periférico.-**

El día previo a la experimentación se realiza un control ECG a todos los animales. Mediante punción en tejido celular subcutáneo se fija un electrodo-aguja a cada una de sus extremidades, para registro de derivaciones estándar.

El día de realización del experimento y una vez anestesiado el animal, colocado en decúbito lateral derecho, y utilizando el mismo sistema de electrodo-aguja descrito, se procede a realizar un registro basal y posteriormente a realizar monitorización continua de ECG.

## **2.5.- Toracotomía.-**

En condiciones de asepsia se realiza una toracotomía lateral izquierda a nivel del 5º espacio intercostal mediante incisión de la piel y planos musculares hasta alcanzar la cavidad torácica. En todo momento se mantiene una estricta hemostasia mediante electrocoagulación.

Durante todo el experimento el tórax permanece abierto (tiempo aproximado 2 horas), procurando que la temperatura sea constante (37° C) mediante el uso de lámparas encendidas, y manteniendo la superficie epicárdica húmeda mediante lavados periódicos con suero fisiológico.

## **2.6.- Pericardiotomía.-**

Tras retirar el pulmón con separadores de plomo, se accede al pericardio practicándose una incisión longitudinal y otra transversal. A continuación los bordes son fijados a la pared torácica con seda trenzada, lo que nos permite una apertura suficiente para poder realizar la disección de la arteria coronaria, así como la implantación de los pares de cristales ultrasónicos.

## **2.7.- Disección y oclusión coronaria.-**

Se disecciona cuidadosamente la arteria coronaria descendente anterior, a diferente nivel en función del protocolo isquémico: zona proximal al tronco en el protocolo de 20 isquemias múltiples, y zona distal en el protocolo de isquemia única y prolongada.

Una vez diseccionada se coloca alrededor un lazo no traumático y un medidor electromagnético de flujo, en situación contigua pero más proximal.

Las oclusiones son totales y transitorias, realizándose mediante la utilización de un clamp vascular, ayudándonos para su colocación del lazo que previamente se había pasado alrededor de la arteria.

## 2.8.- Implantación de microcristales piezoeléctricos.-

2.8.1.- *Situación de los microcristales.*- Se implantan en todos los casos dos pares de microcristales, siguiendo el eje longitudinal del corazón situándose en:

- a) Zona isquémica. Territorio irrigado por la arteria descendente anterior. Los cristales se sitúan entre la rama principal de la arteria ocluida y una rama coronaria secundaria, situada por debajo del lugar de oclusión.
- b) Zona no Isquémica.- Territorio irrigado por la arteria circunfleja.

Antes de implantar los microcristales, las zonas predeterminadas se confirman mediante una breve interrupción del flujo distal por oclusión de la arteria y visualización del área de cianosis.

2.8.2.- *Técnica de implantación.*- Los microcristales son implantados en todos los casos en el subendocardio. Para ello se realiza en primer lugar, y utilizando una aguja de calibre adecuado (1,6 mm), una pequeña punción epicárdica en las zonas en que se ha establecido para su colocación. A continuación y ayudándonos del soporte plástico que llevan los cristales, se introduce éste.

La adecuada colocación de los microcristales se comprueba, tras encarar correctamente ambos, mediante la correcta morfología de las señales ultrasónicas. La separación entre ambos cristales es de 1,5 cm aproximadamente. Tras el sacrificio del animal se verifica la localización de los microcristales mediante su visualización directa.

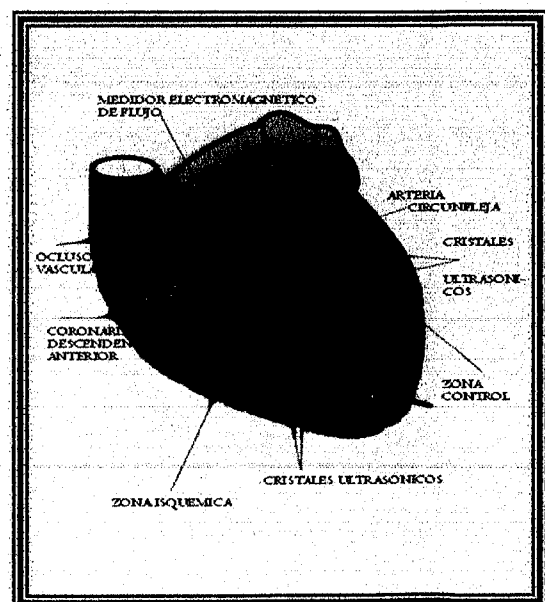
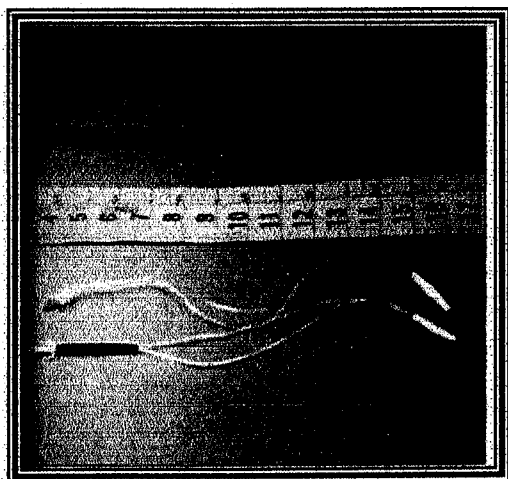


Figura. M.4.- Detalle de los cristales ultrasónico. Figura M.5.- Representación modelo isquémico.

## 2.9.- Medida de la presión ventricular.

Para la medición de la presión ventricular izquierda durante el acto quirúrgico se procede a la colocación de un catéter en cámara ventricular a través de su pared.

## 2.10.- Calibración de los diversos registros.-

Antes de iniciar cada experimento, se realizan calibraciones de los diversos registros de acuerdo con las escalas que siguen a continuación.

a) Registros electrocardiográficos:

$$1 \text{ mV} = 1 \text{ cm}$$

b) Transductores de presión:

En primer lugar se calibran los ceros respecto a la presión atmosférica y a continuación se ajusta el módulo de presión utilizado para cavidades izquierdas:

- Con escala de 250, 100 mmHg = 16 mm.

c) Módulo para cálculo de derivadas:

Se calibra para escala 50 div/seg/div, en relación con el transductor de presión de forma que el valor de  $dP/dt$  sea:

MmHg/seg:  $n^\circ$  divisiones deflexión  $dP/dt \times 50 \times$  equivalente en mm de 1 mmHg en canal de presión.

d) Medidor de flujo coronario:

Tanto el medidor de flujo como las sondas de flujo vienen calibrados por el fabricante para uso en experimentos agudos. En cada experiencia el test de calibración se realiza de la siguiente forma: situándonos en modo de calibración pulsamos el botón "calibrate zero" apareciendo en la ventana analógica "c 0" y calibrándose de forma automática el cero de flujo, posteriormente pulsamos el botón "scale factor" apareciendo en la ventana analógica "c number" mostrando el equivalente al factor escala en ml/min (c 25).

Una vez realizados estos pasos se pasa a modo "MEA" registrándose en el panel analógico las medidas en tiempo real de volumen de flujo en ml/min.

e) Medidor ultrasónico de movimiento:

En primer lugar se debe conseguir una estabilidad de la señal sónica monitorizada en el osciloscopio, para ello se ajustan los distintos mandos (balance, trigger e inhibit) del medidor ultrasónico; a continuación se calibra la señal en el polígrafo, ajustándola a la escala apropiada. Para transformar la medida registrada sobre el papel en una medida real del segmento aplicamos la fórmula:

Longitud segmento (mm) = (altura registro (mm)/ constante según valor de la escala + valor del "inhibit" del medidor ultrasónico.

Valor de escala:	50 -----	constante 5
	100 -----	constante 2,5
	200 -----	constante 1,25

Hemos de conseguir una correcta morfología de los registros y, de no ser así, se modificará la posición de los cristales tantas veces como sea necesario, hasta conseguirlos.

Se realiza registro con papel continuo a velocidad de 0,5 mm/seg, durante todo el tiempo que dura el experimento. Se utilizaron velocidades mayores de 25 y 50 mm/seg para los registros basales y en los tiempos en que se realizan los análisis de los diversos parámetros electrofisiológicos.

## **2.11.- Análisis bioquímico.-**

Con el objeto de verificar la ausencia de necrosis miocárdica en nuestro modelo experimental, se realizó la determinación de troponina T en sangre venosa periférica.

La obtención de las muestras se ha realizado:

- 1º - Antes de inducir la anestesia al animal.
- 2º - Tras la realización del protocolo isquémico (previo al sacrificio del animal).

Por problemas técnicos en el análisis de los plasmas, sólo se ha realizado la determinación de troponina T en el protocolo de isquemias breves y repetidas.

Las muestras obtenidas se centrifugan, y tras separar el suero se almacenan a  $-20^{\circ}$  hasta que son procesadas para su análisis.

Para la determinación de troponina T se ha utilizado el método inmunoenzimático, basado en una técnica de ELISA de sándwich con streptavidina desarrollado en 1998 por Boehringer Mannheim (n° catálogo 1556428).

Este test se basa en la no-existencia de Troponina T (TnT) cardíaca en el suero en condiciones fisiológicas. La TnT sólo aparece en la sangre en concentraciones fácilmente detectables cuando se descompone el complejo contráctil actina-troponina. Se ha observado una reacción cruzada, menor del 1,5%, con troponina proveniente del músculo esquelético.

Este procedimiento utiliza indistintamente muestras de plasma o suero con heparina y citrato; la hemólisis, hasta 1 g de hemoglobina/dl no interfiere en el test. La determinación se realiza, utilizando 100  $\mu$ l de muestra, en tubos de plásticos recubiertos de streptavidina a  $25^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se transfieren 300  $\mu$ l de la reacción a microplacas; la longitud de onda empleada en la lectura fue de 405 nm. El límite de detección inferior de este método se ha establecido en 0,04 ng/ml.

Se ha utilizado como tampón de incubación, fosfato 40 mmol/l, pH 7.0, y un anticuerpo anti-troponina-T monoclonal-biotina (1,5  $\mu$ g/ml), como conjugado, un anti-troponina T-POD (10 U/ml), como tampón de sustrato, fosfato/citrato 100 mmol/l, pH 4,4 y perborato sódico ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 3,2 mmol/l, y como cromógeno ABTS (2-2'-azino-di-[3-etil-benzotiazolina ácido sulfónico-(6)]-sal diamónica; 1,9 mmol/l). Los tubos de plástico recubiertos de streptavidina tienen una capacidad de fijación de 14 ng de biotina/tubo. Los resultados se expresan en ng/ml.

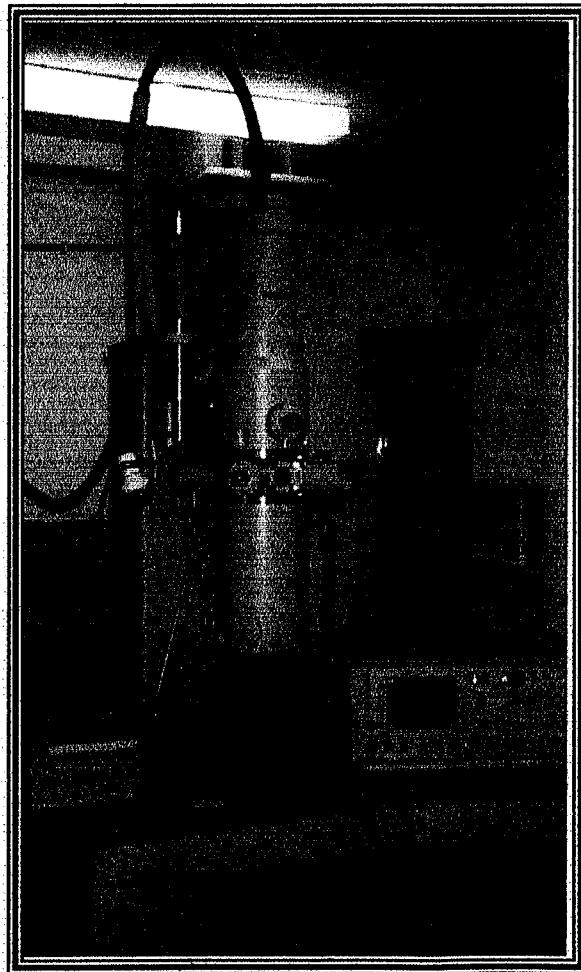
## **2.12.- Estudio postmortem.-**

Al finalizar los experimentos y sin interrumpir la anestesia, los perros son sacrificados mediante electroestimulación directa sobre la pared miocárdica, lo que provoca la muerte por fibrilación ventricular.

Tras la sección del pedículo vascular se procede a la extracción del corazón y a su lavado con suero fisiológico. Mediante un examen macroscópico de la pieza se comprueba la correcta situación de los cristales en el subendocardio.

En todos los experimentos se toman muestras de miocardio subendocárdico de la zona isquémica y de la zona no isquémica para su estudio microscópico. Todas las muestras son etiquetadas de forma que al realizar el estudio microscópico se desconoce el tipo de tejido estudiado (zona control o zona isquémica), y si recibió o no tratamiento.

Se toman diversas muestras en cada zona, procurando cortar una mitad en sentido longitudinal y las otras en sentido transversal, a fin de conseguir secciones tisulares que varíen 90° y poder observar estructuras en ambos sentidos.



**Figura M.6.-** Microscopio electrónico de transmisión (Philips mod. CM 100).





**Figura M.7.-** Detalle de la disección de la arteria coronaria descendente anterior.



**Figura M.8.-** Detalle de la posición y tipo de ocluidor coronario utilizado (protocolo de isquemias breves y repetidas).-



**Figura M.9.-** Preparación donde se muestra la posición de los dos pares de cristales. Flowmeter en posición y catéter de presión a través de pared ventricular.



**Figura M.10.-** Pieza operatoria mostrando la posición de los dos pares de cristales ultrasónicos.

### **3.- METODOLOGÍA EXPERIMENTAL.-**

#### **3.1.-Preparación experimental básica.-**

Con el perro anestesiado, ventilado mecánicamente y con monitorización continua de 2 derivaciones electrocardiográficas mediante electrodos subcutáneos, se realiza toracotomía lateral izquierda a nivel del quinto espacio intercostal. A continuación se abre el pericardio y se suspende el corazón en cuna pericárdica.

Posteriormente se procede a disección de la arteria coronaria descendente anterior, a diferente nivel según el protocolo isquémico, colocando a su alrededor un medidor electromagnético de flujo y un lazo que nos permita situar el dispositivo ocluidor durante las oclusiones coronarias.

Con la finalidad de medir las variaciones en la longitud de los segmentos miocárdicos, se implantan en el subendocardio 2 pares de microcristales ultrasónicos: un par se sitúa en la pared de la zona que someteremos a isquemia (segmento isquémico) y el otro en el área perfundida por la arteria no ocluida con irrigación normal y que nos servirá de testigo (segmento control).

#### **3.2.-Protocolos específicos.-**

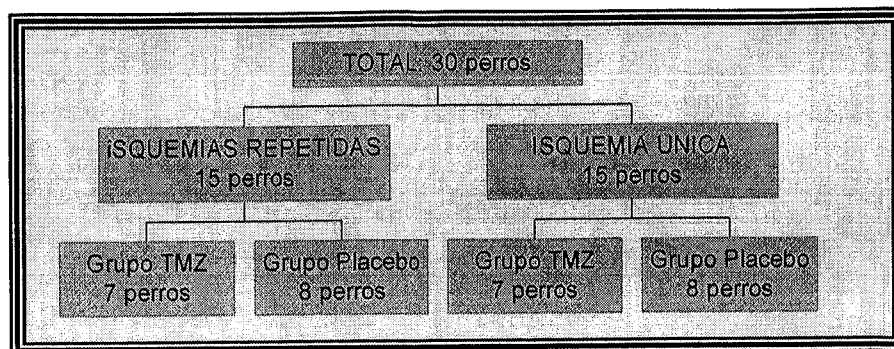
*1.- Protocolo de isquemias breves y repetidas.* Consiste en la realización de 20 obstrucciones completas de la arteria coronaria descendente anterior (a nivel proximal), de 2 minutos de duración y separadas por 3 minutos de reperfusión entre ellas. La comprobación de cada episodio de oclusión completa/reperfusión completa se realiza mediante el control continuo del flujo coronario.

*2.- Protocolo de isquemia única y prolongada.* Consiste en realizar una única obstrucción completa de la arteria coronaria descendente anterior, en su tercio inferior, de 15 minutos de duración, y seguida de 60 minutos de reperfusión.

#### **3.3.- Series experimentales.-**

El estudio incluye el análisis de 30 perros, distribuidos en 2 grupos. Uno de los grupos formado por 15 perros fue asignado al protocolo de isquemias breves y repetidas (20

oclusiones coronarias de 2 minutos de duración con 3 minutos de reperfusión), mientras que el otro grupo de 15 perros fue asignado al protocolo de isquemia única y prolongada. Cada una de estas series fue randomizada (a doble ciego) a tratamiento con trimetazidina (TMZ) o con placebo durante 7 días. La distribución final se representa en la siguiente figura:



**Figura M.11-** Distribución de la muestra.

### **3.4.- Tratamiento.-**

La TMZ (*1-(2,3,4-trimethoxybenzyl)-piperazine*) fue proporcionado por IRIS (Institut de Recherches Internationales servier) en unidades terapéuticas.

El tratamiento fue administrado a los animales siguiendo la lista de randomización. La dosis de TMZ administrada (vía oral) al perro fue : 50 mg a las 08.00 horas y 75 mg a las 15.00 horas durante los 7 días previos al protocolo isquémico.

## **4.- PARÁMETROS ANALIZADOS.-**

### **4.1.- Estudios hemodinámicos.-**

En todos los experimentos fueron analizados las señales de electrocardiograma periférico, flujo coronario, presión de ventrículo izquierdo,  $dP/dt$ , y curvas de función regional. La estandarización y calibración de las diversas señales se realizó antes de iniciar cada experimento y se repitió cada cinco obstrucciones, para eliminar posibles variaciones en la instrumentación.

En el protocolo de isquemias breves, los registros de los diferentes parámetros se realizaron durante la fase basal y durante la aplicación del protocolo isquémico, al final de cada período de oclusión y de cada período de reperfusión (últimos 20 segundos).

En el protocolo de isquemia única y prolongada, los diferentes parámetros fueron obtenidos durante la fase basal, a los 5, 10 y 15 minutos de iniciada la obstrucción; y al 1, 15, 30, 45 y 60 minutos de reperfusión.

Así pues, los parámetros estudiados han sido:

a) Parámetros de función global:

- Frecuencia cardíaca.
- Presión ventricular izquierda.
- dP/dt de presión ventricular izquierda.

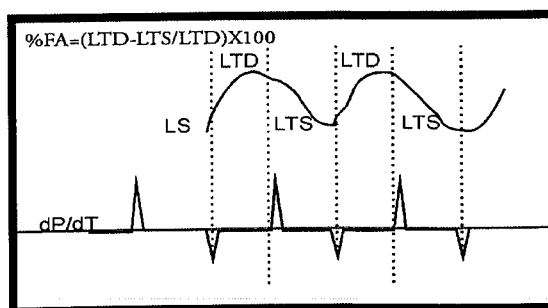
b) Parámetros de función regional:

- Longitudes telesistólica (LTS) y telediastólica (LTD) de ambos segmentos.
- Fracción de acortamiento sistólico de ambos segmentos (isquémico y control).

La longitud telediastólica se mide tomando como referencia el punto de inicio de la señal positiva de la dP/dt de la presión ventricular izquierda (Theroux *et al.*, 1974). Estas medidas fueron normalizadas para una longitud telediastólica inicial de 10 mm (figura M.12)

La fracción de acortamiento sistólico (% FA) se calcula aplicando la fórmula:

$$\% \text{ FA} = [(LTD - LTS) / LTD] \times 100$$



**Figura M.12.-** Diagrama representativo de los trazados utilizados para el cálculo de la función miocárdica regional. LS: curva de longitud de un segmento miocárdico; dP/dt: derivada presión ventricular izquierda; LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica.-

## 4.2.- Estudios microscópicos.-

### 4.2.1.- Estudio de microscopía óptica.-

De todos los experimentos se toman muestras que son fijadas y procesadas para su inclusión en resina tipo Epon 812; posteriormente se realizan secciones semifinas, que tras ser teñidas con azul de toluidina son observadas mediante microscopía óptica convencional (x400 – x1.000) para localizar la zona de tejido que nos interesa analizar en el microscopio electrónico.

El protocolo es el siguiente:

- Fijación por inmersión de la pieza de tejido durante 60 minutos a 4°C en una solución que contiene 1,5 % de glutaraldehído (ANAME ultrapure TEM grade al 25 %) y 1 % de formaldehído (ANAME ultrapure TEM grade al 16 %) en tampón cacodilato 0.05 M, pH 7.4. (cacodilato es ácido tridimetilarsínico en sal sódica,  $\text{Na}(\text{CH}_3)_2 \text{AsO}_2$ ).
- Eliminar el fijador y colocar la muestra 10 minutos en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4, a 4° C (repetir la operación hasta tres veces).
- Retirar el tampón e incubar la pieza en una solución de 1 % de tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) y 1 % de ferrocianuro potásico ( $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ), durante 60 minutos en total oscuridad.
- Lavar la muestra tres veces durante 5 minutos en agua bidestilada.
- Retirar la solución de lavado y añadir ácido tánico al 0.15 % en tampón cacodilato al 0.1 M, durante tan sólo 1 minuto.
- Lavar la muestra tres veces en tampón cacodilato 0.1 M, pH 7.4 (5 minutos por cada lavado); y a continuación volver a lavar la pieza con agua bidestilada, también 5 minutos cada vez.
- Sustituir la solución de lavado por otra al 2 % de Acetato de Uranilo e incubarla 120 minutos en total oscuridad.

- La deshidratación de las muestras se realiza gradualmente con etanol a concentraciones que comienzan en el 50 %, y siguen en 75, 90, 95, y 100 %, durante 5 minutos en cada una de ellas; siempre a temperatura ambiente.
- Inclusión en Epon 812. Ir incluyendo la pieza en soluciones etanólicas de resina crecientes de la siguiente manera: (a) Epon:Etanol 1:2, 60 minutos; (b) Epon:Etanol 1:1, 60 minutos; y (c) Epon:Etanol 2:1, 60 minutos. Finalmente la muestra es incluida en Epon 100 % durante toda la noche a 4° C.
- Colocar las piezas en cápsulas de gelatina transparentes durante un mínimo de 2 días y en estufa a 60° C.

#### **4.2.2- Estudio de microscopia electrónica.-**

##### *4.2.2.1.- Análisis cualitativo de las micrografías.-*

Las muestras mencionadas anteriormente son cortadas nuevamente en secciones ultrafinas para el estudio de la ultraestructura mediante microscopia electrónica. Se analizaron secciones del tejido miocárdico correspondientes al subendocardio del corazón del perro, tanto en sentido transversal como longitudinal, con el fin de cuantificar alteraciones a nivel mitocondrial: número de mitocondrias por sarcómero, tamaño y disposición de las mismas, daño mitocondrial, fusiones y emparejamientos, así como la presencia de vacuolas y gránulos de lipofucsina. En ambos tipos de secciones se analizaron igualmente el núcleo, las miofibrillas y el retículo sarcoplásmico.

##### *4.2.2.2.- Análisis cuantitativo de las micrografías.-*

Para este tipo de análisis se sigue el procedimiento estereológico convencional. De cada muestra se realizan doce bloques de inclusión, de los que al azar se seleccionan tres, sobre los cuales se obtienen 5 secciones ultrafinas espaciadas 100  $\mu$ m unas de otras. De cada una de ellas se obtienen 4 fotografías que sirven como base para el análisis estereológico.

De los negativos de 6 x 9 cm obtenidos, se hacen copias ampliadas a papel ( 18 x 24 cm) para obtener un aumento final de entre x13.500 y x45.000, que nos permitirá medir correctamente las diferentes estructuras.

Las fotografías se colocan sobre la tableta digitalizadora y pasando el cursor sobre la superficie a estudiar, se determinan: área, perímetro, eje *mayor* y eje *menor* de unas 300 mitocondrias elegidas al azar de cada una de las series (150 mitocondrias de la zona isquémica y otras 150 mitocondrias de la zona control) (Sharkey *et al.*, 1991).

#### 4.2.2.3.- *Material utilizado:*

- Ordenador Pentium 32 MB Ram, disco duro de 1 Giga.
- Programa de análisis morfométrico “The Morphometer<sup>TM</sup>”, versión 1.41. Marc M Friedman© de la Universidad de Georgetown (U.S.A.).
- Tableta gráfica digitalizada de un área activa de 12 x 12 Summagraphics© mod. Summasketch® Plus. Equipada con un ratón-cursor de 4 botones, provisto de un visor calibrado.

## 5.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.-

El análisis estadístico de los datos se ha realizado utilizando el programa SPSS versión 7.5. Todos los datos fueron sometidos a un análisis estadístico con el objeto de conocer la significación de las diferencias observadas, así como para valorar las relaciones existentes entre las distintas situaciones.

Se utilizan los valores promedio de cada situación y sus desviaciones estandar. Para establecer la diferencia entre los valores de medias poblacionales obtenidas en los diferentes grupos ensayados para la variable respuesta estudiada, se recurrió a un contraste de diferencias de medias, en el que se establece una hipótesis nula. Esta hipótesis consiste en la ausencia de diferencias entre las medias de las dos poblaciones para la variable respuesta estudiada. El contraste estadístico más adecuado es el análisis de la varianza para medidas repetidas (ANOVA), tras comprobar que se verificaba la hipótesis de normalidad de las poblaciones comparadas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov. Así mismo se ha utilizado la *t de Student* para comparar los datos cuantitativos (peso y flujo coronario) y la *Chi cuadrado* para los datos cualitativos (sexo).



Hemos utilizado el análisis de la varianza para medidas repetidas cuando se comparaba, dentro de la misma población (intrasujeto), el valor medio de un parámetro a lo largo del protocolo respecto al valor basal, y el análisis de la varianza para medidas repetidas tomando como factor intersujeto el tratamiento cuando se comparaba entre sí los dos grupos experimentales (placebo y trimetazidina). Una probabilidad menor del 5% a favor de la hipótesis de nulidad fue considerada de valor estadístico.

Con respecto al análisis estereológico, hemos utilizado la *t de Student* para comparar los datos cuantitativos (parámetros del tamaño mitocondrial) y la *Chi cuadrado* para los datos cualitativos (porcentaje de mitocodrias dañadas, emparejadas, etc). El límite de confianza tomado ha sido también del 95% y hemos considerado que una probabilidad menor del 5% a favor de la hipótesis nula tiene valor estadístico.

# ***RESULTADOS***

## **I.- PROTOCOLO DE ISQUEMIAS BREVES Y REPETIDAS.-**

### **1.- RESULTADOS DE FUNCIÓN GLOBAL Y REGIONAL DE LAS SERIES.-**

#### **1.1.- SERIE PLACEBO.-**

Se han utilizado 8 perros, de los cuales 1 falleció durante la experimentación por sangrado abundante y otro fue excluido por no objetivarse caída en la FA de la zona isquémica durante la obstrucción coronaria. La serie final está formada por 6 perros, distribuidos en 5 machos y 1 hembra, con un peso medio de  $30.08 \pm 5.44$  Kgs y un flujo coronario basal de  $37.55 \pm 15.47$  ml/min.

##### **1.1.1.- Parámetros hemodinámicos.-**

Durante las sucesivas fases de isquemia/reperfusión no se registraron cambios significativos, con respecto a los basales, en ninguno de los parámetros hemodinámicos analizados, a excepción de la frecuencia cardíaca (FC). Vemos que la FC sufre oscilaciones a lo largo de la experimentación, a modo de dientes de sierra, con taquicardización durante las isquemias y recuperación durante las reperfusiones, si bien a medida que progresa el protocolo la FC desciende, tanto en la isquemia como en la reperfusión (tabla R.1). Así, observamos una ligera taquicardización durante las primeras isquemias, de hasta un máximo del 8% en la 2ª oclusión ( $p < 0.05$ ) (dato no mostrado en la tabla), para posteriormente estabilizarse e ir disminuyendo progresivamente hasta valores ligeramente inferiores a los basales en las últimas isquemias (ns). Durante las primeras fases de la reperfusión, la FC recupera sus valores basales, para ir disminuyendo posteriormente y alcanzar cifras inferiores a las basales, de hasta un máximo del 13% en la reperfusión nº 19 ( $p < 0.001$ ) (dato no mostrado).

En cuanto a la presión intraventricular izquierda (PVI), ésta no experimenta variaciones significativas a lo largo de todo el protocolo isquémico, aunque existe una ligera disminución en las isquemias iniciales, para recuperar los valores basales durante las diferentes reperfusiones.

Similar comportamiento encontramos en la  $dp/dt$  que tiende a disminuir discretamente en las primeras isquemias, para recuperarse completamente durante las fases de reperfusión, y sin encontrar diferencias significativas con respecto a los valores iniciales en los diferentes procesos de isquemia/reperfusión.

	<i>FC</i> (lpm)	<i>PVI</i> (mmHg)	<i>dP/dt</i> (mmHg/s)
<b>BASAL</b>	146.66 ± 21.36	135 ± 18.69	3000 ± 707
<b>1ª Isquemia</b>	156.66 ± 23.16	131.16 ± 24.78	3000 ± 741.61
<b>1ª Reperusión</b>	151.66 ± 21.13	138.16 ± 21.27	3166.66 ± 917.43
<b>5ª Isquemia</b>	153.33 ± 19.66	129.60 ± 24.54	2833.33 ± 861.20
<b>5ª Reperusión</b>	140.83 ± 21.54	134.16 ± 18.86	2916.66 ± 957.42
<b>10ª Isquemia</b>	150.83 ± 18.55	131 ± 16.01	3166.66 ± 625.83
<b>10ª Reperusión</b>	135 ± 15.16 *	132.83 ± 17.93	3166.66 ± 625.83
<b>15ª Isquemia</b>	136 ± 15.16	131.40 ± 18.80	3100 ± 675.46
<b>15ª Reperusión</b>	131 ± 13.41 *	135 ± 18.42	3150 ± 675.46
<b>20ª Isquemia</b>	141.66 ± 16.02	132.40 ± 22.86	3100 ± 720.24
<b>20ª Reperusión</b>	132.50 ± 16.95**	135.66 ± 19.06	3125 ± 607.24

**TABLA R.1.-** Parámetros hemodinámicos de la serie PLACEBO.

FC: frecuencia cardíaca; PVI: presión sistólica del ventrículo izquierdo; dP/dt: derivada de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo; significación estadística respecto a situación basal = \* p < 0.05;

\*\* p < 0.01.

### 1.1.2.- Parámetros de función regional.-

#### A) Zona isquémica.-

La LTD experimenta un ascenso significativo durante las oclusiones coronarias, de hasta un 10% en la isquemia nº 16 (p < 0.01), con recuperación de los valores basales en las primeras reperfusiones, para situarse durante las últimas reperfusiones en valores por encima de los basales (p < 0.01).

Se produce un incremento significativo de la LTS durante la aplicación de todas las oclusiones, con un máximo del 26% en la isquemia nº 16 (p = 0.008), con tendencia a la recuperación de los valores iniciales durante las reperfusiones, pero manteniendo cifras por encima de las basales en las últimas reperfusiones (p < 0.01).

Finalmente, como se observa en la tabla R.2, la FA sufre una caída significativa durante las oclusiones coronarias, con valores por debajo de 0 (acinesia/discinesia), con un descenso máximo durante la isquemia nº 15 (101% respecto del valor basal). Durante las

sucesivas fases de reperfusión se objetiva una recuperación desigual de la FA; así en las dos primeras reperfusiones los valores superan ligeramente a los basales, mientras que en las siguientes reperfusiones la recuperación es menor, situándose en cifras por debajo de las basales, con una afectación máxima en la reperfusión n° 20, donde la FA se sitúa en un 36% por debajo del valor basal ( $p < 0.05$ ).

	<i>LTD</i> (mm)	<i>LTS</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	15.06 ± 2.62	13.16 ± 2.41	12.93 ± 2.94
<b>1ª Isquemia</b>	15.47 ± 2.05	15.50 ± 1.97*	-0.21 ± 1.79 *
<b>1ª Reperfusión</b>	14.46 ± 2.19	12.54 ± 1.99	13.27 ± 3.05
<b>5ª Isquemia</b>	16.38 ± 2.28**	16.38 ± 2.31* **	0.001 ± 1.55***
<b>5ª Reperfusión</b>	15.50 ± 2.60	14.16 ± 2.82	8.93 ± 4.17
<b>10ª Isquemia</b>	16.28 ± 2.35 **	16.25 ± 2.50 ***	0.31 ± 1.75 ***
<b>10ª Reperfusión</b>	15.48 ± 2.51	14.06 ± 2.77	9.53 ± 3.52
<b>15ª Isquemia</b>	16.96 ± 2.06**	16.96 ± 2.05**	-0.01 ± 1.55 **
<b>15ª Reperfusión</b>	16.32 ± 2.15	14.94 ± 2.34	8.67 ± 3.04
<b>20ª Isquemia</b>	16.58 ± 2.33 **	16.55 ± 2.32 ***	0.18 ± 1.76 **
<b>20ª Reperfusión</b>	15.78 ± 2.52 **	14.50 ± 2.63*	8.36 ± 2.93*

**TABLA R.2.-** Parámetros de función regional de la zona isquémica de la serie PLACEBO.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento. Significación estadística respecto a situación basal: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

### **B) Zona control.-**

Durante la realización del protocolo isquémico, la longitud telediastólica (LTD) se mantiene en valores ligeramente por encima de las cifras basales en las distintas fases de isquemia y reperfusión, con un incremento máximo del 4%, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas.

La longitud telesistólica (LTS) no experimenta variaciones significativas, manteniendo valores muy similares a los basales, tanto en las fases de isquemia como de reperfusión.

Cuando analizamos la fracción de acortamiento (FA), se objetiva un incremento cercano a la significación de sus valores en las fases de isquemia de hasta un 74% en la

oclusión n° 11 ( $p= 0.05$ ) (dato no mostrado), con tendencia a recuperar sus valores iniciales durante las reperfusiones, pero manteniendo cifras en todo momento por encima de los valores basales (ns).

	<i>LTD</i> (mm)	<i>LTS</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	10.75± 1.67	10.03 ± 1.49	6.56 ± 3.00
<b>1ª Isquemia</b>	11 ± 1.74	9.98 ± 1.36	8.87 ± 5.17
<b>1ª Reperusión</b>	10.93 ± 1.65	10.15 ± 1.36	6.94 ± 3.20
<b>5ª Isquemia</b>	11.06 ± 1.74	9.93 ± 1.41	9.93 ± 5.49
<b>5ª Reperusión</b>	10.88 ± 1.73	10.06 ± 1.53	7.38 ± 3.62
<b>10ª Isquemia</b>	11.05 ± 1.65	9.90 ± 1.43	10.21 ± 5.95
<b>10ª Reperusión</b>	10.88 ± 1.58	9.95 ± 1.46	8.55 ± 4.02
<b>15ª Isquemia</b>	10.64 ± 1.57	9.78 ± 1.63	8.29 ± 4.02
<b>15ª Reperusión</b>	10.52 ± 1.50	9.84 ± 1.61	6.70 ± 3.69
<b>20ª Isquemia</b>	11.23 ± 1.24	10.11 ± 0.97	9.68 ± 5.40
<b>20ª Reperusión</b>	11.05 ± 1.06	10.18 ± 0.84	7.69 ± 3.14

**TABLA R.3.-** Parámetros de función regional de la zona control de la serie Placebo.

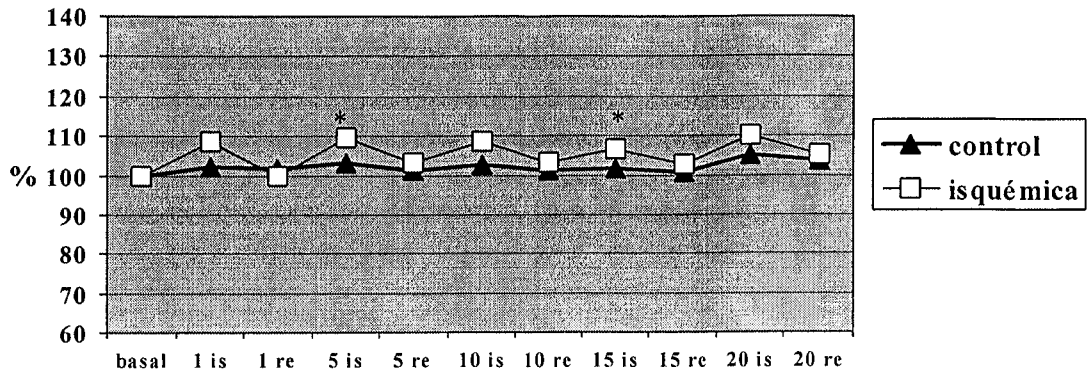
### 1.1.3.- Comparación entre zona isquémica y zona control.-

Cuando analizamos las diferentes zonas involucradas (zona isquémica y zona control), observamos que la LTD experimenta un incremento significativo en la zona isquémica en relación con la zona control durante las isquemias ( $p < 0.05$ ), con tendencia a la recuperación de los valores basales durante la reperusión, pero manteniéndose en valores ligeramente por encima de los de la zona control (ns).

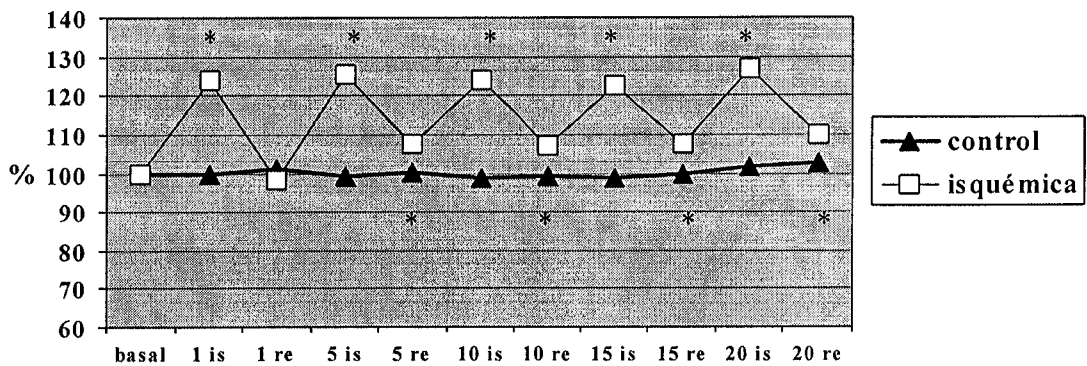
Un comportamiento similar presenta la LTS, con un incremento mayor y significativo de sus valores durante las obstrucciones en la zona isquémica en relación a la zona control ( $p < 0.05$ ), con tendencia a la normalización y equiparación durante las reperfusiones en ambas zonas, pero manteniéndose en valores ligeramente superiores a los encontrados en la zona control ( $p < 0.05$ ).

Con respecto a la FA, es muy evidente la caída que experimenta en la zona isquémica durante la oclusión coronaria, hasta alcanzar valores próximos a la discinesia, mientras que en la zona control ésta se mantiene en valores por encima de los basales de hasta un 70% ( $p < 0.001$ ). Durante la reperfusión la FA tiende a normalizarse en ambas zonas, si bien los valores son inferiores en la zona isquémica en comparación con la zona control ( $p < 0.05$ ).

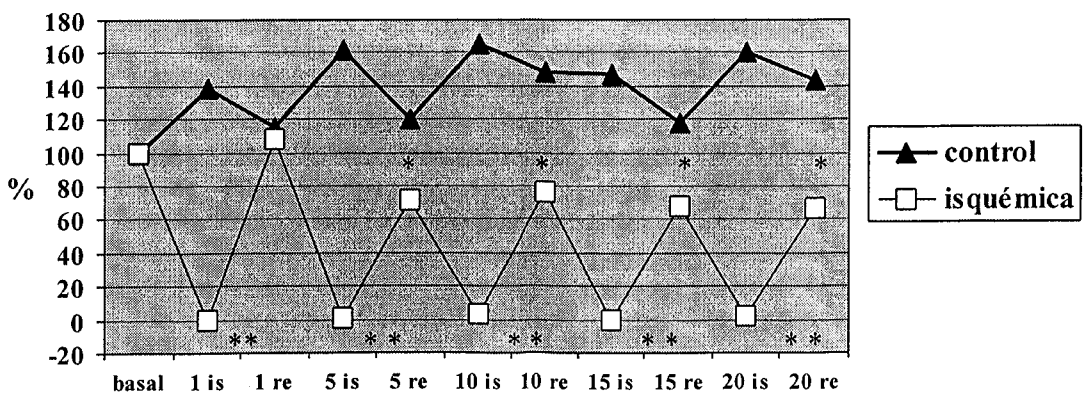
**A) LTD**



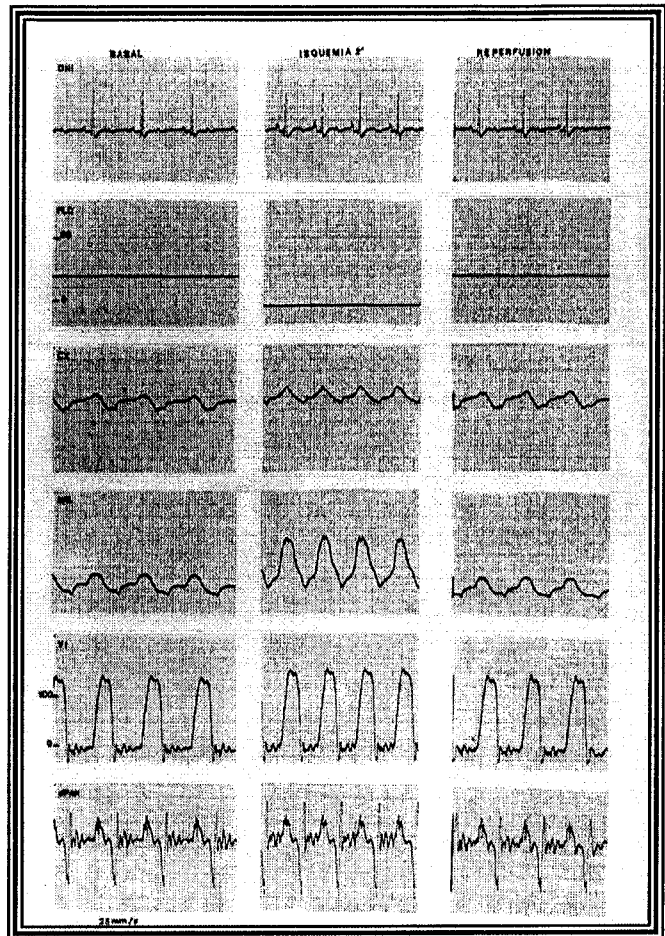
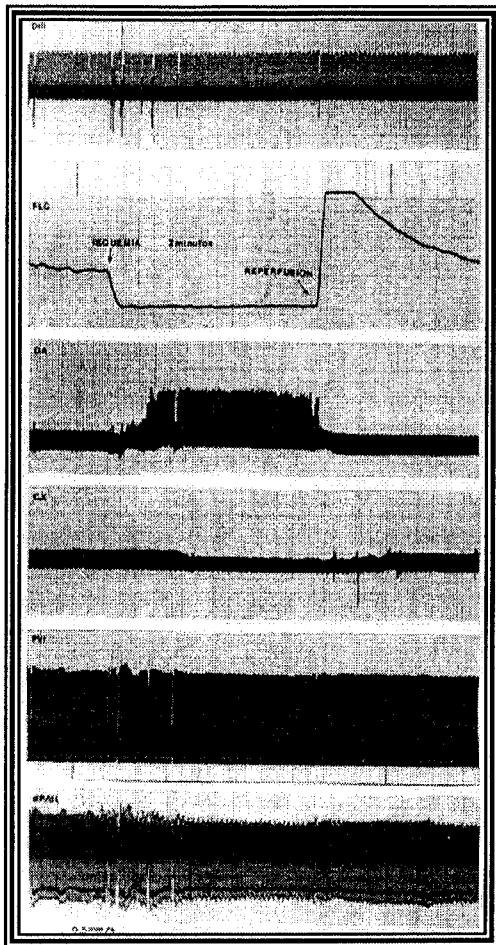
**B) LTS**



**C) Fracción de Acortamiento**



**Figura R.1 (A, B y C).**- Representación de la evolución de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento de las zonas isquémica y control de la serie PLACEBO. Is: isquemia; Re: reperfusión. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .



**Figura R.2.-** A la izquierda. Registro en papel milimetrado a 1mm/seg de ECG, curvas de longitud de los segmentos miocárdicos isquémicos (DA: art. descendente anterior) y control (Cx: art. circunfleja), presión ventricular izquierda (PVI), flujo coronario (FLC) y  $dP/dt$  durante dos minutos de oclusión coronaria. Se observa cómo durante la oclusión se produce en la zona isquémica un desplazamiento de la curva por alargamiento de la longitud telediastólica y telesistólica. En la zona control existe un mínimo acortamiento. No se aprecian cambios en los trazados de ECG, PVI y  $dP/dt$ . El flujo coronario tras la oclusión se mantiene en valor 0, presentando una hiperperfundión reactiva tras la desostrucción, tendiendo a normalizarse a lo largo de los 3 minutos de reperfundión.

A la derecha: registro en papel milimetrado a 25 mm/seg. Se muestra la evolución de los registros en situación basal, tras una isquemia de dos minutos y tras una reperfundión de tres minutos. Observamos, con más detalle, el desplazamiento de la curva correspondiente al segmento isquémico (IVA: art. descendente anterior) por alargamiento de las longitudes telediastólica y telediastólica durante la isquemia, y como esta curva se recupera durante la reperfundión.



## **1.2.- SERIE TRIMETAZIDINA.**

Hemos analizado un total de 7 perros mestizos, de los cuales fue descartado uno al no objetivarse caída de la FA de la zona isquémica durante la obstrucción coronaria, ya sea debido a circulación colateral o a implantación de los microcristales en zona periisquémica. La muestra final está formada por 6 perros, distribuidos en 5 machos y 1 hembra, con un peso medio de  $24.25 \pm 3.14$  kgs y un flujo coronario basal de  $40.10 \pm 7.63$  ml/min.

### **1.2.1. Parámetros hemodinámicos.-**

En esta serie, la FC se mantiene en las primeras 5 isquemias en valores por encima del valor basal, alcanzando valores próximos a la significación en la primera oclusión donde aumenta un 6% ( $p=0.07$ ), con recuperación en las fases de reperfusión para, posteriormente, ir disminuyendo progresivamente en las últimas fases del protocolo donde se sitúa en valores por debajo de los basales, pero sin encontrar diferencias significativas, ni durante las oclusiones ni durante las reperfusiones.

La PVI experimenta un descenso significativo de su valor en las primeras oclusiones, de hasta un 9,5 % ( $p < 0.02$ ) (dato no mostrado en tabla), para posteriormente situarse en cifras ligeramente por debajo de las basales, pero sin diferencias significativas y con tendencia a la recuperación durante las diferentes reperfusiones.

La  $dp/dt$  experimenta también un discreto descenso, no significativo, en las primeras 8 isquemias, con recuperación durante las reperfusiones, pero sin alcanzar diferencias significativas respecto a los valores basales.

	<i>FC</i> (lpm)	<i>PVI</i> (mmHg)	<i>dP/dt</i> (mmHg/s)
<b>BASAL</b>	141.66 ± 17.22	140.83 ± 12.81	3166.66 ± 957.42
<b>1ª Isquemia</b>	150.16 ± 17.96	135.40 ± 15.75	3250 ± 829.15
<b>1ª Reperusión</b>	140 ± 20.73	137.83 ± 15.75	3250 ± 724.56
<b>5ª Isquemia</b>	142.83 ± 14.77	127 ± 19.02	2958.33 ± 797.13
<b>5ª Reperusión</b>	136.66 ± 15.38	134.33 ± 18.51	3125 ± 754.15
<b>10ª Isquemia</b>	136.66 ± 16.93	133 ± 16.67	3250 ± 836.66
<b>10ª Reperusión</b>	132.50 ± 21.62	137.33 ± 20.41	3166.66 ± 875.59
<b>15ª Isquemia</b>	137.50 ± 19.42	143 ± 18.23	3250 ± 883.88
<b>15ª Reperusión</b>	131.66 ± 26.58	143.80 ± 20.54	3300 ± 1050.78
<b>20ª Isquemia</b>	129 ± 11.40	135.20 ± 27.97	3500 ± 810.09
<b>20ª Reperusión</b>	125 ± 11.72	137.80 ± 27.09	3400 ± 762.39

**TABLA R.4.-** Parámetros hemodinámicos de la serie TRIMETAZIDINA.

FC: frecuencia cardíaca; PVI: presión sistólica del ventrículo izquierdo; dP/dt: derivada de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo.

### 1.2.2. Parámetros de función regional.-

#### A) Zona isquémica.-

La LTD experimenta un aumento de sus valores durante las oclusiones, siendo significativo en la gran mayoría de ellas, con un máximo del 11% ( $p < 0.05$ ) (no mostrado en tabla), con tendencia a recuperar los valores basales durante las diferentes reperfusiones, pero situándose en cifras ligeramente por encima de las iniciales, más acusado en las últimas reperfusiones, donde la diferencia alcanza el 13% ( $p < 0.05$ ).

La LTS muestra un comportamiento muy parecido, con un aumento significativo en todas las fases de isquemia, con un máximo de un 23% ( $p = 0.002$ ), con recuperación durante las reperfusiones, pero manteniendo siempre valores ligeramente por encima de los basales, entre un 6-8%, y sin encontrar diferencias significativas.

Como se observa en la tabla R.5, la FA se sitúa en valores de acinesia/discinesia durante las oclusiones (más acusado en las primera 6 isquemias), con un descenso máximo de un 105% en la 3ª isquemia ( $p < 0.02$ ) (dato no mostrado). En las fases de reperfusión se objetiva una recuperación completa de la FA, sobrepasando ligeramente los valores basales, de hasta un 29% (ns). Al final del protocolo, la FA está ligeramente por debajo del valor basal, pero sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas ( $8.92 \pm 4.74$  vs  $9.57 \pm 3.94$ ).

	<i>LTD</i> (mm)	<i>LTS</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	13.12 ± 2.97	11.84 ± 2.62	9.57 ± 3.94
<b>1ª Isquemia</b>	13.55 ± 2.76 **	13.50 ± 2.85 ***	0.49 ± 1.59 *
<b>1ª Reperfusión</b>	13.06 ± 3.10	11.48 ± 2.52	11.71 ± 4.86
<b>5ª Isquemia</b>	14.36 ± 3.55 **	14.36 ± 3.57 **	0.06 ± 1.33 **
<b>5ª Reperfusión</b>	13.70 ± 3.72	12.20 ± 3.03	10.46 ± 3.81
<b>10ª Isquemia</b>	13.60 ± 3.42	13.55 ± 3.33 **	0.30 ± 2.10 *
<b>10ª Reperfusión</b>	13.86 ± 3.67	12.34 ± 2.89	10.29 ± 4.95
<b>15ª Isquemia</b>	14.52 ± 3.46 **	14.44 ± 3.37 ***	0.46 ± 2.17 *
<b>15ª Reperfusión</b>	13.98 ± 3.59	12.64 ± 3.10	9.24 ± 4.02
<b>20ª Isquemia</b>	14.56 ± 3.55**	14.50 ± 3.40***	0.23 ± 1.84 *
<b>20ª Reperfusión</b>	14.20 ± 3.69*	12.87 ± 3.33	8.92 ± 4.74

**TABLA R.5.-** Parámetros de función regional de la zona isquémica de la serie TRIMETAZIDINA.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento. Significación estadística respecto a situación basal: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.005$ .

### **B) Zona control.-**

Ni la LTD ni la LTS sufren cambios significativos durante la realización del protocolo isquémico, con mínimo aumento de sus valores durante las oclusiones y normalización en las reperfusiones hasta valores ligeramente por debajo de los basales (ns).

En cuanto a la FA se objetiva un aumento ligero de sus valores de hasta un 25%, no significativo, en las oclusiones, con recuperación de valores próximos a los basales durante las reperfusiones.

	<i>LTD</i> (mm)	<i>LTS</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	10.78 ± 1.24	9.86 ± 1.61	8.91 ± 5.25
<b>1ª Isquemia</b>	10.93 ± 1.12	9.80 ± 1.60	10.68 ± 7.78
<b>1ª Reperusión</b>	10.71 ± 1.35	9.76 ± 1.74	9.34 ± 6.03
<b>5ª Isquemia</b>	10.75 ± 1.48	9.68 ± 1.83	10.33 ± 7.28
<b>5ª Reperusión</b>	10.68 ± 1.43	9.76 ± 1.80	9.03 ± 6.37
<b>10ª Isquemia</b>	10.78 ± 1.62	9.66 ± 2.03	10.79 ± 8.89
<b>10ª Reperusión</b>	10.75 ± 1.53	9.85 ± 1.90	8.87 ± 6.02
<b>15ª Isquemia</b>	10.91 ± 1.49	9.80 ± 1.76	10.52 ± 6.73
<b>15ª Reperusión</b>	10.81 ± 1.50	9.81 ± 1.89	9.70 ± 6.90
<b>20ª Isquemia</b>	10.72 ± 1.60	9.44 ± 1.77	12.13 ± 6.88
<b>20ª Reperusión</b>	10.68 ± 1.65	9.60 ± 1.97	10.55 ± 5.97

**TABLA R.6.-** Parámetros de función regional de la zona control de la serie TRIMETAZIDINA.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento.

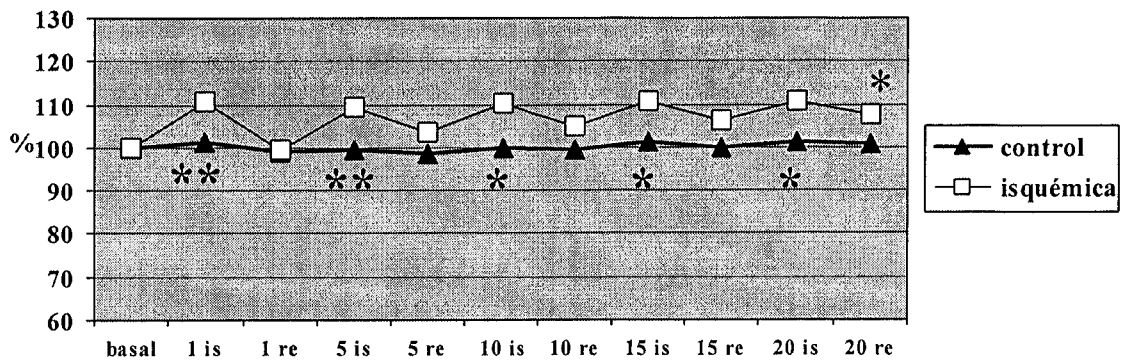
### 1.2.3. Comparación zona control vs zona isquémica.-

Con respecto a la LTD, ésta experimenta un incremento mayor y significativo de sus valores en la zona isquémica durante las oclusiones ( $p < 0.005$ ), con tendencia a la normalización durante las reperfusiones, pero manteniéndose siempre en cifras superiores a los de la zona control, en especial en las ultimas fases ( $p < 0.05$ ).

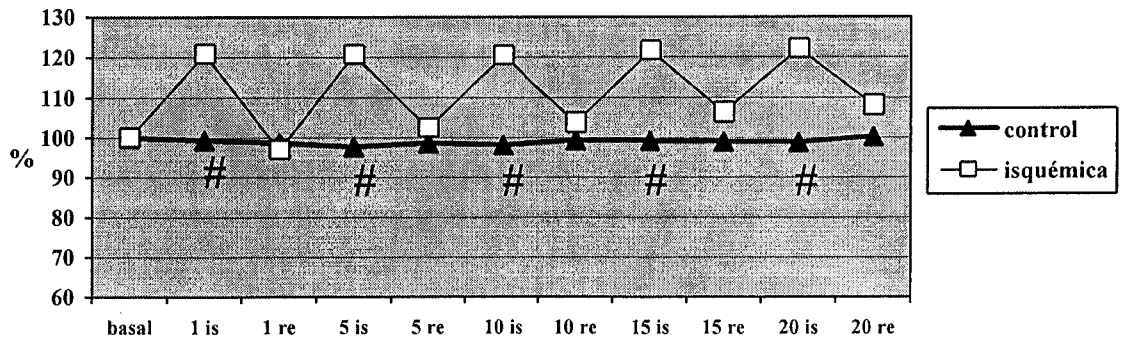
Un comportamiento similar se observa con la LTS, la cual experimenta un mayor incremento de sus valores, estadísticamente significativo, en la zona isquémica en relación a la zona control durante la realización de las diferentes obstrucciones, con recuperación de los valores basales durante las reperfusiones de ambas zonas, si bien en las últimas 10 reperfusiones los valores de la zona isquémica permanecen más elevados que en la zona control, aunque no de forma significativa ( $p = 0.09$ ).

Con respecto a la FA es llamativo el descenso significativo que se produce en la zona isquémica durante las obstrucciones con respecto a la zona control, alcanzando valores cercanos a la acinesia/discinesia; mientras que en la zona control ésta se mantiene en valores ligeramente por encima de los basales. Durante la reperfusión la FA tiende a recuperarse en la zona isquémica, superando los valores basales, mientras que en la zona control ésta se encuentra en valores algo inferiores, sin diferencias significativas entre ambas zonas.

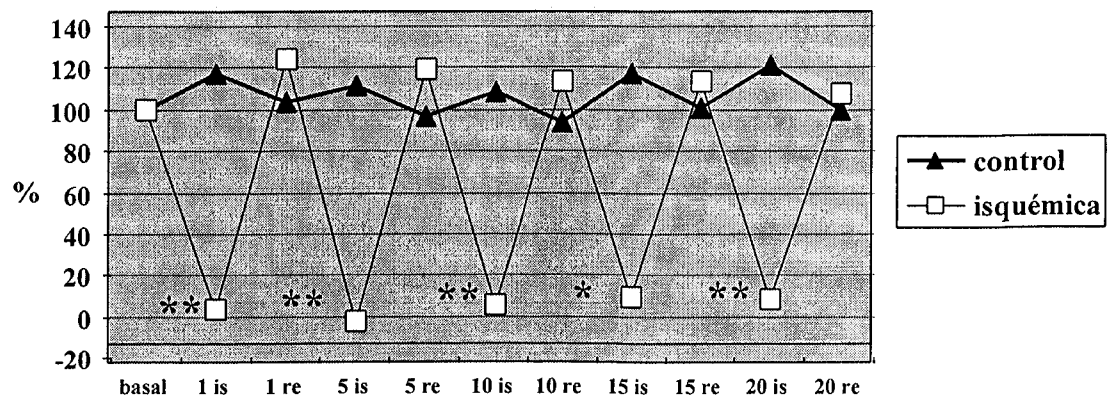
**A) LTD**



**B) LTS**



**C) Fracción de acortamiento**



**Figura R.3 (A, B y C).**- Evolución de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento de las zonas isquémica y control de la serie TMZ.

Is: isquemia; Re: reperfusión. \*  $p < 0.05$  ; \*\*  $p < 0.005$  ; #  $p < 0.001$ .

### **1.3.- COMPARACIÓN SERIE PLACEBO vs SERIE TRIMETAZIDINA.-**

Ambas series presentan características similares en cuanto a la distribución por sexo y el flujo coronario basal, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Con respecto al peso, éste es ligeramente inferior en el grupo TMZ, con una  $p < 0.05$  ( $24.25 \pm 3.14$  Kgs vs  $30.08 \pm 5.55$  Kgs).

#### **1.3.1. Parámetros hemodinámicos.-**

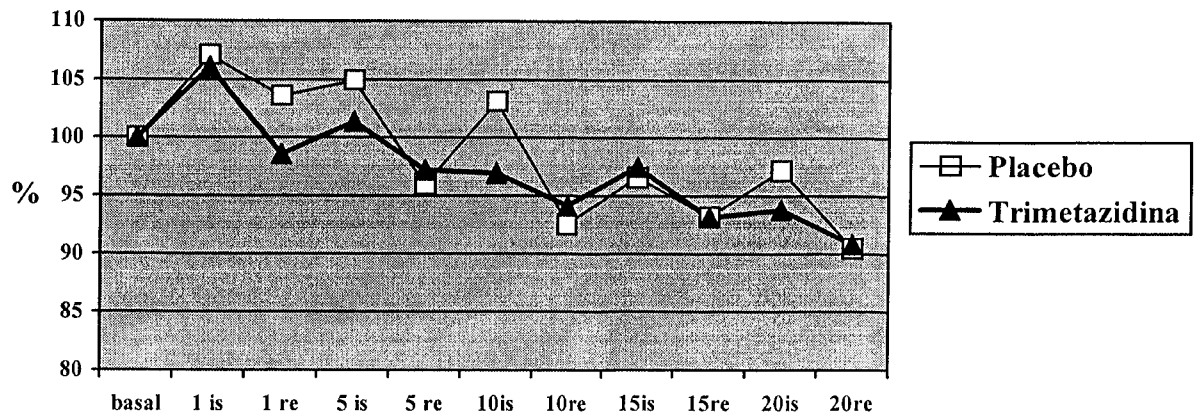
Debemos señalar que los animales parten, en situación basal, de unos valores de FC, PVI y  $dP/dt$  muy similares entre ambos grupos, PLACEBO y TMZ, con diferencias menores del 5%, no significativas estadísticamente.

Cuando analizamos la evolución de la FC, vemos que, si bien ésta presenta unas variaciones similares en ambas series, en dientes de sierra, durante la aplicación del protocolo experimental (tanto en las fases de isquemia como de reperfusión), sin diferencias significativas, en el grupo TMZ existe una menor taquicardización durante las primeras 11 isquemias, igualándose y superando los valores del grupo Placebo en las últimas isquemias. En cuanto a las reperfusiones, la FC no experimenta diferencias significativas en ambos grupos, con una taquicardización ligeramente superior en el grupo TMZ en las últimas reperfusiones.

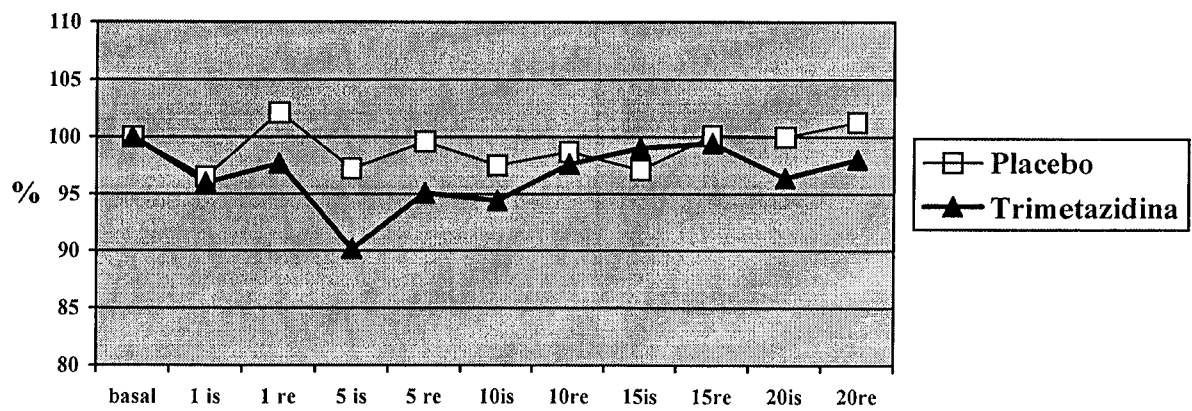
La PVI no presenta grandes oscilaciones de sus valores, con un comportamiento muy similar en ambas series en las diferentes fases de isquemia/reperfusión, con valores discretamente menores en el grupo TMZ, a excepción de la isquemia nº 6 con una diferencia máxima del 9%, cercana a la significación ( $p=0.05$ ).

La  $dP/dt$  no presenta variaciones llamativas en ambas series, con valores muy cercanos a los basales, y con un comportamiento similar en ambos grupos, sin diferencias significativas.

A) Frecuencia cardíaca



B) PVI



C) dP/dt

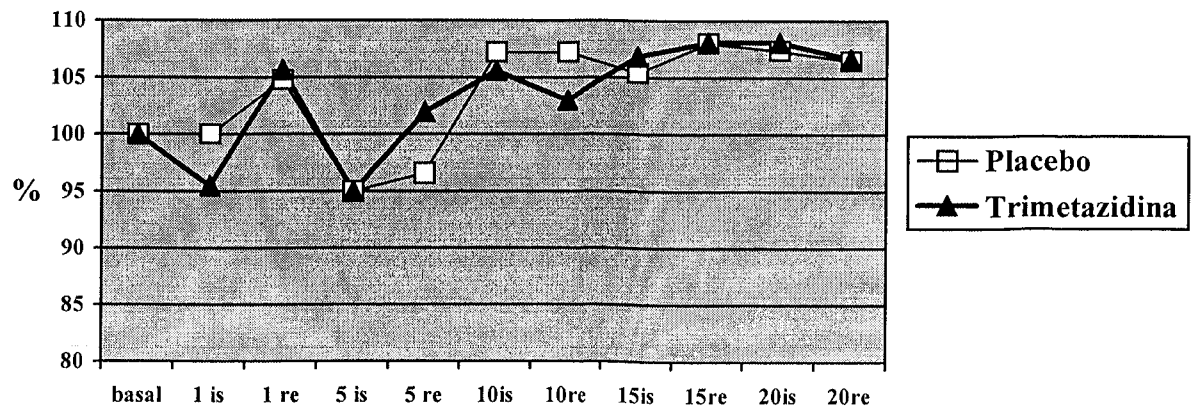


Figura R.4 (A, B y C).- Evolución de la frecuencia cardíaca, PVI y dP/dt de ambas series.  
Isq: isquemia; Re: reperusión.

### 1.3.2.- Parámetros de función regional

#### A) Zona isquémica.

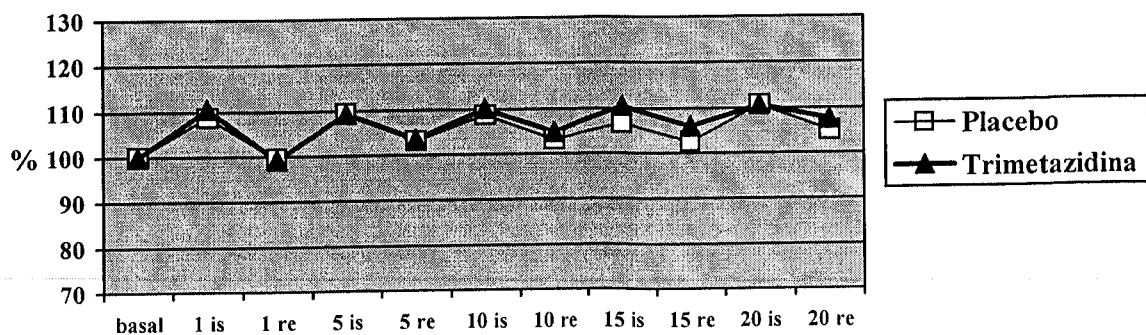
Cuando analizamos las curvas evolutivas de las longitudes telediastólicas, ambas series presentan un patrón muy similar, sin diferencias significativas entre sus valores (figura R.5 A).

Con respecto a la LTS encontramos valores ligeramente superiores en el grupo Placebo durante todas las isquemias, de hasta un máximo del 6% (ns). Durante las reperfusiones, se recuperan los valores basales en ambas series, si bien los valores son discretamente superiores en el grupo Placebo (ns).

Con respecto a la FA y durante la realización de las oclusioniones, ambas series experimentan una caída importante de ésta, con valores de acinesia/discinesia, similares en ambas series.

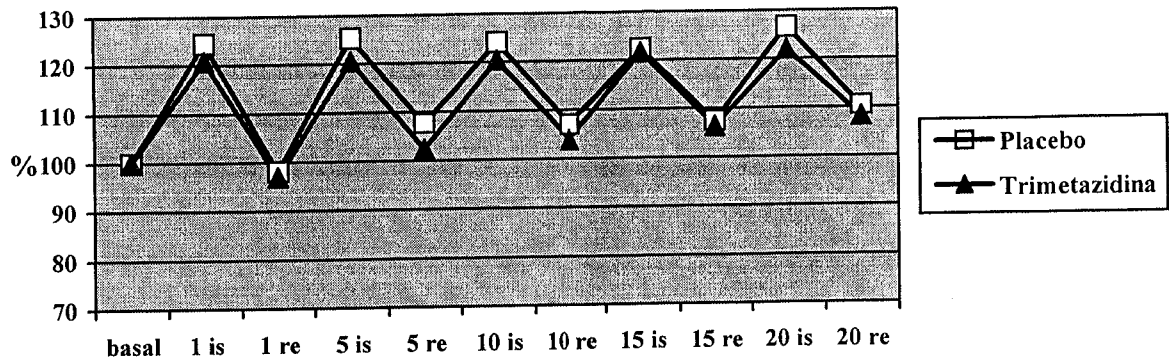
Cuando comparamos la FA en las diferentes reperfusiones, observamos un mayor grado de recuperación en el grupo TMZ que alcanza valores por encima de los basales de hasta un 29% en la reperusión nº 13, pero sin encontrar diferencias estadísticamente significativas respecto al grupo Placebo. Al final del protocolo isquémico, la FA presenta unos valores muy cercanos a los basales en el grupo TMZ, mientras que en la serie Placebo se objetiva una menor recuperación de la FA (aturdimiento), si bien estas diferencias no son significativas (93% vs 64% respectivamente, respecto al valor basal) .

#### A) LTD





B) LTS



C) Fracción de acortamiento

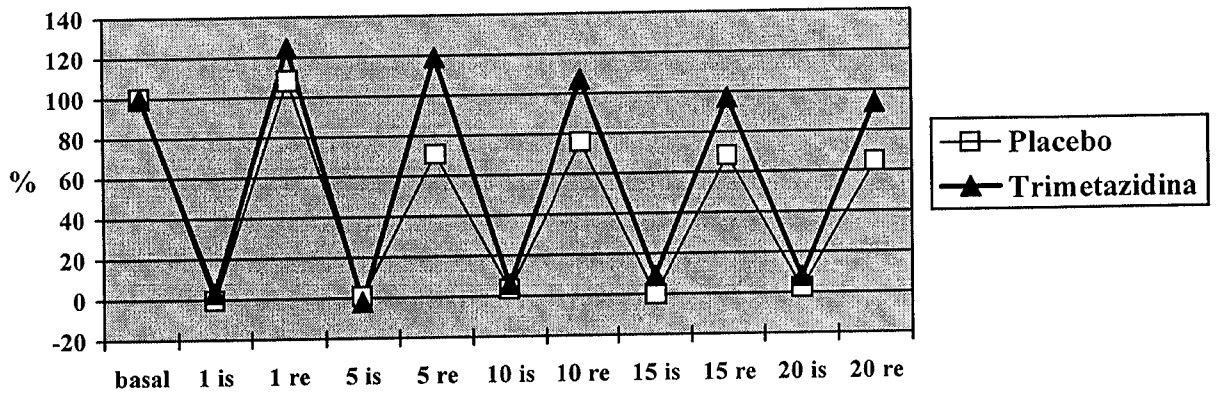


Figura R.5.- Evolución de la longitud telesistólica (LTS), telediastólica (LTD) y fracción de acortamiento de la zona isquémica de ambas series.

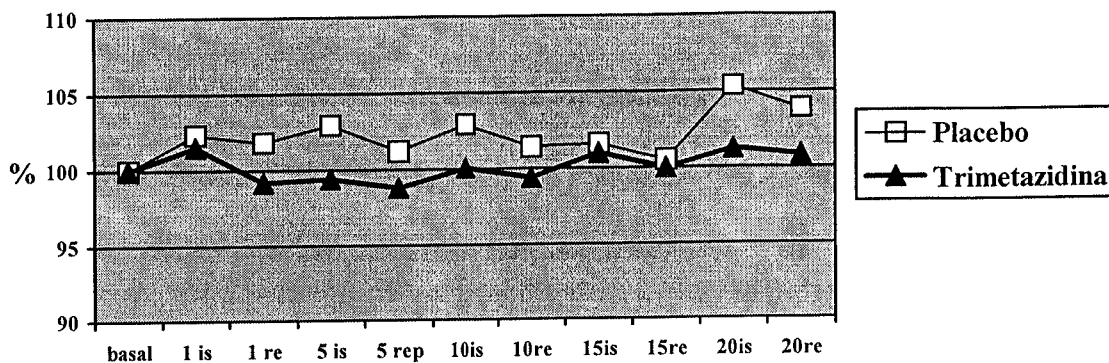
B) Zona control.-

Quando analizamos la LTD de la zona control en ambos grupos, observamos que ésta no sufre variaciones significativas a lo largo de las diferentes isquemias/reperfusiones, manteniendo valores muy similares a los basales en ambos grupos (figura R.6.A).

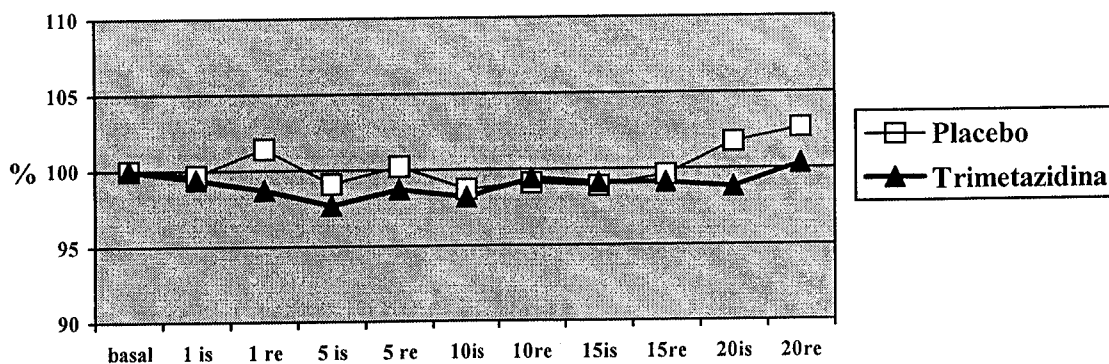
Similar comportamiento encontramos al analizar la LTS que muestra discretos aumentos durante las reperfusiones, muy similares en ambos grupos, pero con cifras mínimamente superiores en el grupo Placebo, sin ser estadísticamente significativos.

La FA sufre un incremento de sus valores durante las sucesivas obstrucciones, más llamativo en el grupo Placebo (de hasta un 72%), pero sin encontrar diferencias significativas respecto al grupo TMZ, cuyo aumento máximo es del 25%. Durante las reperfusiones, la FA tiende a recuperar los valores basales, pero manteniendo cifras superiores en el grupo Placebo respecto al grupo TMZ, sin llegar a ser significativo.

A) LTD



B) LTS



C) Fracción de acortamiento

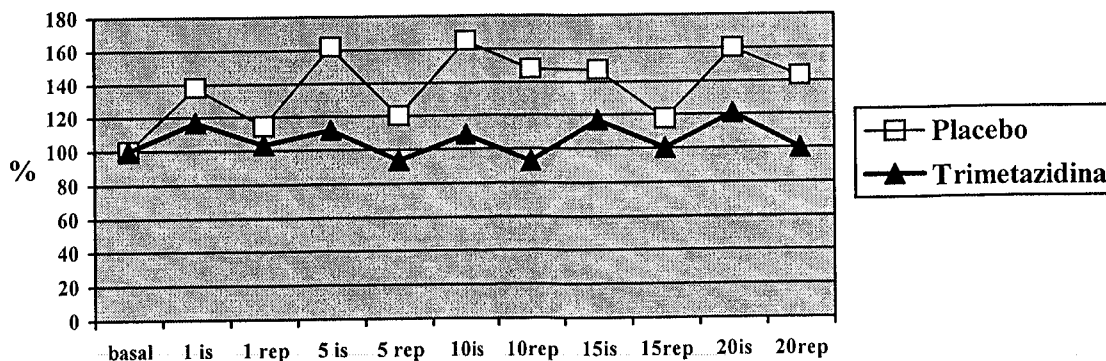


Figura R.6 ( A, B y C). Evolución de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento de la zona control de ambas series.

## **2.- RESULTADOS DEL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.-**

Los diferentes estudios realizados mediante microscopía óptica del tejido miocárdico en ambas series (Placebo y TMZ) no mostraron diferencias morfológicas entre la zona control y la zona sometida a isquemias breves y repetidas.

Cuando el mismo tejido es estudiado mediante microscopía electrónica de transmisión, se observan cambios ultraestructurales significativos. Así, en el tejido miocárdico sometido a isquemias breves y repetidas se evidencian cambios a nivel del núcleo, en cuanto a la disposición intranuclear de la cromatina y, sobre todo, a nivel mitocondrial, donde centramos nuestro estudio, más específicamente en las mitocondrias interfibrilares, dado que éstas mantienen una morfología más uniforme a lo largo del miocito.

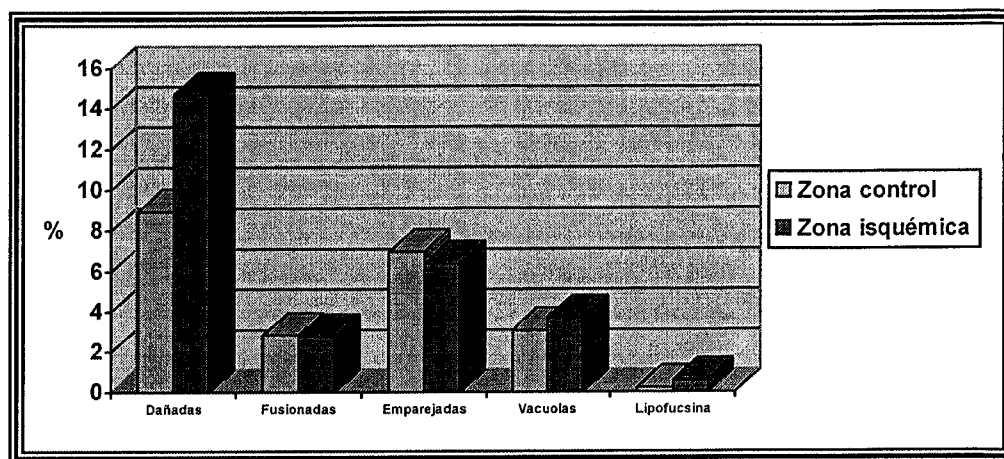
La proyección de las secciones ultrafinas en microscopía electrónica da como resultado una imagen bidimensional, donde se encuentra contenida toda la información de una estructura que es tridimensional. Como consecuencia de ello y para caracterizar mejor los cambios observados, presentamos los resultados en forma de dos tipos de estudio: un estudio cualitativo, donde se contabilizan en el plano bidimensional los cambios observados en las mitocondrias (daño, fusiones, emparejamientos, gránulos de lipofucsina, etc), y un estudio morfológico, donde recogemos datos cuantitativos referentes al tamaño mitocondrial.

### **2.1.- Serie Placebo.-**

Cuando analizamos el tejido miocárdico no sometido a ninguna oclusión (zona control), observamos que siempre existe un pequeño porcentaje de mitocondrias dañadas, las cuales representan el recambio metabólico normal existente en el tejido, y que oscila alrededor del 9%. Además existe un 3% de mitocondrias que han fusionado sus membranas y un 7% de mitocondrias emparejadas (2 o más por sarcómero). Casi un 3% de las mitocondrias presentan vacuolas en su interior y un pequeño porcentaje de mitocondrias (menor del 1%) se corresponden con gránulos de lipofucsina (restos de lípidos y de membrana mitocondriales).

Cuando analizamos el tejido miocárdico inmediatamente tras la realización del protocolo de isquemias breves y repetidas, observamos una serie de diferencias con respecto al área no isquémica, si bien no son estadísticamente significativas. Así, existe una tendencia a un aumento en el porcentaje de mitocondrias dañadas, que alcanza el 14% (8,9% en la zona control), mientras que no se modifican el porcentaje de mitocondrias fusionadas

(2,7%) y emparejadas (6,3%). Con respecto a las vacuolas se produce también un discreto aumento, aunque no de forma significativa (3,7%). Existe una discreta disminución en el número de contactos entre las mitocondrias y un ligero aumento del número de gránulos de lipofucsina, aunque no de forma significativa.

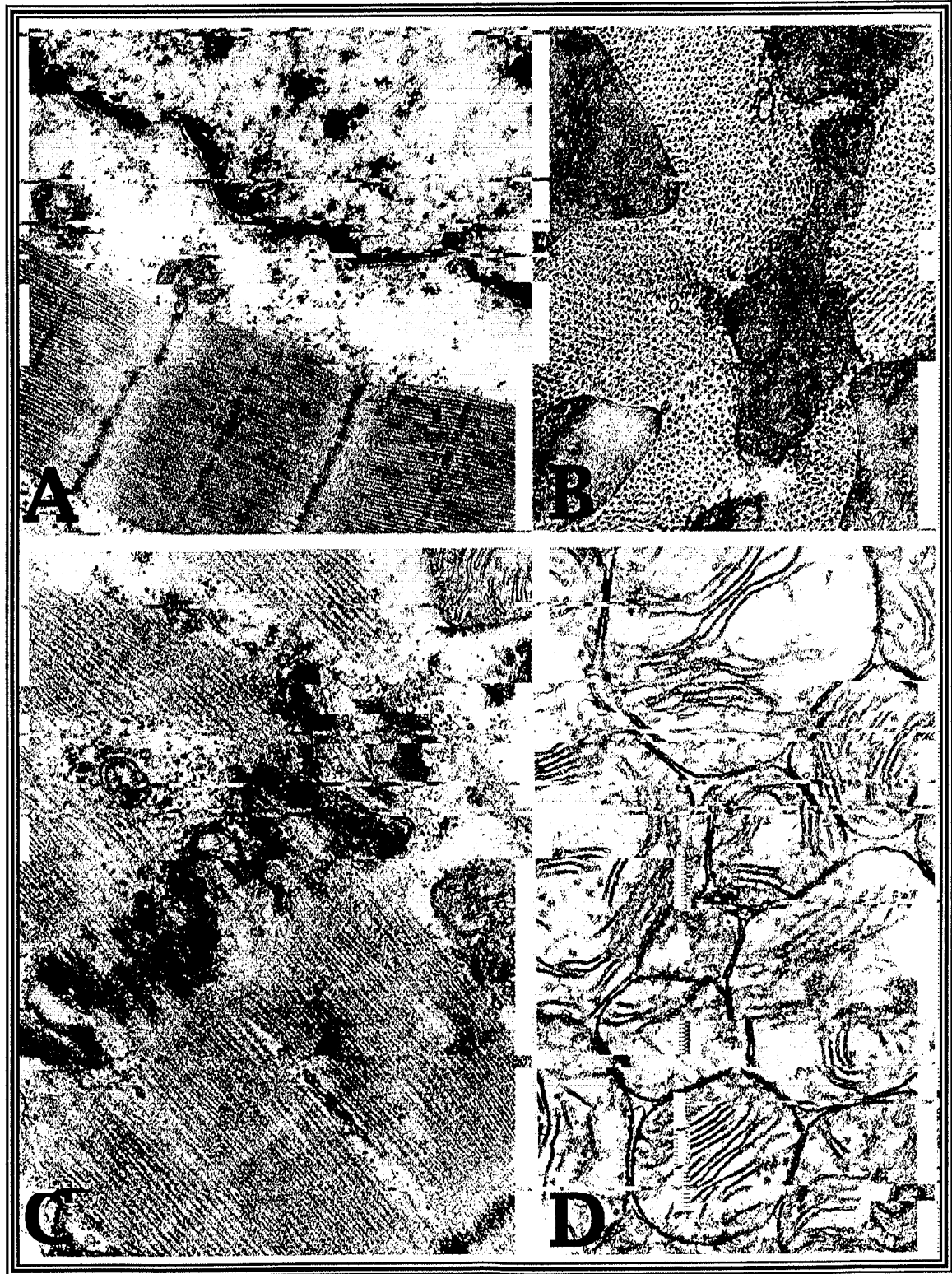


**Figura R.7.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales entre las zonas control e isquémica de la serie placebo.-

En la comparación del tamaño mitocondrial encontramos diferencias significativas entre ambas zonas. Así vemos que las mitocondrias de la zona isquémica presentan un tamaño mayor, con unos valores superiores en el perímetro, área y eje *mayor*, mientras que el eje menor no muestra diferencias significativas.

	<i>Zona Control</i>	<i>Zona isquémica</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.14 ± 1.08	3.27 ± 1.16	0.002
<b>Eje mayor</b>	2.52 ± 0.98	2.67 ± 1.05	0.001
<b>Eje menor</b>	1.37 ± 0.52	1.37 ± 0.54	0.9
<b>Área</b>	0.69 ± 0.43	0.72 ± 0.46	0.055

**Tabla R.7.-**Datos cuantitativos del tamaño mitocondrial de la zona control e isquémica de la serie Placebo. Valores promedio ± desviación. Unidades en micras (Perímetro y ejes) y micras<sup>2</sup> (área).

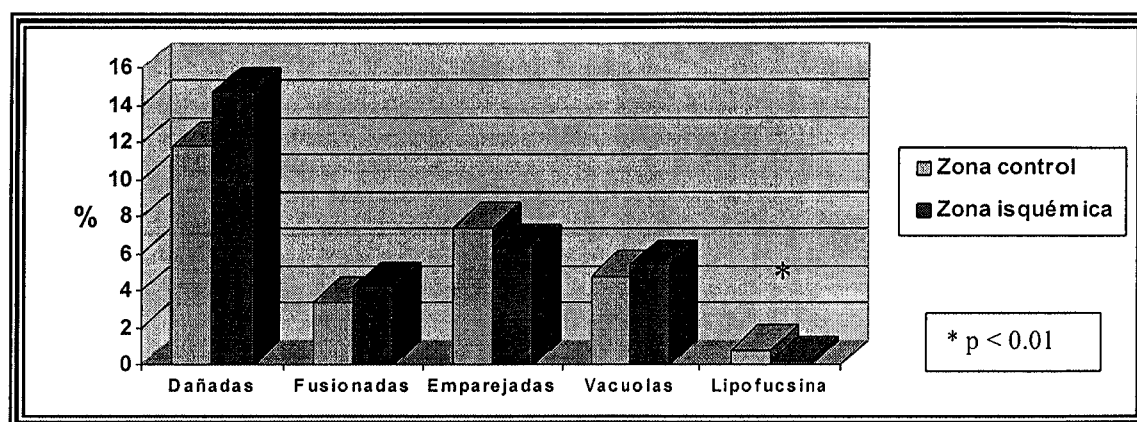


**Figura R.8.-** Imágenes obtenidas mediante microscopía electrónica de transmisión del subendocardio. En la Figura A se observa un conjunto de miofibrillas cercano al núcleo de la célula cardíaca (zona control, sección longitudinal). En la Figura B se han fotografiado mitocondrias y miofibrillas (zona control, sección transversal). En la imagen C se aprecia un disco intercalar. La Figura D se corresponde con una sección transversal de un acumulo de mitocondrias en la proximidad del núcleo durante isquemias breves y repetidas (obsérvese el daño mitocondrial y su aumento de área). Las fotografías están tomadas entre 7000 y 25000 aumentos (X).

## 2.2. Serie Trimetazidina.-

Cuando analizamos la zona control, no sometida a isquemia, del grupo tratado con trimetazidina observamos un 12% de mitocondrias dañadas, un 3.5% de mitocondrias fusionadas, un 5% de mitocondrias con vacuolas y 0,8% de gránulos de lipofucsina. El porcentaje de mitocondrias emparejadas es del 7.5%.

Cuando estudiamos la zona sometida al protocolo isquémico, se produce un discreto aumento de las mitocondrias dañadas (14,6%) y las mitocondrias fusionadas (4,2%) con respecto a la zona control, si bien estas diferencias no resultan estadísticamente significativas. Las vacuolas (5,4%) y las mitocondrias emparejadas (6,3%) no objetivaron variaciones entre las zonas. Llama la atención una disminución significativa de los gránulos de lipofucsina en relación con la zona control ( $p < 0.01$ ).



**Figura R.9.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales entre zona control e isquémica de la serie TMZ.

En el estudio comparativo del tamaño mitocondrial entre ambas zonas, se han observado diferencias significativas. Así vemos que las mitocondrias de la zona isquémica presenta unos valores superiores en cuanto a perímetro y área, mientras que los ejes *mayor* y *menor* no muestran diferencias significativas.

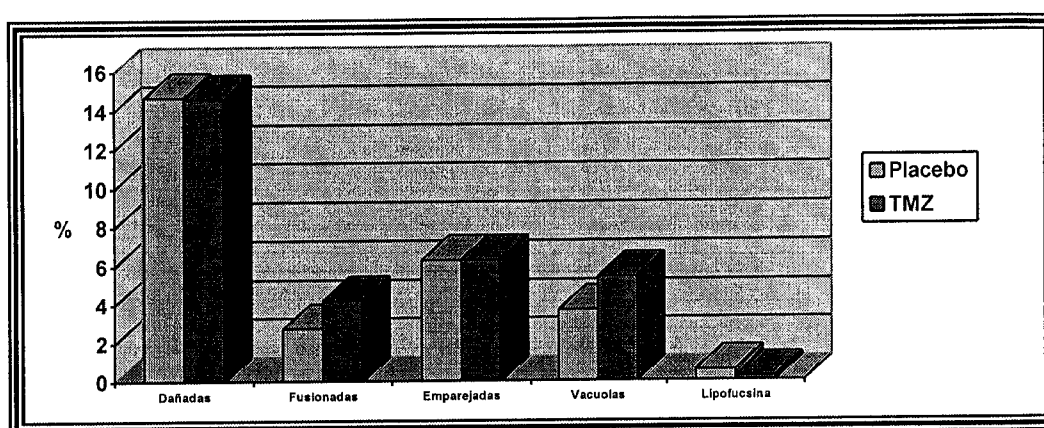
	Zona Control	Zona isquémica	P
<b>Perímetro</b>	3.30 ± 1.26	3.41 ± 1.32	0.023
<b>Eje mayor</b>	2.70 ± 1.15	2.76 ± 1.10	0.14
<b>Eje menor</b>	1.30 ± 0.49	1.34 ± 0.53	0.086
<b>Área</b>	0.71 ± .055	0.75 ± 0.52	0.034

**Tabla R.8.-** Comparación del tamaño mitocondrial entre la zona control e isquémica de la serie TMZ. Valores promedio ± desviación. Unidades en micras (Perímetro y ejes) y micras<sup>2</sup> (área).

### 2.3.- Comparación serie control vs serie trimetazidina.-

#### a) Zona isquémica.-

Cuando comparamos la zona isquémica tras la realización del protocolo entre ambas series, no encontramos diferencias estadísticamente significativas, con un porcentaje de mitocondrias dañadas y mitocondrias emparejadas similar en ambas series. El porcentaje de mitocondrias fusionadas es ligeramente superior en el grupo TMZ, sin llegar a ser significativo. Con respecto a la formación de vacuolas, ésta es discretamente superior en el grupo TMZ (5.4% vs 3.7%). Cuando analizamos los gránulos de lipofucsina, éstos son más numerosos en la serie placebo (0,57% vs 0,19%), sin llegar a ser significativos.

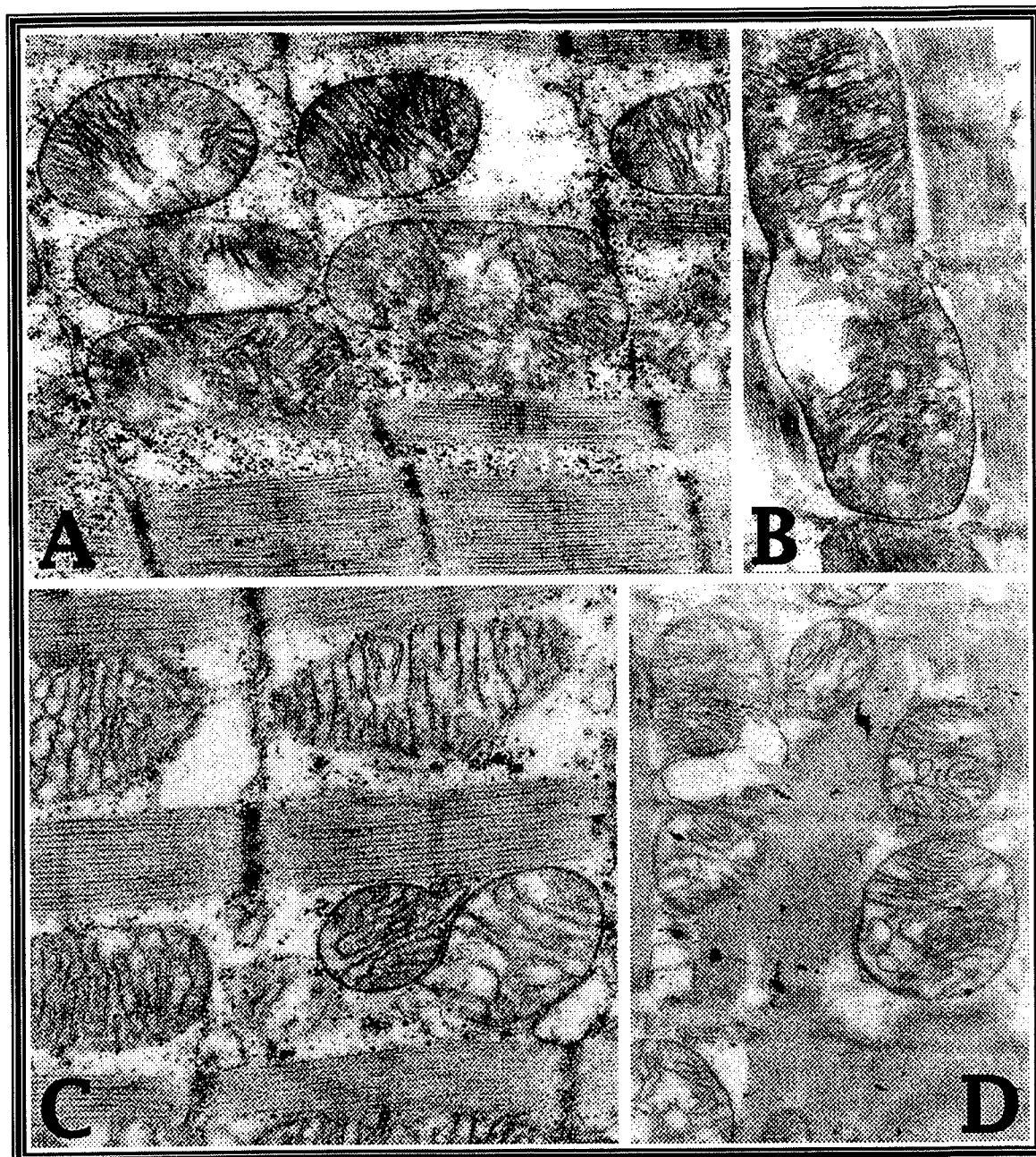


**Figura R.10.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales de la zona isquémica entre la serie placebo y la serie TMZ.

Cuando comparamos los datos referentes al tamaño mitocondrial de la zona isquémica de ambas series encontramos grandes diferencias. Las mitocondrias de la serie TMZ presentan un eje *mayor* y perímetro superiores que las de la serie Placebo ( $p < 0.05$ ), mientras que el eje *menor* no muestra diferencias y el área mitocondrial permanece invariable.

	<i>Serie Placebo</i>	<i>Serie TMZ</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.27 ± 1.16	3.41 ± 1.32	0.003
<b>Eje mayor</b>	2.67 ± 1.05	2.76 ± 1.10	0.05
<b>Eje menor</b>	1.37 ± 0.55	1.34 ± 0.513	0.1
<b>Área</b>	0.72 ± 0.46	0.75 ± 0.52	ns

**Tabla R.9.-** Comparación del tamaño mitocondrial de la zona isquémica entre la serie Placebo y la serie TMZ. Valores promedio ± desviación. Unidades en micras (Perímetro y ejes) y micras<sup>2</sup> (área).

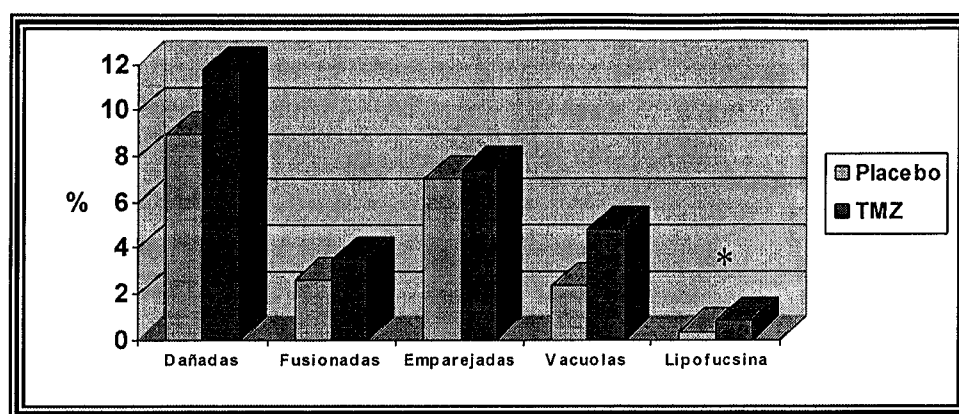


**Figura R.11.-** Imágenes obtenidas del miocardio mediante microscopía electrónica de transmisión sometido a isquemias breve y repetidas (X 7000 a X 12000). Las Figuras A y B corresponden a la zona isquémica en el placebo, con daño mitocondrial, abundancia de gránulos de glucógeno (gl), y un proceso (Figura B, flecha) de fusión mitocondrial (contacto entre mitocondrias de sarcómeros contiguos, por rotura de la banda Z). Las Figuras C y D corresponde a la zona isquémica del tejido tratado con TMZ, observándose también presencia de daño en las mitocondrias y procesos de fusión (Figura D, flecha), y fenómenos de vacuolización intramitocondrial (Figuras C y D, asterisco).



### B) Zona control.-

La comparación de la zona control de ambas series demuestra que existe un mayor porcentaje de gránulos de lipofucsina en el grupo TMZ ( $p < 0.05$ ), así como mayor cantidad de vacuolas, cercana a la significación. Así mismo existe en el grupo tratado con TMZ un discreto aumento en el porcentaje de mitocondrias dañadas (11.8% vs 8,95%) y mitocondrias fusionadas (3.4% vs 2,6%), pero sin diferencias estadísticamente significativas. El porcentaje de mitocondrias emparejadas es similar en ambas series.

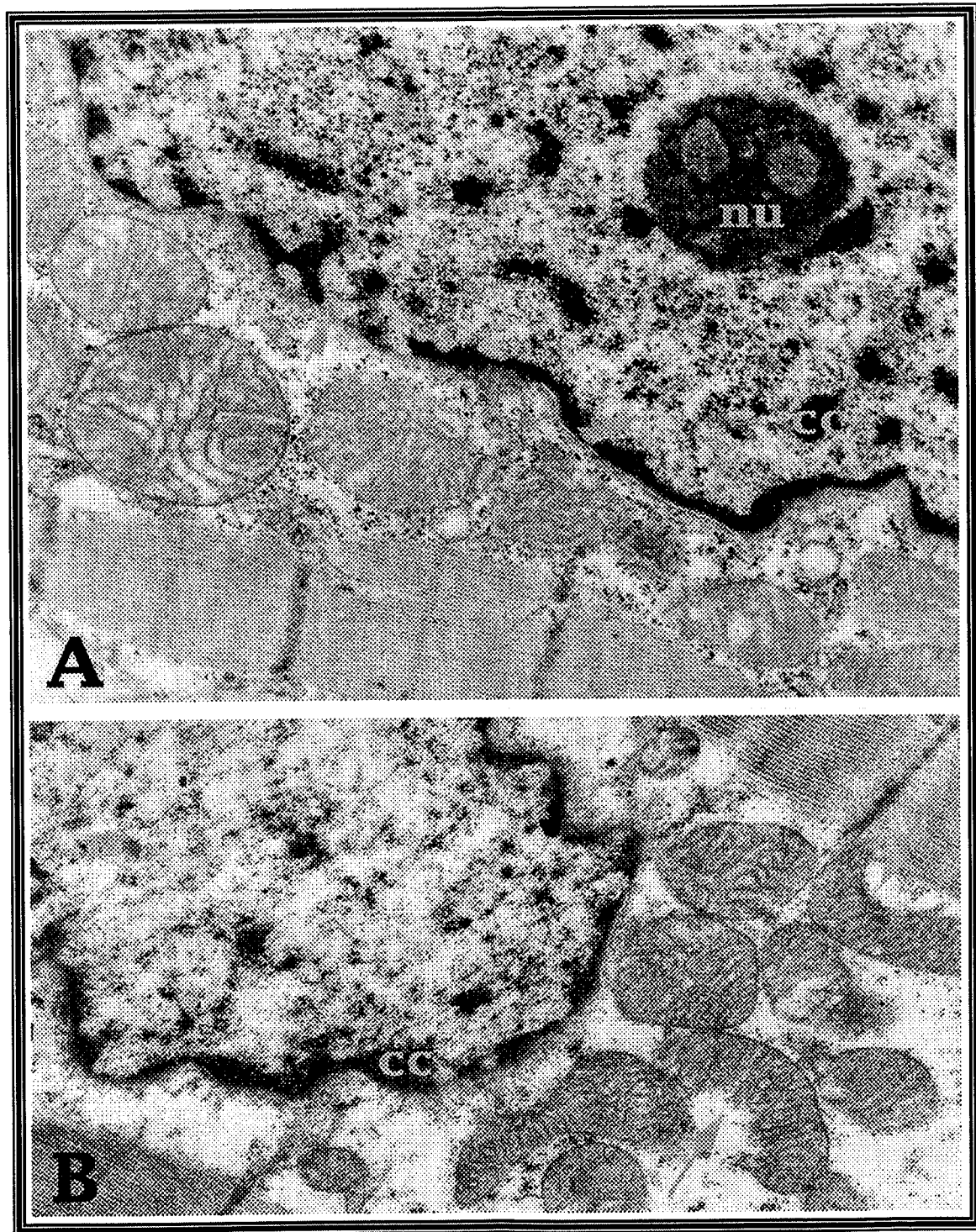


**Figura R.12-** Comparación de las alteraciones mitocondriales de la zona control entre la serie placebo y la serie TMZ. \*  $p < 0.05$ .

En el análisis estereológico, las mitocondrias de ambas series presentan un área similar, si bien el eje *mayor* y el perímetro son superiores en el grupo TMZ mientras que el eje *menor* es mayor en el grupo Placebo, con diferencias estadísticamente significativas, adoptando las mitocondrias de la serie TMZ una morfología más alargada y estrecha (“*en bastoncillo*”).

	<i>Serie Placebo</i>	<i>Serie TMZ</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.14 ± 1.08	3.30 ± 1.26	0.001
<b>Eje mayor</b>	2.52 ± 0.98	2.70 ± 1.15	0.001
<b>Eje menor</b>	1.37 ± 0.52	1.30 ± 0.49	0.001
<b>Área</b>	0.69 ± 0.43	0.71 ± 0.55	ns

**Tabla R.10.-** Comparación del tamaño mitocondrial de la zona control entre la serie placebo y la serie TMZ. Valores promedio ± desviación. Unidades en micras (Perímetro y ejes) y micras<sup>2</sup> (área).



**Figura R.13.-** Microfotografías electrónicas de tejido miocárdico sometido a isquemias breves y repetidas. La Figura A representa el área control en el placebo, donde además de mitocondrias se observa un núcleo (n) de la célula cardíaca con su nucleólo (nu), poros nucleares (flecha pequeña), y numerosas masas de cromatina condensada (cc, heterocromatina). En la Figura B correspondiente al área control de los miocitos tratados con TMZ, se observa algunas mitocondrias dañadas (flecha grande), y la mayor parte de la cromatina localizada en la periferia del núcleo. Las imágenes están tomadas entre X 7000 y X 12000.

### 3.- RESULTADOS ANÁLISIS BIOQUÍMICO.-

En trabajos previos realizados en nuestro laboratorio no hemos observado, tanto en las muestras del tejido sometido a isquemias breves y repetidas como en las muestras del tejido de la zona control, necrosis celular.

Basándonos en los datos de ultraestructura y con la finalidad de confirmar estos resultados histológicos y estudiar el efecto de la TMZ en un modelo de isquemias breves y repetidas, hemos medido los niveles de troponina T en plasma, tanto en situación basal como una vez finalizado el protocolo isquémico, previo al sacrificio del animal.

En la serie Placebo se produce un discreto aumento de los valores de troponina respecto a los basales tras realizar el protocolo isquémico, sin significación estadística. Un comportamiento similar encontramos en la serie TMZ, con ligero aumento, no significativo, de los valores de troponina al final del protocolo isquémico respecto a los basales.

Como se demuestra en la tabla R.11, cuando comparamos ambas series entre sí, observamos que los niveles de troponina T son muy similares, tanto en situación basal previo a la anestesia del animal como al finalizar el protocolo isquémico, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

	PLACEBO	TRIMETAZIDINA	p
Basal	0.22 ± 0.25	0.23 ± 0.23	ns
Final del PI	0.61 ± 0.85	0.50 ± 0.66	ns

**Tabla R.11.-** Comparación de los niveles de troponina T en el plasma entre ambas series, a nivel basal y tras la realización del protocolo isquémico. Resultados expresados en ng/ml.

PI: Protocolo isquémico.

## II.-PROTOCOLO DE ISQUEMIA ÚNICA Y PROLONGADA.-

### 1.- RESULTADOS DE FUNCIÓN GLOBAL Y REGIONAL DE LAS SERIES.-

#### 1.1.- SERIE PLACEBO.-

Se han estudiado 8 perros, de los cuales 1 falleció al inicio de la reperfusión por fibrilación ventricular. La serie final está formada por 7 perros, distribuidos en 4 machos y 3 hembras, con un peso medio de  $25.07 \pm 6.85$  Kgs y un flujo coronario basal de  $24.76 \pm 14.43$  ml/min.

##### 1.1.1.- Parámetros hemodinámicos.-

Durante la realización de la obstrucción coronaria, se objetiva una ligera taquicardización en los primeros minutos, de hasta un 7%, respecto a los valores basales, y sin presentar grandes oscilaciones durante la reperfusión, manteniendo siempre sus valores por encima de los basales, que no resultan estadísticamente significativos.

Ni la  $dP/dt$  ni la PVI experimentan variaciones significativas a lo largo de la obstrucción coronaria ni durante los 60 minutos de reperfusión posteriores.

	<i>FC</i> (lpm)	<i>PVI</i> (mmHg)	<i>dP/dt</i> (mmHg/s)
<b>BASAL</b>	128.14 $\pm$ 30.04	139.29 $\pm$ 14.41	3285.71 $\pm$ 834.52
<b>5 min. Isquemia</b>	136 $\pm$ 30.99	142.14 $\pm$ 15.64	3642.86 $\pm$ 733.96
<b>10 min. Isquemia</b>	135.57 $\pm$ 26.94	143 $\pm$ 17.41	3500 $\pm$ 803.64
<b>15 min. Isquemia</b>	136 $\pm$ 35.92	141.29 $\pm$ 15.37	3714.29 $\pm$ 834.52
<b>1 min Reperfusión</b>	138.57 $\pm$ 33.63	137.86 $\pm$ 14.36	3535.71 $\pm$ 619.62
<b>15 min. Reperfusión</b>	131 $\pm$ 36.24	138.71 $\pm$ 10.16	3500 $\pm$ 924.21
<b>30 min Reperfusión</b>	135.29 $\pm$ 24.98	137.14 $\pm$ 10.06	3464.29 $\pm$ 834.52
<b>45 min. Reperfusión</b>	137.86 $\pm$ 32	142 $\pm$ 13.14	3571.43 $\pm$ 850.42
<b>60 min. Reperfusión</b>	134.29 $\pm$ 28.64	135.14 $\pm$ 16.99	3678.57 $\pm$ 702.89

**Tabla R.12.-** Parámetros hemodinámicos de la serie PLACEBO.

FC: frecuencia cardíaca; PVI: presión sistólica del ventrículo izquierdo;  $dP/dt$ : derivada de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo.

### 1.1.2.- Parámetros de función regional.-

#### A) Zona isquémica.-

Se produce un incremento significativo de los valores de la LTS durante la obstrucción, de hasta un 16% a los 15 minutos ( $p < 0.01$ ), para disminuir ligeramente durante la reperfusión, pero manteniendo siempre cifras por encima de las basales, en torno al 8-10 % ( $p < 0.05$ ).

La LTD presenta un comportamiento similar, con un aumento de sus valores de hasta un 8% durante la obstrucción ( $p < 0.05$ ), y manteniéndose durante la reperfusión en cifras ligeramente por encima de las basales. Así, a los 60 minutos de reperfusión, podemos observar que ésta se encuentra en un 3 % por encima del valor basal.

Con respecto a la FA, observamos una caída significativa durante la oclusión, alcanzando valores de acinesia/discinesia (-121 % a los 15 minutos), con una importante recuperación de sus valores basales en el primer minuto de reperfusión (74 % del valor basal, no significativo), para, posteriormente, presentar un deterioro progresivo hasta alcanzar en torno al 50 % del valor basal a los 60 minutos de reperfusión ( $p < 0.05$ ).

	<i>LTS</i> (mm)	<i>LTD</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	11.67 ± 1.56	12.58 ± 1.78	6.80 ± 2.91
<b>5 min. Isquemia</b>	13.53 ± 2.21 *	13.46 ± 2.24	-0.56 ± 1.65 ***
<b>10 min. Isquemia</b>	13.45 ± 2.05 *	13.48 ± 2 *	0.20 ± 2.41 **
<b>15 min. Isquemia</b>	13.55 ± 2.08 *	13.54 ± 2.07 *	-0.17 ± 3.09 ***
<b>1 min Reperfusión</b>	12.44 ± 2.55	13.07 ± 2.39	5.03 ± 3.32
<b>15 min. Reperfusión</b>	13 ± 2.12 *	13.47 ± 2.16 *	3.43 ± 3.43 *
<b>30 min Reperfusión</b>	12.88 ± 2.14 **	13.32 ± 2 *	3.38 ± 3.85 *
<b>45 min. Reperfusión</b>	12.8 ± 2.39 *	13.20 ± 2.31	3.07 ± 3.45 *
<b>60 min. Reperfusión</b>	12.53 ± 2.29 *	12.96 ± 2.13	3.42 ± 4.11 *

**Tabla R.13.-** Parámetros de función regional de la zona isquémica de la serie PLACEBO.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento.

Significación estadística respecto a situación basal: \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

**B) Zona control.-**

Durante la realización del experimento, la LTS presenta un ligero aumento inicial del 2 % a los 5 minutos de la obstrucción ( $p < 0.05$ ), para posteriormente no mostrar variaciones significativas, tanto en el resto de la obstrucción como en los 60 minutos posteriores de la reperfusión.

La LTD presenta un comportamiento similar: aumento ligero, alrededor del 2 %, durante la obstrucción ( $p < 0.05$ ), para recuperar los valores basales durante la reperfusión (ns).

La FA experimenta un discreto aumento durante la obstrucción, de hasta un 4 % (ns), que se incrementa hasta el 31 % en el primer minuto de la reperfusión ( $p < 0.01$ ), para mantenerse luego en valores ligeramente por encima de los valores basales, pero sin diferencias estadísticamente significativas.

	<i>LTS</i> (mm)	<i>LTD</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	9.71 ± 2.54	10.35 ± 2.99	5.71 ± 2.94
<b>5 min. Isquemia</b>	9.92 ± 2.64 *	10.57 ± 3.16 *	5.50 ± 3.19
<b>10 min. Isquemia</b>	9.90 ± 2.77	10.57 ± 3.23	5.90 ± 2.59
<b>15 min. Isquemia</b>	9.91 ± 2.71	10.55 ± 3.16 *	5.63 ± 2.47
<b>1 min Reperfusión</b>	9.65 ± 2.67	10.48 ± 3.14	7.49 ± 3.52 **
<b>5 min. Reperfusión</b>	9.85 ± 2.67	10.55 ± 3.07 **	6.26 ± 3.01
<b>30 min Reperfusión</b>	9.75 ± 2.56	10.52 ± 3.03	6.90 ± 2.86
<b>45 min. Reperfusión</b>	9.80 ± 2.75	10.58 ± 3.23	6.98 ± 2.65
<b>60 min. Reperfusión</b>	9.68 ± 2.58	10.41 ± 3.01	6.58 ± 3.15

**Tabla R.14-** Parámetros de función regional de la zona control de la serie PLACEBO.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento.

Significación estadística respecto a situación basal: \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$

### **1.1.3.- Comparación zona isquémica vs zona control.-**

La LTS experimenta un incremento significativo de sus valores en la zona isquémica en relación con la zona control, tanto durante la obstrucción ( $p < 0.001$ ) como durante la reperfusión ( $p < 0.05$ ).

La LTD muestra un incremento ligeramente superior en la zona isquémica en relación a la zona control durante la obstrucción ( $p < 0.05$ ), para igualarse en los primeros minutos de reperfusión e incrementarse posteriormente, manteniendo valores ligeramente por encima de los de la zona control.

Con respecto a la FA, existen diferencias claramente significativas entre ambas zonas. En la zona isquémica se produce un descenso de la FA durante la isquemia prolongada, alcanzando valores de acinesia/discinesia, mientras que la zona control experimenta un ligero incremento respecto a los basales ( $p < 0.001$ ). Durante los primeros minutos de reperfusión vemos que la zona isquémica tiende a recuperar los valores basales (aproximadamente el 80%), sin mostrar diferencias significativas respecto a la zona control, para posteriormente ir de nuevo empeorando y situarse en valores muy inferiores a los de la zona control ( $p < 0.05$ ), la cual presenta cifras ligeramente por encima de los valores basales (figura R.14).

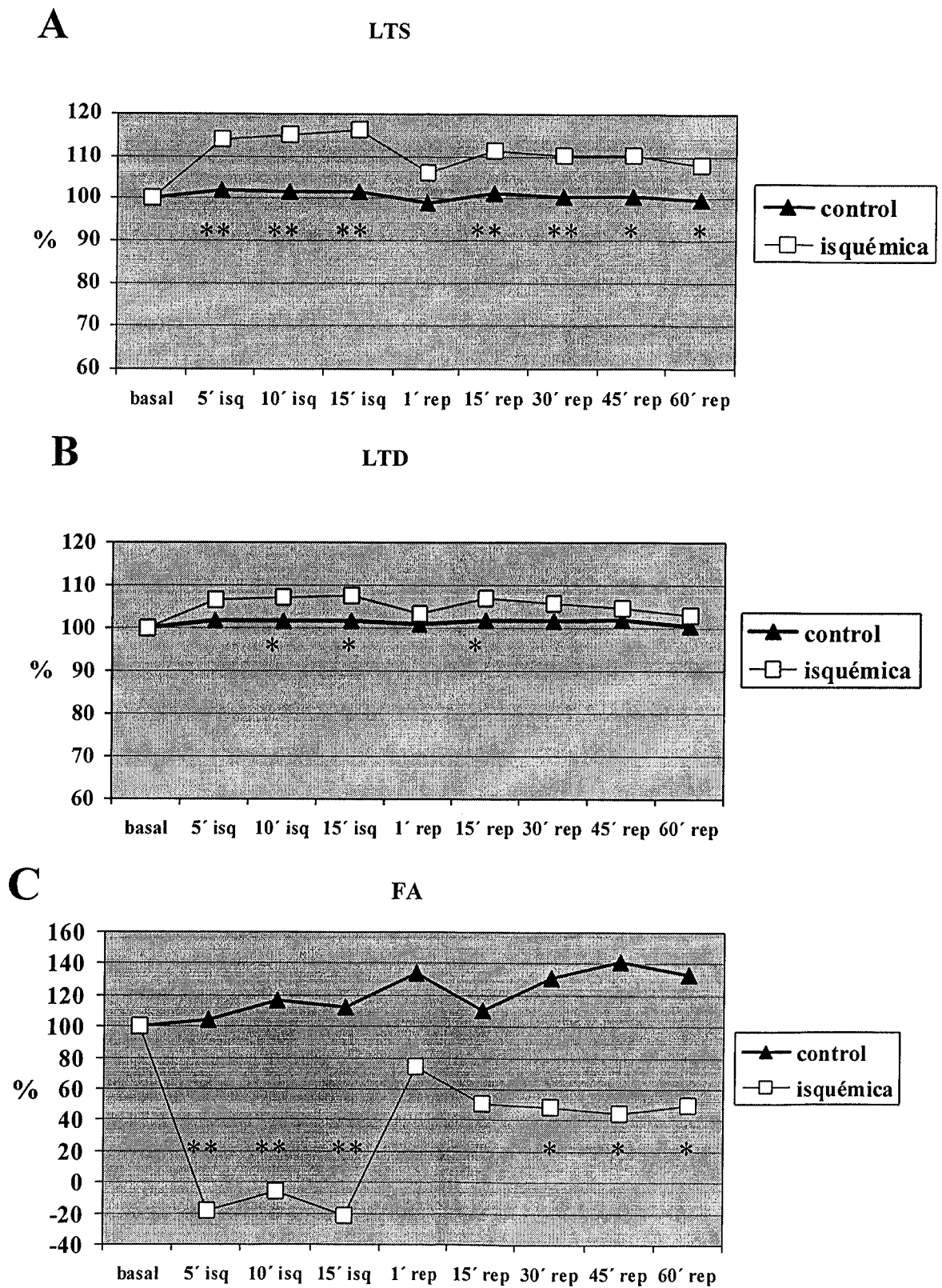


Figura R.14 (A, B y C).- Comparación de la evolución de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento (FA) de las zonas control e isquémica de la serie Placebo. Isq: isquemia; Rep: reperusión. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.001$ .



## 1.2.- SERIE TRIMETAZIDINA.-

Se han analizado un total de 7 perros mestizos, de los cuales se desestimó un perro en el cual no se objetivó caída de la fracción de acortamiento de la zona isquémica durante la obstrucción coronaria. La serie final está formada por 6 perros, distribuidos en 4 machos y 2 hembras, con un peso medio de  $24.00 \pm 6.22$  Kgs y un flujo coronario basal de  $33.33 \pm 11.51$  ml/min.

### 1.2.1. Parámetros hemodinámicos.-

Al analizar la FC, no se registraron cambios significativos respecto a los valores basales durante la realización del protocolo de isquemia y reperfusión (tabla R.15).

La PVI experimenta un comportamiento distinto, con un incremento significativo en los últimos minutos de la isquemia (8 %;  $p < 0.05$ ), manteniendo ese incremento durante la reperfusión (9% a los 15 minutos,  $p < 0.05$ ).

Con respecto a la  $dP/dt$ , se produce un aumento de sus valores durante la obstrucción, alcanzando un máximo del 15 % a los 15 minutos (ns), para disminuir discretamente en los primeros momentos de la reperfusión y volverse a incrementar posteriormente, alcanzando un 23 % a los 60 minutos ( $p < 0.05$ ).

	<i>FC</i> (lpm)	<i>PVI</i> (mmHg)	<i>dP/dt</i> (mmHg/s)
<b>BASAL</b>	143.33 $\pm$ 20.41	133 $\pm$ 16.25	2875 $\pm$ 344.60
<b>5 min. Isquemia</b>	142.50 $\pm$ 20.19	131.33 $\pm$ 15.58	2833.33 $\pm$ 341.57
<b>10 min. Isquemia</b>	146.67 $\pm$ 17.22	138.50 $\pm$ 14.68	3208.33 $\pm$ 292.26
<b>15 min. Isquemia</b>	148.33 $\pm$ 18.89	142.83 $\pm$ 16.38*	3291.67 $\pm$ 458.71
<b>1 min Reperfusión</b>	139 $\pm$ 14.32	143.40 $\pm$ 17.40	3050 $\pm$ 325.96
<b>15 min. Reperfusión</b>	145.83 $\pm$ 14.63	145 $\pm$ 18.17 *	3291.67 $\pm$ 332.29
<b>30 min Reperfusión</b>	147.50 $\pm$ 22.08	144.33 $\pm$ 23.47	3375 $\pm$ 541.99
<b>45 min. Reperfusión</b>	144.17 $\pm$ 14.29	150.67 $\pm$ 29.81	3541.67 $\pm$ 485.20 *
<b>60 min. Reperfusión</b>	151.67 $\pm$ 21.60	146.50 $\pm$ 23.10	3500 $\pm$ 524.40 *

**Tabla R.15.-** Parámetros hemodinámicos de la serie TRIMETAZIDINA.

FC: frecuencia cardíaca; PVI: presión sistólica del ventrículo izquierdo;  $dP/dt$ : derivada de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo; significación estadística respecto a situación basal = \*  $p < 0.05$ .

## 1.2.2.- Parámetros de función regional.-

### A) Zona isquémica.-

Se produce un incremento significativo y progresivo de la LTS a lo largo del procedimiento isquémico, de hasta un 24 % a los 15 minutos ( $p < 0.05$ ), con una recuperación parcial de sus valores durante las últimas fases de la reperfusión, pero manteniendo valores discretamente por encima de los basales en los primeros 30 minutos ( $p < 0.05$ ) (tabla R.16).

La LTD experimenta un comportamiento muy similar, con aumento progresivo de sus valores durante al isquemia, con un máximo del 9 % a los 15 minutos ( $p < 0.05$ ), para normalizarse durante la reperfusión, pero situándose en cifras discretamente superiores a las iniciales, aunque no significativas.

Con respecto a la FA, se produce una importante caída de sus valores durante la obstrucción, alcanzando cifras de discinesia ( $p < 0.05$ ), con una importante recuperación inicial en los primeros minutos del 67% respecto del valor basal, para, posteriormente, ir empeorando progresivamente y alcanzar en torno al 41% del valor basal a los 60 minutos de reperfusión ( $p = 0.07$ ).

	<i>LTS</i> (mm)	<i>LTD</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	10.70 ± 0.99	11.86 ± 1.47	9.55 ± 4.45
<b>5 min. Isquemia</b>	12.68 ± 2.10 *	12.51 ± 2.22	-1.47 ± 3.47 *
<b>10 min. Isquemia</b>	12.86 ± 2.01 *	12.63 ± 2.15	-1.92 ± 3.80 *
<b>15 min. Isquemia</b>	13.30 ± 1.94 *	13.06 ± 2.22 *	-2.11 ± 2.65 *
<b>1 min Reperfusión</b>	11.75 ± 1.79	12.77 ± 2.24 *	7.55 ± 8.20
<b>15 min. Reperfusión</b>	12.02 ± 2.01 *	12.56 ± 2.02	4.32 ± 5.26
<b>30 min Reperfusión</b>	12.00 ± 2.05 *	12.56 ± 2.18	4.33 ± 6.11
<b>45 min. Reperfusión</b>	11.98 ± 2.24	12.54 ± 2.39	4.36 ± 5.45
<b>60 min. Reperfusión</b>	11.84 ± 1.94	12.34 ± 2.02	3.95 ± 5.89

**Tabla R.16.-** Parámetros de función regional de la zona isquémica de la serie TRIMETAZIDINA.

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento. Significación estadística respecto a situación basal: \*  $p < 0.05$ .

## B) Zona control.-

Al analizar la LTS y la LTD, observamos que no experimentan variaciones significativas de sus valores a lo largo de la realización del protocolo de isquemia/reperfusión, manteniéndose en cifras cercanas a las basales en todo momento.

Con respecto a la FA, ésta experimenta un aumento de sus valores, de hasta el 24% durante la obstrucción, no significativa, manteniéndose a lo largo de la reperfusión en valores por encima de los basales ( 21% a los 15 minutos y 12% a los 60 minutos), sin diferencias significativas (tabla R.17).

	<i>LTS</i> (mm)	<i>LTD</i> (mm)	<i>FA</i> (%)
<b>BASAL</b>	10.53 ± 1.69	11.20 ± 1.73	5.94 ± 3.02
<b>5 min. Isquemia</b>	10.55 ± 1.62	11.30 ± 1.75	6.58 ± 2.50
<b>10 min. Isquemia</b>	10.70 ± 1.51	11.50 ± 1.59	7.03 ± 3.48
<b>15 min. Isquemia</b>	10.68 ± 1.44	11.45 ± 1.60	6.59 ± 2.96
<b>1 min Reperfusión</b>	10.30 ± 1.69	11.08 ± 1.72	7.10 ± 1.39
<b>15 min. Reperfusión</b>	10.60 ± 1.49	11.40 ± 1.62	6.94 ± 2.97
<b>30 min Reperfusión</b>	10.66 ± 1.46	11.33 ± 1.60	5.81 ± 2.16
<b>45 min. Reperfusión</b>	10.63 ± 1.48	11.31 ± 1.63	5.96 ± 2.32
<b>60 min. Reperfusión</b>	10.55 ± 1.45	11.25 ± 1.60	6.12 ± 2.45

**Tabla R.17.-** Parámetros de función regional de la zona control de la serie TRIMETAZIDINA.

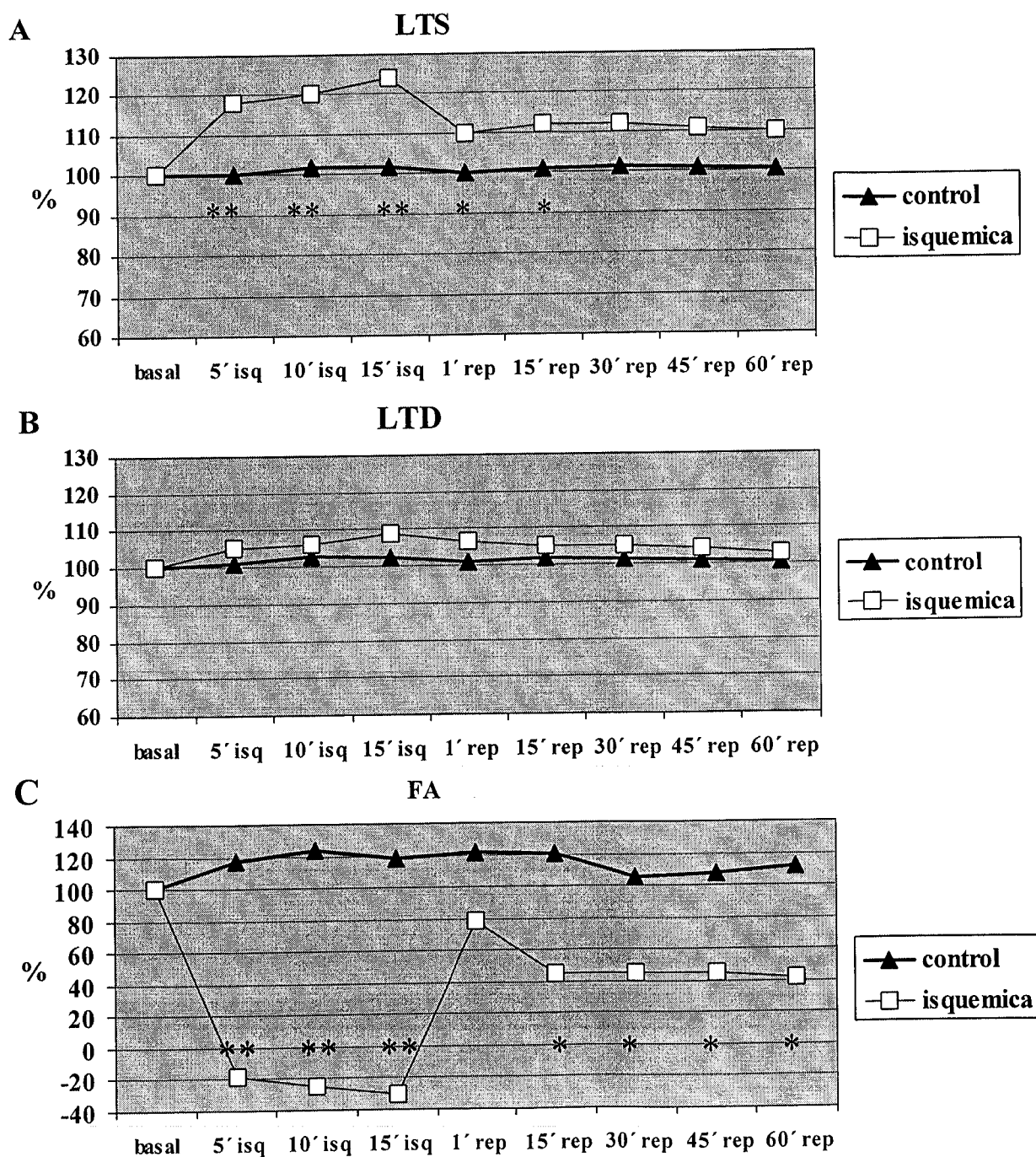
LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FA: fracción de acortamiento.

### 1.2.3.- Comparación zona isquémica vs zona control.-

Mientras que la LTS no experimenta variaciones en la zona control durante la realización de la obstrucción, en la zona isquémica se observa un incremento llamativo, que resulta estadísticamente significativo al comparar ambas zonas ( $p < 0.005$ ). Durante la reperfusión, ambos valores tienden a igualarse, pero manteniendo la zona isquémica unas cifras ligeramente superiores, estadísticamente significativas en los primeros 15 minutos de reperfusión.

La LTD presenta un comportamiento similar en ambas zonas, sin diferencias significativas.

Con respecto a la FA, encontramos importantes diferencias, dado que la zona isquémica experimenta una caída a valores de acinesia/discinesia durante la isquemia, mientras que la zona control presenta un aumento de sus valores por encima de los basales ( $p < 0.001$ ). En el primer minuto de reperfusión hay una mejoría de la FA en la zona isquémica, que alcanza valores próximos a los de la zona control (ns), para posteriormente ir empeorando de forma progresiva y alcanzar diferencias significativas respecto a la zona control en las últimas fases de la reperfusión ( $p < 0.05$ ).



**Figura R.15.-** Comparación de la evolución de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento (FA) de las zonas control e isquémica de la serie TMZ. Isq: isquemia; Rep: reperfusión. \*  $p < 0.05$  \*\*  $p < 0.001$ .

### **1.3.- COMPARACIÓN SERIE PLACEBO vs TRIMETAZIDINA.-**

En ambas series se presentan características similares en cuanto al peso de los animales, la distribución por sexos y el flujo coronario basal, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

#### **1.3.1.-Parámetros hemodinámicos.-**

Debemos de señalar que, si bien los animales de ambos grupos no parten, en situación basal, en las mismas condiciones en cuanto a los parámetros hemodinámicos, no se objetivan diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Así, el grupo tratado con TMZ presenta unos valores de FC ligeramente superiores en un 11% (ns), mientras que el grupo Placebo parte de unos valores de dP/dt y PVI ligeramente superiores a la serie TMZ en un 16% y un 4% respectivamente (ns).

Cuando analizamos la evolución de la FC, observamos que, si bien ésta presenta unas variaciones similares en ambas series a lo largo de toda la experimentación, sin diferencias significativas en ambos grupos, los valores tienden a ser discretamente superiores en la serie Placebo, siendo significativo únicamente a los 5 minutos de iniciada la obstrucción coronaria (figura R.16A).

En cuanto a la dP/dt, la evolución es muy similar en ambas series, sin diferencias significativas, con un aumento de sus valores durante la obstrucción y la reperfusión, pero sin encontrar diferencias entre ambos grupos.

Y lo mismo observamos con la evolución de la PVI a lo largo de la experimentación, la cual presenta un comportamiento similar en ambas series, pero con valores ligeramente superiores en el grupo TMZ, en especial durante la reperfusión, con diferencias que resultan estadísticamente significativas únicamente a los 60 minutos de reperfusión ( $p < 0.05$ ).

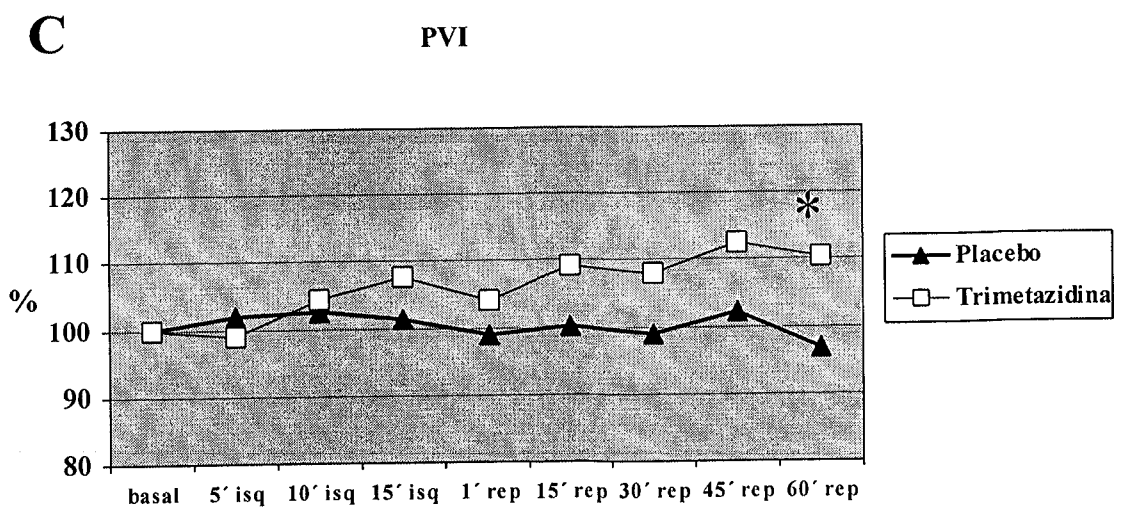
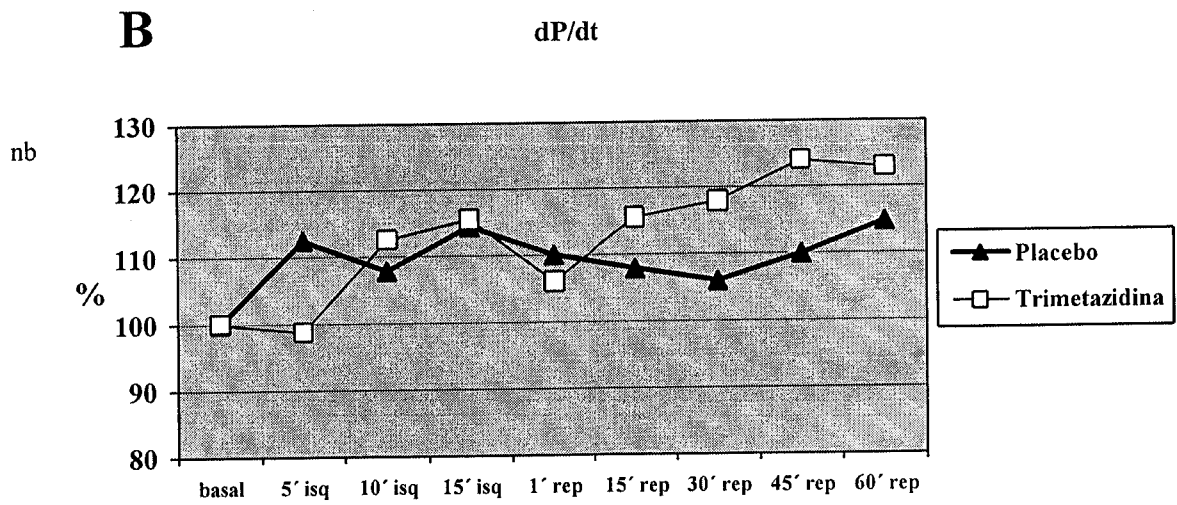
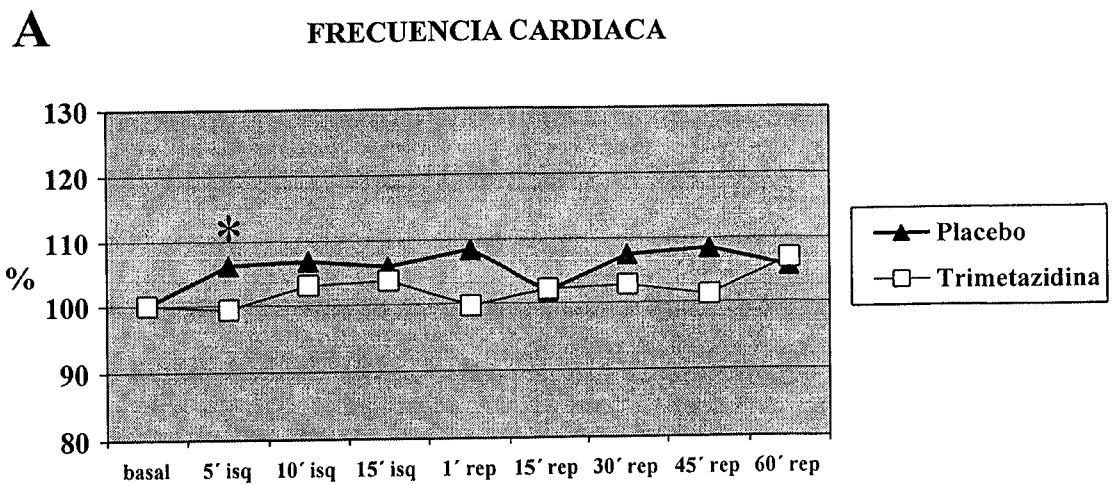


Figura R.16 (A, B y C). Comparación de los parámetros hemodinámicos entre ambas series (Placebo y TMZ). \*  $p < 0.05$ .

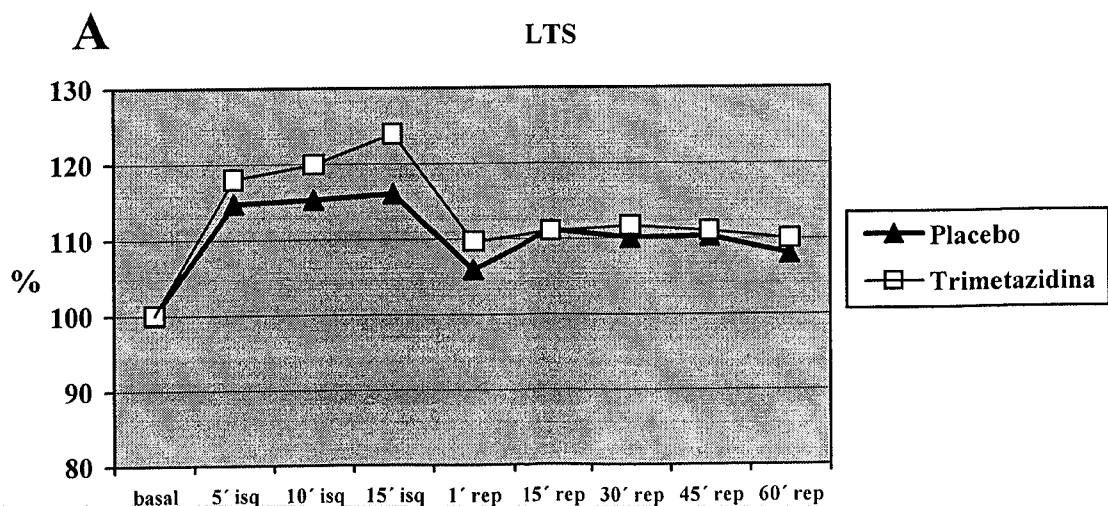
### 1.3.2.- Parámetros de función regional.-

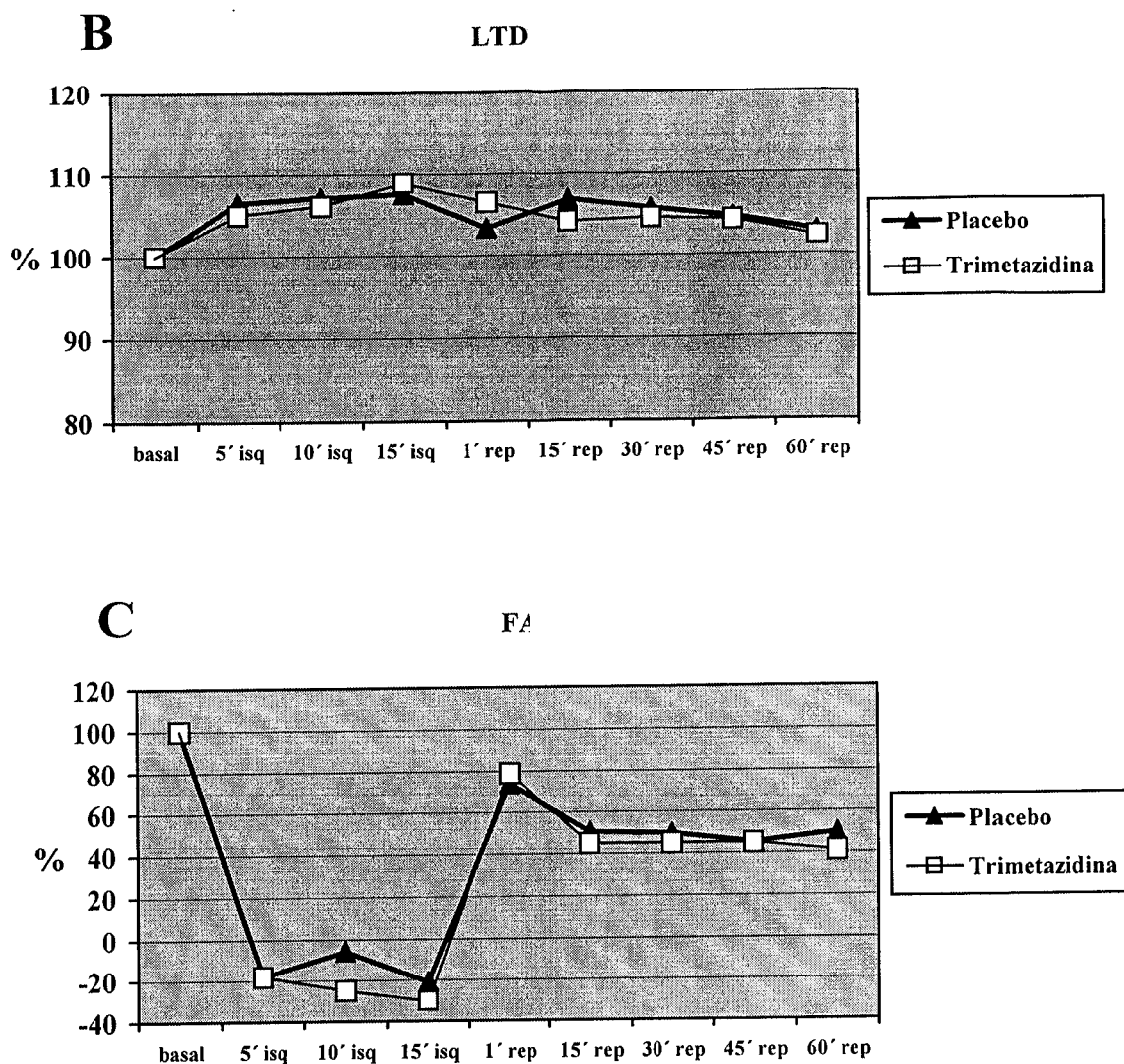
#### A) Zona isquémica.-

Cuando analizamos las curvas evolutivas de las longitudes telesistólicas segmentarias de la zona isquémica, ambas series presentan un patrón muy similar, con curvas prácticamente superponibles, sin diferencias significativas entre sus valores.

Con respecto a la LTD nos encontramos con una situación parecida, en la que ambas curvas evolutivas son superponibles en ambas series durante todo el protocolo isquémico y sin diferencias significativas entre ellas.

Cuando analizamos la FA podemos observar una evolución muy similar en ambas series, tanto a lo largo de la isquemia como durante la reperfusión, sin encontrar diferencias estadísticamente significativas. Así, durante la obstrucción, se produce en ambos grupos una caída importante de sus valores hasta valores discinéticos, algo más acusada en el grupo TMZ, sin llegar a ser significativo respecto a la serie Placebo. Durante la reperfusión se produce, en ambas series, una importante recuperación de la FA, que es más acusada en los primeros momentos, para luego ir disminuyendo esta mejoría inicial y alcanzar valores cercanos al 40% a los 60 minutos de reperfusión en ambas series (aturdimiento), sin diferencias entre ellas (figura R.17C).





**Figura R.17 (A, B y C).** Comparación entre las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento (FA) de la zona isquémica de las series Placebo y TMZ.

**B) Zona control.-**

Cuando analizamos la LTS de la zona control en ambas series, observamos que ésta no sufre variaciones significativas a lo largo del protocolo isquémico, manteniendo valores muy similares a los basales en ambos grupos (figura R.18).

Ese mismo comportamiento lo encontramos al comparar la LTD de ambas series, con unas curvas evolutivas prácticamente superponibles y sin diferencias significativas.



La FA sufre un incremento de sus valores durante la realización de la obstrucción, más acusado en la serie TMZ, pero sin diferencias significativas. Durante la reperusión, la FA sigue aumentando en el grupo Placebo hasta valores del 40%, mientras que en la serie TMZ tiende a normalizarse, situándose en valores ligeramente por encima de los basales, sin encontrar diferencias significativas entre ambos grupos.

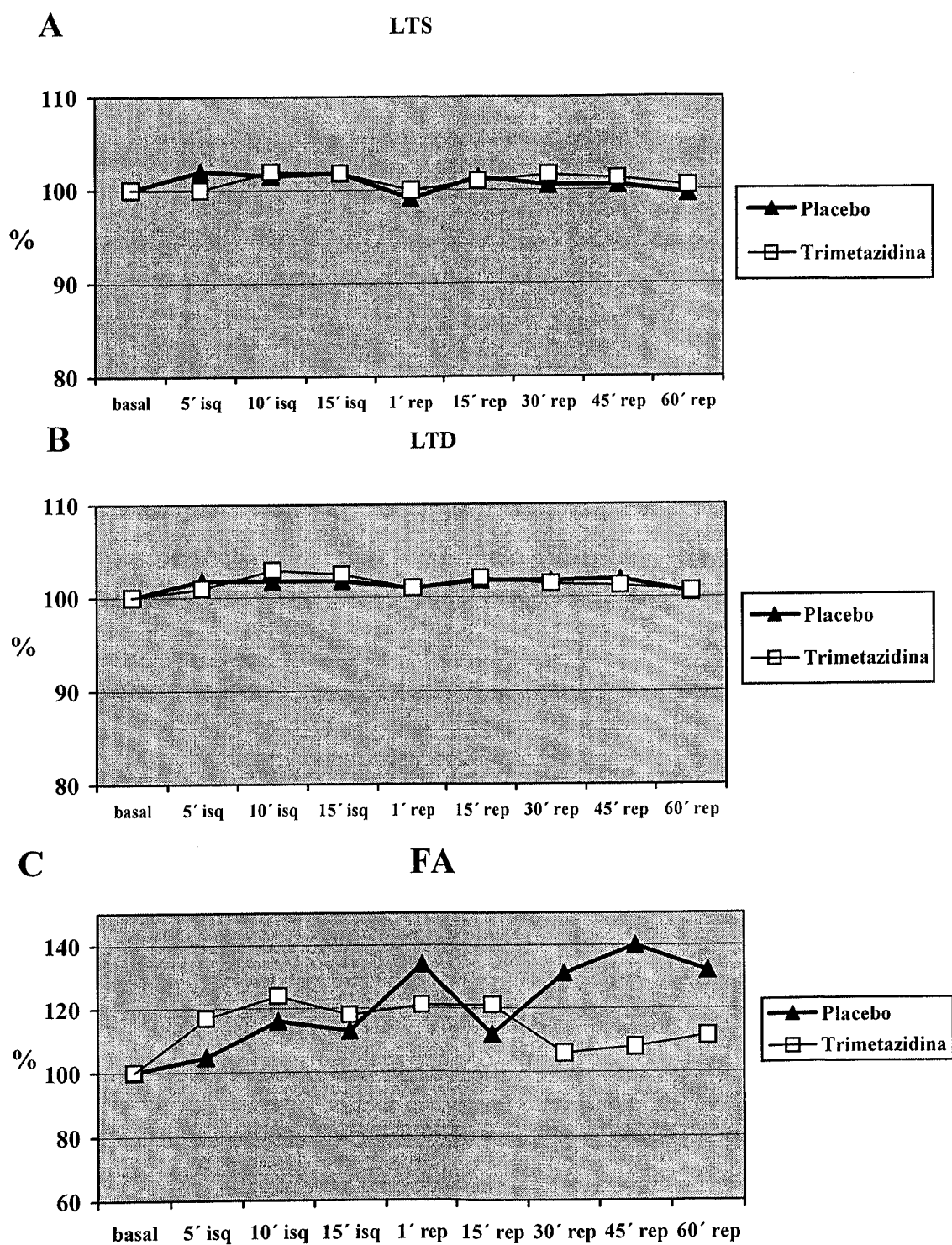


Figura R.18 (A, B y C). Comparación de las longitudes telesistólicas (LTS), telediastólicas (LTD) y fracción de acortamiento (FA) de la zona control de las series Placebo y TMZ.

## **2.- RESULTADOS DEL ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.-**

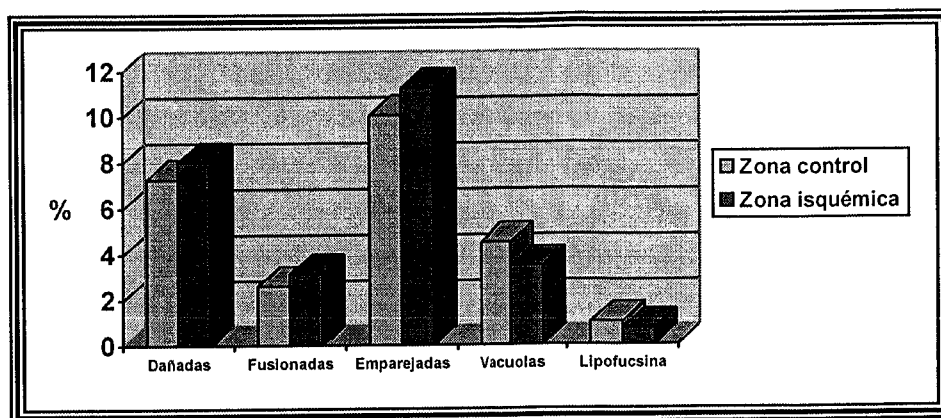
Al igual que ocurría en el protocolo de isquemias breves y repetidas, el estudio realizado mediante microscopía óptica no mostró alteraciones morfológicas ni diferencia alguna entre las diferentes muestras de tejido analizado, tanto en las zonas controles como en las zonas sometidas a isquemia única y prolongada, en ninguna de las 2 series (Placebo y TMZ).

Como hemos dicho previamente, nos vamos a centrar en el análisis de las mitocondrias interfibrilares, donde cuantificaremos el porcentaje de mitocondrias dañadas, fusionadas, con vacuolas y los gránulos de lipofucsina, así como los datos cuantitativos referentes al tamaño mitocondrial.

### **2.1.- Serie Placebo.-**

Cuando analizamos el tejido miocárdico de la zona control, no sometido a isquemia coronaria, observamos que siempre existe un pequeño porcentaje de daño mitocondrial que oscila alrededor del 7% y que corresponde al recambio metabólico normal existente en el tejido. Un 3% aproximadamente corresponde a mitocondrias que se han fusionado y un 10% de mitocondrias emparejadas (2 o más por sarcómero). Casi un 5% de las mitocondrias presentan vacuolas en su interior y un pequeño porcentaje, en torno al 1%, se corresponden con gránulos de lipofucsina (restos de lípidos y membranas mitocondriales).

Cuando analizamos el tejido sometido a isquemia única y prolongada, tras 1 hora de reperfusión, se observan ligeras diferencias con respecto al área control, si bien no resultan estadísticamente significativas. Así, existe un discreto aumento en el porcentaje de mitocondrias dañadas, que alcanza el 8%, en las mitocondrias fusionadas (3,15%) y en el número de mitocondrias emparejadas (11,24%). Llama la atención la discreta disminución en el tejido isquémico en los gránulos de lipofucsina (0,73% vs 1,02%) y en las vacuolas (3,46% vs 4,82%) con respecto a la zona control, pero sin alcanzar la significación estadística.



**Figura R.19.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales entre las zonas control e isquémica de la serie Placebo.-

En el análisis cuantitativo del tamaño mitocondrial, no se objetivan diferencias significativas, con una morfología y un tamaño muy similar entre ambas zonas (tabla R.18).

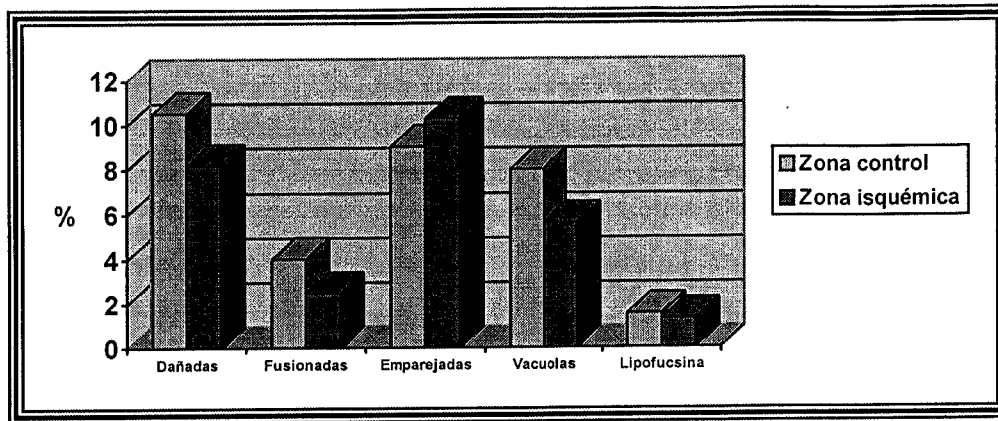
	<i>Zona Control</i>	<i>Zona isquémica</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.23 ± 1.24	3.16 ± 1.33	ns
<b>Eje mayor</b>	2.59 ± 1.12	2.52 ± 1.16	ns
<b>Eje menor</b>	1.27 ± 0.45	1.25 ± 0.46	ns
<b>Área</b>	0.67 ± 0.42	0.66 ± 0.50	ns

**Tabla R.18.-** Datos cuantitativos del tamaño de las mitocondrias de ambas zonas. Unidades en micras (perímetro y ejes) micras<sup>2</sup> (área).

## 2.2. Serie Trimetazidina.-

Cuando analizamos la zona control (no sometida a isquemia) del grupo tratado con trimetazidina, observamos un 10% de mitocondrias dañadas, un 4% de mitocondrias fusionadas, un 8% de mitocondrias con vacuolas y 1,5 % de gránulos de lipofucsina. El número de mitocondrias emparejadas es del 9%.

Cuando analizamos la zona sometida a isquemia, no se observan diferencias estadísticamente significativas respecto a la zona control, aunque existe una ligera disminución en el área isquémica del daño mitocondrial (8.18% vs 10.5%), de las mitocondrias fusionadas (2,48% vs 4,03%) y de vacuolas (5,6% vs 8%). El resto de parámetros analizados no mostró cambios (figura R.20).

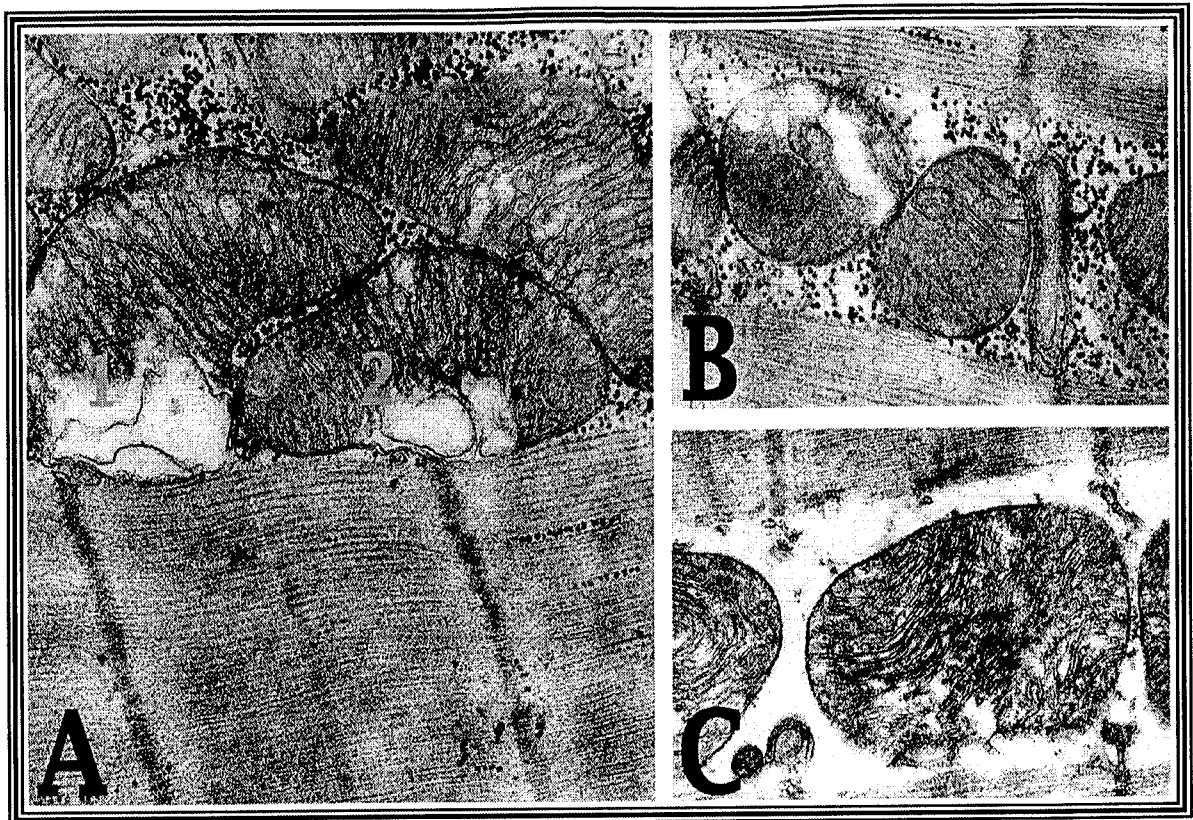


**Figura R.20.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales entre la zona control y la zona isquémica de la serie TMZ.

En el estudio comparativo del tamaño mitocondrial entre ambas zonas, las mitocondrias de la zona isquémica presentan diferencias estadísticamente significativas respecto a la zona control, con unos valores más pequeños en cuanto al perímetro y al eje *mayor*, mientras que el *eje menor* es superior ( $p < 0.001$ ); estamos pues ante mitocondrias más anchas (hinchadas), sin cambios en su área total (tabla R.19).

	<i>Zona Control</i>	<i>Zona isquémica</i>	<i>p</i>
<b>Perímetro</b>	3.22 ± 1.34	3.08 ± 1.31	0.01
<b>Eje mayor</b>	2.67 ± 1.22	2.42 ± 1.12	0.001
<b>Eje menor</b>	1.17 ± 0.48	1.24 ± 0.48	0,001
<b>Área</b>	0.63 ± 0.47	0.64 ± 0.55	ns

**Tabla R.19.-** Comparación del tamaño entre las mitocondrias de la zona control y la zona isquémica de la serie TMZ. Unidades en micras (perímetro y ejes) micras<sup>2</sup> (área).

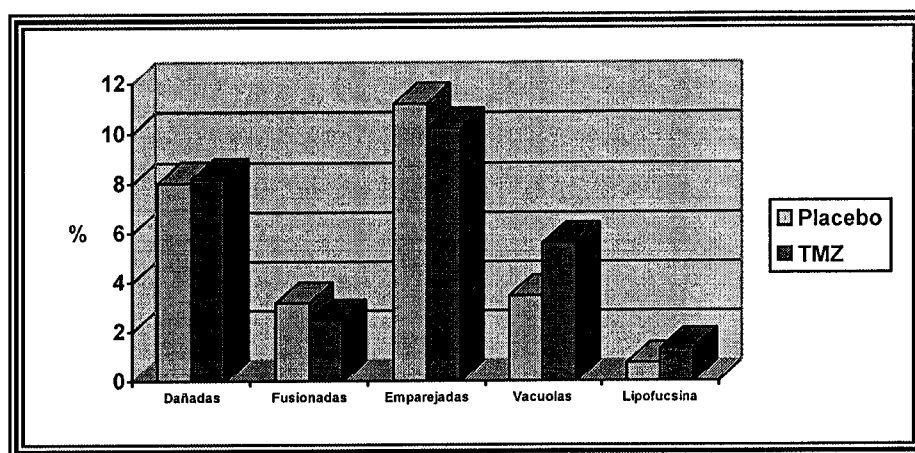


**Figura R.21.-** Imágenes de miocitos tras isquemia única y prolongada (zona isquémica, tratamiento con TMZ), obtenidas por microscopía electrónica de transmisión. En la Figura A se muestran diferentes fases del proceso de fusión mitocondrial (1, vacuola intramitocondrial dirigida hacia el sarcómero vecino; y 2, consolidación de la fusión, donde se observa la persistencia de una vacuola sobre la banda Z). En la imagen B se observan dos mitocondrias que comparten el mismo sarcómero (mitocondrias “emparejadas”). Y en la Figura C se puede ver una banda Z totalmente destruida. Las microfotografías se obtuvieron entre 7000 y 15000 X.

## 2.3.- Comparación serie Placebo vs serie Trimetazidina.-

### A) Zona isquémica.-

Cuando comparamos la zona isquémica de ambas series, no encontramos grandes variaciones en el análisis ultraestructural (figura R.22) Así, vemos que el porcentaje de mitocondrias dañadas es similar en ambas series (8,18% vs 8,03%), mientras que las fusiones mitocondriales son discretamente inferiores en la serie TMZ (2,48% vs 3,16%), al igual que el porcentaje de mitocondrias emparejadas (10,28% vs 11,24%), pero sin resultar estadísticamente significativo. Con respecto a la presencia de vacuolas, ésta es discretamente superior en el grupo tratado con TMZ (5,6% vs 3,4%), sin diferencias significativas, al igual que los gránulos de lipofucsina (1,3% vs 0,7%).



**Figura R.22.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales de la zona isquémica entre la serie Placebo y la serie TMZ.

Cuando comparamos los datos referentes al área de las mitocondrias de la zona isquémica entre ambas series, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, las mitocondrias del grupo tratado con TMZ presentan un *eje mayor* más pequeño que sus homólogos del grupo Placebo (tabla R.20).

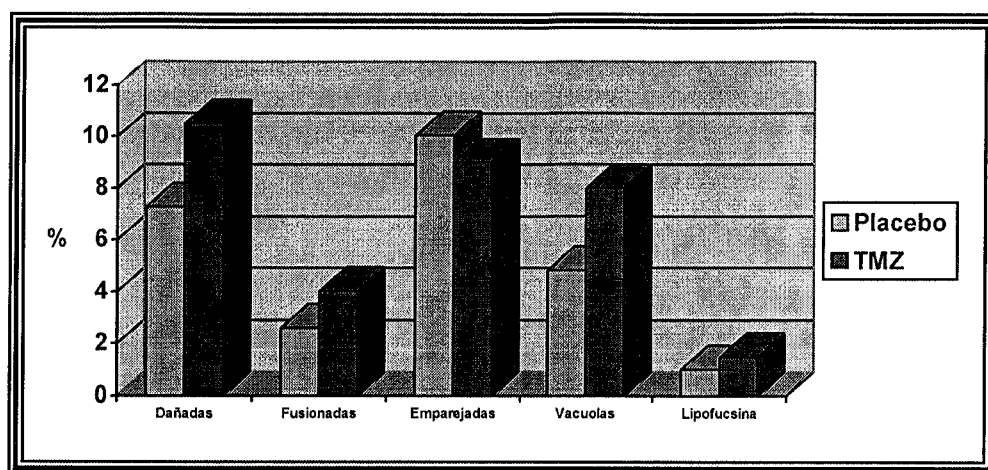
	<i>Serie Placebo</i>	<i>Serie TMZ</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.16 ± 1.33	3.08 ± 1.31	ns
<b>Eje mayor</b>	2.52 ± 1.16	2.42 ± 1.11	0.01
<b>Eje menor</b>	1.25 ± 0.46	1.24 ± 0.48	ns
<b>Área</b>	0.66 ± 0.50	0.64 ± 0.55	ns

**Tabla R.20.-** Comparación del tamaño mitocondrial de la zona isquémica entre ambas series.

Unidades en micras (perímetro y ejes) micras<sup>2</sup> (área).

**B) Zona Control.-**

Al comparar la zona control de ambas series, no hemos encontrado diferencias significativas. Así vemos que en el grupo tratado con TMZ existe un mayor porcentaje de mitocondrias dañadas (10,5% vs 7,3%) y fusionadas (4,03% vs 2,62), con respecto al grupo control. El resto de parámetros tampoco muestran diferencias significativas, si bien el porcentaje de gránulos de lipofuscina y vacuolas es discretamente superior en el grupo TMZ.

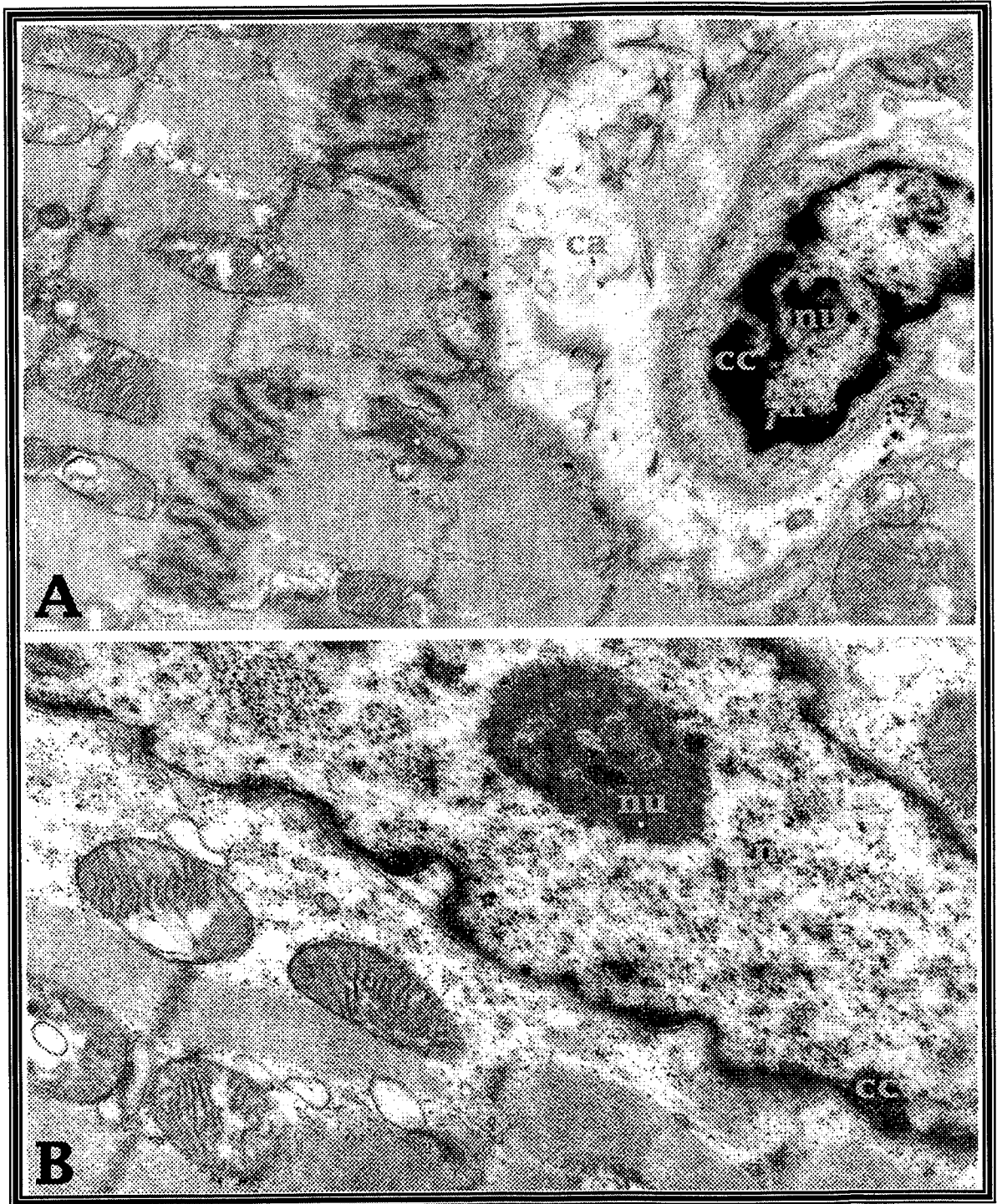


**Figura R.23.-** Comparación de las alteraciones mitocondriales de la zona control entre la serie Placebo y la serie TMZ.

En el análisis del tamaño mitocondrial, vemos que las mitocondrias del grupo TMZ presentan un *eje menor* más pequeño que las de la serie Placebo, estadísticamente significativo, así como una tendencia a un *eje mayor* superior y un área menor, mientras que el perímetro no muestra diferencias entre ambas series (tabla R.21).

	<i>Serie Placebo</i>	<i>Serie TMZ</i>	<i>P</i>
<b>Perímetro</b>	3.23 ± 1.24	3.22 ± 1.34	ns
<b>Eje mayor</b>	2.59 ± 1.12	2.67 ± 1.22	0.08
<b>Eje menor</b>	1.27 ± 0.45	1.17 ± 0.48	0.001
<b>Área</b>	0.67 ± 0.42	0.63 ± 0.47	0,07

**Tabla R.21.-** Comparación del tamaño mitocondrial de la zona control entre ambas series. Unidades en micras (perímetro y ejes) micras<sup>2</sup> (área).



**Figura R.24.-** Microfotografía electrónica de una sección de tejido miocárdico de perro sometido a isquemia única (zona isquémica; A, placebo; B, TMZ). El daño de la oclusión coronaria sobre las mitocondrias es similar en ambas imágenes. En la Figura A (7000 X) se observa además de discos intercalares (di), una sección de un capilar (ca) y el núcleo (n) y nucleólo (nu) de una célula endotelial (ce), mientras que en la Figura B (9800 X), el núcleo (n) que se observa es del miocito. Nótese el predominio de la concentración de cromatina condensada (cc, heterocromatina) con respecto a la eucromatina, en el núcleo de la célula endotelial, mientras que en el miocito está disposición perinuclear es menor; se puede interpretar este resultado como una mayor actividad nuclear en el miocito, tras la isquemia, al tener que descondensar la cromatina para la transcripción de genes en respuesta al daño isquémico.



# ***DISCUSIÓN***

## 1.- CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS. VALIDACIÓN DE LA TÉCNICA.-

### 1.1.-El modelo experimental.-

El perro es el animal más utilizado en cardiología experimental dado que su anatomía cardíaca, tanto a nivel macroscópico como microscópico, es similar a la del hombre. El desarrollo de su árbol coronario, aunque con circulación coronaria de predominio siempre izquierdo por existencia de una arteria coronaria derecha hipodesarrollada, es semejante al humano. A nivel celular, el análisis ultraestructural también es comparable al miocardio humano con una proporción de mitocondrias, miofibrillas y citoplasma similares; incluso la relación entre el consumo de oxígeno y volumen mitocondrial está más próxima a los valores teóricos para el hombre que la mayoría del resto de animales utilizados habitualmente en experimentación (Schaper *et al.*, 1985).

La presencia en el corazón del perro de una circulación coronaria de predominio izquierdo con arteria coronaria circunfleja en general muy desarrollada, de la que depende la perfusión de un amplio territorio miocárdico, permite que, en aquellos protocolos experimentales en los que interese producir isquemia de un área extensa, sea éste el vaso utilizado (Théroux *et al.*, 1977; Buda *et al.*, 1990). Sin embargo, cuanto mayor es el área sometida a isquemia, más frecuentemente surgen complicaciones durante el desarrollo de los experimentos. Así, en series experimentales previas realizadas en nuestro laboratorio con oclusiones sobre arteria coronaria circunfleja se comprobó que la incidencia de arritmias malignas, generalmente durante los períodos de reperfusión, era muy alta (75% de los casos), lo que obligó a cambiar el modelo y actuar sobre la arteria coronaria interventricular anterior (Pomar, 1992). Por otro lado, en un estudio comparativo realizado por Farber y cols. (1987) respecto al grado de isquemia y recuperación postisquémica sobre la arteria circunfleja y la arteria descendente anterior, no encontraron diferencias significativas en cuanto a los parámetros hemodinámicos, alteraciones metabólicas y edema del tejido; sin embargo se produjo una pérdida significativamente mayor en la función sistólica de pared cuando la arteria ocluida era la descendente anterior. Así mismo los resultados en la pérdida de función sistólica y la recuperación del acortamiento segmentario por oclusión de la arteria circunfleja eran más variables, sugiriendo que la evaluación de las intervenciones farmacológicas o quirúrgicas para mejorar la recuperación funcional postisquémica es más valorable cuando la arteria descendente anterior es la coronaria ocluida.

## **1.2. Técnica de medición. Cristales ultrasónicos-**

Desde que Tennant y Wiggers (1935), utilizando un miógrafo de cápsula óptica, describieron el abombamiento sistólico que acontecía en una zona de miocardio ventricular izquierdo tras la oclusión de una arteria coronaria, múltiples técnicas se han empleado para medir los cambios ocurridos en el ventrículo izquierdo durante la isquemia. Todas ellas, incluyendo la cinematografía de alta velocidad (Prinzmetal *et al.*, 1949), arcos medidores de tensión epicárdicos (Pashkow *et al.*, 1977), ecocardiografía con transductor fijo externo (Kerber *et al.*, 1976), medidores de longitud de mercurio (Wyat *et al.*, 1976), ecocardiografía bidimensional (Andrés, 2001) y la angiografía (Rigaud *et al.*, 1979), han demostrado su validez para el estudio de la contractilidad ventricular, tanto global como segmentaria.

No obstante, en modelos de experimentación animal, ha sido la sonomicrometría con cristales ultrasónicos - utilizada inicialmente para medida de dimensiones ventriculares por Rushmer y *cols.* (1956) y posteriormente desarrollada por Bugge-Asperheim y *cols.* (1969) y Theroux y *cols.* (1974) para medida de dimensiones a nivel regional miocárdico - la que ha permitido, de una manera mínimamente traumática para el miocardio, la valoración de alteraciones mínimas de la contractilidad segmentaria producidas por la isquemia en zonas muy localizadas.

Nosotros hemos utilizado esta técnica por ser un método ya experimentado con anterioridad en nuestro laboratorio (Rivera *et al.*, 1989a; Pallarés, 1996), que ha sido verificado por numerosos investigadores (Heyndrickx *et al.*, 1975; Ning *et al.*, 1990) y que nos permite analizar con gran especificidad el movimiento de un reducido segmento miocárdico.

Dentro de las limitaciones de este procedimiento, el daño miocárdico que ocasiona el implante de los cristales entre las fibras es el que ha generado más controversia en cuanto a su utilización. Sin embargo, por estudios histológicos realizados previamente, sabemos que el daño celular local y la hemorragia intersticial no se extiende más de 1 milímetro y no se han encontrado otros vestigios de daño entre los cristales (Théroux *et al.*, 1974).

La potencial variabilidad en la posición de los cristales a lo largo del experimento es otra de las limitaciones que podría inducir a errores en las medidas efectuadas. Sin embargo, la estabilidad de las medidas observadas en las zona control a lo largo de toda la experimentación, y la posterior comprobación visual de la posición de los cristales, tanto en la zona control como en la zona sometida a isquemia una vez finalizado el experimento,

minimiza esta posibilidad, pudiendo asegurar la estabilidad del implante, si éste se realiza correctamente (Hattori *et al.*, 1982).

Otro potencial error en el análisis de la longitud y contractilidad de un segmento miocárdico sería la influencia que las variaciones del tamaño del corazón durante el experimento pudieran tener sobre estos parámetros. Rankin y *cols.* (1976) observaron que el volumen del corazón varía dependiendo del estado fisiológico del perro. Así, en perros con tórax cerrado, la geometría observada durante la contracción isovolumétrica manifiesta un acortamiento del eje menor ventricular izquierdo y un alargamiento del eje mayor, es decir, un patrón elíptico, en relación con la observada en perros con tórax abierto, en donde un alargamiento del eje menor y un acortamiento del eje mayor dan lugar a un patrón esférico. Estos mismos autores observaron que esa tendencia al patrón esférico era debida a una disminución significativa del volumen ventricular y que el patrón puede cambiarse con incrementos del volumen mediante infusión salina. Para evitar este problema, hemos mantenido durante los experimentos una presión venosa central estable, con infusión en caso necesario de dextrano de peso molecular medio, con la finalidad de paliar en lo posible variaciones del volumen cardíaco. No obstante, en el supuesto de que se hubiesen producido pequeñas variaciones del volumen ventricular izquierdo a lo largo de la experiencia, éstas hubieran afectado por igual a la zona isquémica y a la zona control, por la que obviamente podemos desestimarlas al realizar el análisis comparativo de los resultados.

Otro punto que debemos tener en cuenta es la diferente disposición de las fibras en el corazón, según se encuentren en la capa epicárdica o endocárdica, variando además según la zona estudiada (Streeter *et al.*, 1969). Esto conduce a diferencias en la fracción de acortamiento de las fibras miocárdicas dependientes del estrato y de la zona que consideremos (Rivera *et al.*, 1989a). En general en condiciones de perfusión normal, el subendocardio muestra una mayor motilidad que los estratos subepicárdicos y la fracción de acortamiento es mayor cuando la medida se hace siguiendo el eje largo del corazón. En condiciones de isquemia transitoria, las fibras que tiene un recorrido paralelo al eje longitudinal del corazón se afectan más que las que siguen paralelas al eje circunferencial, y el estrato subendocárdico puede afectarse más que el subepicárdico (Rivera *et al.*, 1989b). Sin embargo, cuando se producen isquemias severas transmurales, las alteraciones son sincrónicas en todos los estratos. En función de ello y con la finalidad de poder valorar zonas más sensibles a la isquemia hemos estudiado capas subendocárdicas, situando los cristales ultrasónicos siguiendo el eje largo del corazón.

Así mismo, y para evitar la influencia que podría ocasionar medir una zona periisquémica o rica en circulación colateral, hemos descartado aquellos perros en los que no se objetivaba una franca caída de la FA durante la realización de la obstrucción coronaria total.

### **1.3.- Ocluser coronario.-**

En la metodología de protocolos en los que se realizan oclusiones de una arteria coronaria es preciso analizar el mecanismo con el cual se realizan las oclusiones y la seguridad de que, tanto la oclusión como sobre todo la reperfusión, se producen de acuerdo con lo proyectado.

Tanto en el caso de oclusiones parciales como totales, los mecanismos oclusores que pueden ser empleados son variados: oclusores neumáticos (Fujita *et al.*, 1988), hidráulicos (Théroux *et al.*, 1977), mecánicos de lazo (Cosín *et al.*, 1990), clamp de tornillo (Gallagher *et al.*, 1982), clamp vascular (Tennant y Wiggers, 1935), etc. Con todos ellos podemos ver con frecuencia reducciones del flujo coronario distal una vez cesada la oclusión. En trabajos realizados previamente en nuestro laboratorio, hemos observado que, utilizando oclusores de lazo, se producían espasmos arteriales frecuentes cuando la oclusión es repetida (Cabadés *et al.*, 1985). El mecanismo por el que se desencadena esa reducción de flujo es discutido. Uchida y cols. (1975) lo atribuyen a un vasoespasmio arterial en el lugar de la estenosis, sin embargo, otros autores opinan que se debe a un fenómeno de trombosis plaquetar seguido de embolización (Folts, 1991). En este trabajo hemos utilizado un clamp vascular y no hemos observado disminución del flujo distal una vez retirada la oclusión a pesar de utilizar un protocolo en el que las oclusiones son repetitivas. Posiblemente la mayor superficie de contacto sobre la pared vascular influya en ese resultado. La posibilidad de reducción del flujo coronario por espasmo durante la reperfusión ha sido descartada de modo sistemático mediante el medidor de flujo instalado distalmente al punto donde se realizaban las oclusiones.

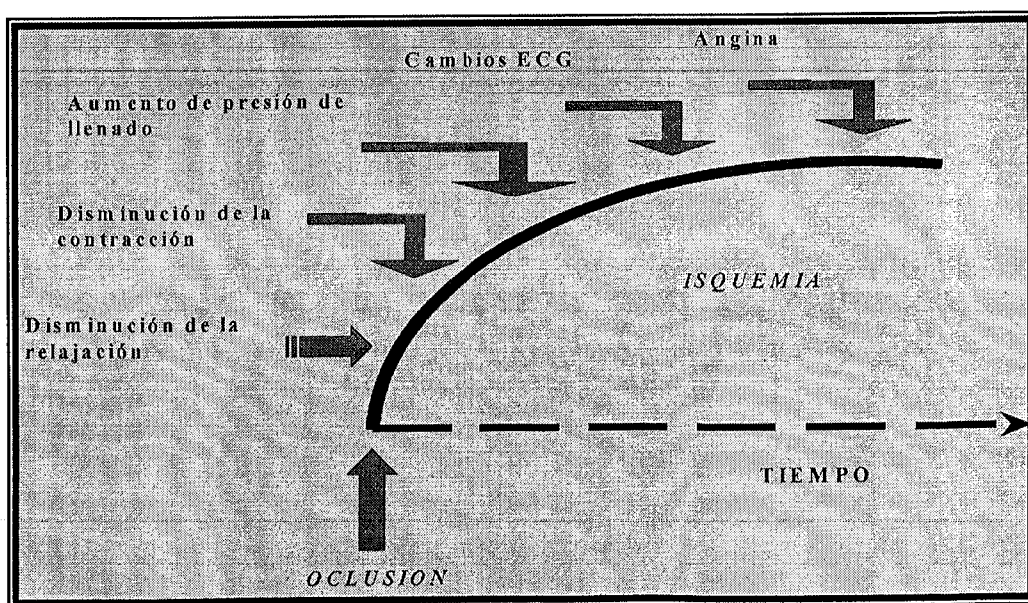
### **1.4.- Protocolo isquémico.-**

Clásicamente se ha considerado al dolor típico anginoso como la manifestación más importante de la enfermedad coronaria. Sin embargo en la actualidad nadie niega que la asociación entre isquemia miocárdica y presencia de dolor no siempre existe en la práctica clínica. Los informes de autopsias realizados por Roseman (1954) en personas aparentemente sintomáticas fueron los primeros en demostrar la presencia de lesiones coronarias avanzadas sin manifestaciones clínicas previas. Pero el interés de este fenómeno

comenzó cuando diversos investigadores observaron que pacientes con cardiopatía coronaria no presentaban dolor durante los episodios de isquemia miocárdica transitoria durante las pruebas de esfuerzo (Froelicher *et al.*, 1974) o en la monitorización continua del ECG (Stern y Tzivoni, 1974).

En los años siguientes múltiples evidencias, tanto a nivel experimental como clínico, han confirmado la existencia de este síndrome, que sabemos puede presentarse tanto en pacientes con enfermedad coronaria conocida como en pacientes asintomáticos. Cohn (1985) estima que el 20-30% de los pacientes que han sufrido un infarto de miocardio y de un 80-90% de los pacientes con angina tienen episodios de isquemia miocárdica silente.

Aunque no sabemos con exactitud cual es el mecanismo responsable para que la isquemia sea silente, sí conocemos que el dolor es la última manifestación en la cascada de eventos que siguen a la isquemia miocárdica (Sigwart *et al.*, 1984). En trabajos experimentales (Watanabe *et al.*, 1975) y en estudios realizados en humanos, bien durante la obstrucción coronaria producida por la angioplastia (Alam *et al.*, 1986), o durante episodios de isquemia espontáneos (Levy *et al.*, 1986), se ha demostrado que la producción de isquemia miocárdica desencadena una serie de eventos secuenciales (figura D.1). Así, cuando existe un desequilibrio entre la oferta y la demanda de oxígeno, se producen en primer lugar alteraciones metabólicas (ya comentadas anteriormente) y como consecuencia de ellas, alteraciones en la relajación y posteriormente en la contractilidad miocárdica. Estas alteraciones de la función ventricular originan un aumento de la presión telediastólica del ventrículo izquierdo, apareciendo más tarde las alteraciones electrocardiográficas y por último el dolor anginoso.



**Figura D.1.-** Representación gráfica de la cascada de acontecimientos que ocurren durante la oclusión coronaria.

La ausencia de dolor durante la isquemia en términos generales puede ser atribuida a: 1) fallo en el mecanismo de alarma, es decir en los receptores o transmisores del estímulo que desencadenaría el dolor (Cohn, 1985), o en una mayor liberación de modificadores del dolor como las beta-endorfinas (Sheeps *et al.*, 1995); 2) una menor cantidad de miocardio isquémico, por lo tanto habría angina cuando la isquemia afectara a mucho miocardio, y no cuando el territorio afectado fuera pequeño (Weisfeldt, 1986); 3) una corta duración de la isquemia; dado que el dolor es el último evento en la secuencia de la isquemia, es lógico pensar que aquellos episodios de isquemia que sean de poca duración sean asintomáticos (Maseri *et al.*, 1985). Chierchia y cols. (1983), estudiando pacientes ingresados por angina inestable y que estaban monitorizados, observaron que cuando los episodios de isquemia objetivados en el ECG duraban menos de 3 minutos, éstos solían ser asintomáticos.

Nosotros, basándonos en las conclusiones de los autores anteriores, pensamos que un protocolo experimental con períodos reales de isquemia de 2 minutos podrían equiparse a la isquemia silente en la clínica, sobre todo porque no producen en el ECG periférico cambios en el segmento ST.

Para establecer la duración de los períodos de reperfusión hemos tenido en cuenta estudios previos (Rivera *et al.*, 1989b) en los que observamos como, tras oclusiones aisladas de 1,5 minutos, los parámetros de contractilidad se habían normalizado después de 1 minuto de reperfusión. Otros investigadores también coinciden que, con oclusiones de 2 a 3 minutos, los valores de función regional segmentaria son aparentemente similares a los valores pre-oclusión 1 ó 2 minutos después de liberar la arteria (Théroux *et al.*, 1976).

A la hora de establecer el número de episodios de isquemia/reperfusión nos basamos en experimentos previos en los que observamos que era a partir del noveno o décimo período de isquemia cuando las alteraciones de la contractilidad persistentes durante la reperfusión podían ser significativas (Pomar *et al.*, 1995). Así podemos observar como períodos de isquemia pequeños (2 minutos) alternando con cortos intervalos de reperfusión (3 minutos) producían un deterioro progresivo de la función sistólica segmentaria en el área isquémica, que podía ser observada incluso tras varias horas de reperfusión e incluso tras 24 horas de restaurado el flujo coronario. Por otro lado el análisis estructural cualitativo y cuantitativo del miocardio mostraba un incremento en el volumen mitocondrial del tejido isquémico con importante daño en esos componentes celulares. Mediante el presente estudio intentamos analizar si la trimetazidina podía reducir la disfunción postisquémica y los cambios ultraestructurales en las células miocárdicas en un modelo de episodios breves y repetidos de isquemia/reperfusión miocárdica, equivalente a isquemia silente.

Así mismo, basándonos en estudios experimentales previos que habían puesto de manifiesto que periodos de isquemia inferiores a 20 minutos ocasionaban una depresión reversible de la función contráctil, sin evidencia de necrosis miocárdica y que persistía varias horas después de restablecido el flujo (Heyndrickx *et al.*, 1975; Hanich *et al.*, 1993), quisimos también analizar la acción del fármaco sobre un modelo de isquemia única y más prolongada en el tiempo. Para ello utilizamos un protocolo de isquemia de 15 minutos (que no provoca necrosis) seguido de 60 minutos de reperfusión, y que en experimentos previos ha provocado aturdimiento miocárdico.

### **1.5. Zonas analizadas.-**

Por último, y respecto a los datos obtenidos, podemos preguntarnos si éstos son resultados de las variables introducidas. Considerando la técnica como adecuada, pensamos que el método comparativo también lo puede ser, ya que en todos los experimentos realizados se han contrastado zonas de miocardio sometidas a isquemia con zonas del mismo miocardio libres del proceso isquémico, y que han estado bajo las mismas circunstancias durante toda la experiencia y en cada una de ellas. De esta manera cualquier variación propia de la técnica hubiera afectado por igual a ambas zonas, por lo que las diferencias que encontramos deben ser consecuencia de la variable controlada "isquemia" (ya sea breve y repetida o única y prolongada).

## **2.- ANALISIS DE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y DE FUNCIÓN VENTRICULAR.-**

### **2.1.-Efectos de un episodio de isquemia única sobre la contractilidad miocárdica.**

Ya hemos comentado en la introducción que la oclusión de una arteria coronaria va seguida de una secuencia de cambios en la contracción miocárdica. Tennant y Wiggers (1935) demostraron que, a los 60 segundos de oclusión coronaria, la zona isquémica cambia desde un estado de acortamiento sistólico activo a uno de alargamiento sistólico pasivo o expansión sistólica paradójica, debido a la incapacidad de la zona isquémica para soportar la presión intraventricular generada por el miocardio normalmente perfundido.

En el presente trabajo, así como en estudios experimentales previos realizados en nuestro laboratorio, hemos observado como tras la oclusión total de una arteria coronaria,



independientemente de que ésta fuera la arteria circunfleja o la arteria descendente anterior, las alteraciones en la contractilidad regional son evidentes a partir del cuarto ó quinto latido y han estado presentes en todos los casos, incluso con ausencia de modificaciones del segmento ST en el trazado electrocardiográfico que, de aparecer, siempre han sido más tardías (entre los 30 y 45 segundos en los casos más precoces). La aparición de expansión sistólica paradójica ("bulging") ha sido constante con cada oclusión, debido probablemente a la severidad de la isquemia pues las oclusiones han sido totales. Por el contrario, en estudios con oclusiones parciales realizados por otros autores, la aparición de expansión sistólica puede no estar presente durante la isquemia (Hess *et al.*, 1983, Martí *et al.*, 1999). Así pues, la aparición de expansión sistólica paradójica es la forma más intensa de afectación de la función miocárdica y está en dependencia con la incapacidad del miocardio isquémico para soportar la tensión intraventricular generada por el resto de miocardio no sometido a isquemia.

Cuando estudiamos las zonas de miocardio alejadas de la zona isquémica observamos que la fracción de acortamiento aumenta durante la isquemia. Así, en el presente estudio, observamos como la fracción de acortamiento de la zona control experimenta un incremento de sus valores de hasta un 16% durante la fase de obstrucción coronaria, que no resulta estadísticamente significativo, probablemente debido a que el área isquémica es poco importante (la obstrucción se produce en el tercio distal de la arteria descendente). Recientemente se ha puesto de manifiesto, en perros, que el incremento en el acortamiento del miocardio no-isquémico se produce independientemente del área isquémica. Así se objetiva un aumento del 17% en la contractilidad del miocardio de la pared posterior cuando se ocluye la arteria descendente anterior, y un incremento del 16% en la contractilidad del apex cuando la arteria ocluída es la circunfleja (Marsch *et al.*, 1999).

El mecanismo que produce esta hiperfunción de la zona no isquémica es controvertido, si bien la mayoría de investigadores lo atribuyen a un mecanismo Frank-Starling (Braasch *et al.*, 1968; Matre *et al.*, 1987): la disminución del acortamiento y la expansión sistólica de la zona isquémica reducen la postcarga de la zona no isquémica, favoreciendo el incremento del acortamiento en dichas zonas. Algunos investigadores atribuyen esta hipercinesia a una interacción mecánica entre la región isquémica y no isquémica (Goto *et al.*, 1988) y otros a la influencia de ambos mecanismos (Noma *et al.*, 1988).

La observación de estos cambios en la contractilidad durante la isquemia ha sido expuesta en numerosos trabajos, tanto a nivel experimental animal como en pacientes durante la realización de angioplastias (Akasaka *et al.*, 1986), pudiendo asegurarse que dichos cambios van a depender de la duración y severidad de la isquemia miocárdica.

La oclusión total de una arteria coronaria en el perro anestesiado cuando se prolonga más de 40-60 minutos produce severa isquemia de las células del subendocardio dando lugar a un daño irreversible con rotura de la membrana celular y evidencia de necrosis (Jennings *et al.*, 1960). Sin embargo, cuando el período de isquemia es más breve se produce depresión de la función miocárdica, pero al restaurar el flujo sanguíneo la injuria es reversible, el metabolismo y función contráctil se normalizan y no se evidencia necrosis (Théroux *et al.*, 1974).

Posteriormente se ha podido demostrar que esta última afirmación no es completamente cierta. Isquemias de duración inferior a 20 minutos generalmente no producen necrosis celular, pero la función contráctil puede permanecer deprimida durante varios días. Sabemos por estudios con oclusiones coronarias de diferente duración que el tiempo de recuperación funcional de una zona de miocardio sometida a isquemia es inversamente proporcional a la duración de la oclusión (Heyndrickx *et al.*, 1978; Bolli *et al.*, 1988).

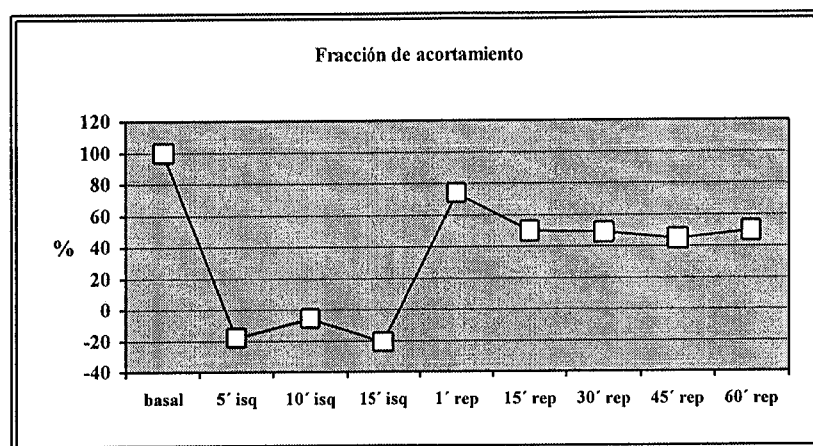
Diversos investigadores pensaron que cuando la isquemia era breve, la recuperación de la contractilidad era completa en varios minutos (Kloner *et al.*, 1983; Akasaka *et al.*, 1986). Sin embargo, Theroux y cols. (1976) ya observaron previamente que tras una oclusión total de 2 minutos de la arteria coronaria circunfleja en perros anestesiados, la función contráctil activa regresaba a valores normales a los 2 minutos de liberar la oclusión, pero ligeras anomalías de la protodiástole en la zona isquémica persistían hasta pasados 45 minutos de restablecida el flujo.

Heyndrickx y cols. (1975) describen, por primera vez en el laboratorio experimental, la persistencia de una depresión de la función contráctil después de restablecido el flujo sanguíneo tras una oclusión coronaria en el perro consciente. Observaron que al liberar la arteria después de una oclusión total de la arteria circunfleja de 5 minutos, el electrocardiograma intramiocárdico y el flujo coronario se normalizaban aproximadamente en 1 y 7 minutos respectivamente, en contraste con la persistencia de una función contráctil deprimida durante más de 2 horas. Cuando la oclusión era más prolongada (15 minutos), la disfunción contráctil persistía más de 6 horas, sin encontrar signos de necrosis miocárdica, y se había normalizado a las 24 horas de reperfusión. Posteriormente otros investigadores comunicaron esa disfunción postisquémica de la contractilidad (Geft *et al.*, 1982), denominada por Braunwald y Kloner "miocardio aturdido" (stunned myocardium) (1982), mostrando que puede aparecer en diversos modelos de isquemia.

Charlat y cols. (1989), utilizando una preparación canina similar a la utilizada por Heyndrickx (15 minutos de isquemia y 7 días de reperfusión), observan una persistencia de

depresión en la fracción de acortamiento sistólico significativa respecto a los valores basales hasta 24 horas después de restablecido el flujo, con total normalización a partir de las 48 horas. Así mismo objetivaron anomalías persistentes en la función diastólica regional, ampliando así el concepto tradicional de trastorno únicamente sistólico a uno más amplio de alteración mecánica que abarca tanto la función sistólica como diastólica.

Estos hallazgos se confirman en nuestro modelo en el cual podemos observar como, tras una oclusión prolongada de 15 minutos en el que la fracción de acortamiento cae a valores de acinesia/discinesia, se produce un deterioro progresivo de sus valores durante la reperfusión, que persiste a los 60 minutos de cesada la obstrucción coronaria (50% del valor basal) (figura D.2).



**Figura D.2.-** Evolución de la fracción de acortamiento de la zona isquémica de la serie Control durante el protocolo isquémico. Isq: isquemia; Rep: reperfusión.

Ellis y cols. (1983), en un modelo canino experimental de 2 horas de oclusión coronaria y utilizando ecocardiografía bidimensional para medir el engrosamiento de pared del miocardio que había sido sometido a isquemia, observaron como transcurridas 48 horas de reperfusión el tejido volvía a tener una contracción activa. Esta recuperación de la función contráctil tras un período prolongado de isquemia se explica porque junto al tejido necrótico están presentes algunas células dañadas, en las que el daño es reversible.

Estas discrepancias en los efectos que la isquemia tiene sobre el miocardio y, más concretamente en la duración de la disfunción postisquémica podrían ser explicadas por las diferentes técnicas utilizadas para la medida de la función contráctil regional (sonomicrometría, ecocardiografía, etc.). Sin embargo todos los investigadores, incluido

nuestro grupo, están de acuerdo en que períodos de isquemia de 15 minutos ocasionan una disfunción segmentaria de la contractilidad ventricular que persiste varias horas después de restablecido el flujo y que la duración de la disfunción postisquémica está directamente relacionada con la duración de la oclusión coronaria (Preuss *et al.*, 1987; Hanich *et al.*, 1993).

Un dato importante que se observa cuando analizamos el patrón evolutivo de la FA durante la reperfusión, es la significativa mejoría de sus valores en el primer minuto de reperfusión para, posteriormente, ir empeorando progresivamente. Estos hallazgos vienen a señalar que estos primeros instantes constituyen un “punto-clave” en la lesión por reperfusión, probablemente relacionado con el incremento de calcio citosólico y el pico en la producción de radicales libres que se produce entre los 2-4 minutos de iniciada la fase de reperfusión.

A pesar del descenso de la contractilidad segmentaria en el área isquémica, no se objetivan modificaciones significativas de la  $dp/dt$  (dato indirecto de función ventricular), probablemente debido al escaso territorio afecto (tercio distal de la arteria descendente anterior) y al efecto *compensador* del área no-isquémica. Estos hallazgos son similares a los descritos por Sharma *y cols.* (1975), quienes no objetivan modificaciones de la  $dp/dt$  en el perro cuando ocluían la arteria descendente anterior durante 30 minutos, pero sí observaban una depresión significativa de sus valores cuando la oclusión coronaria era de 60 ó 90 minutos.

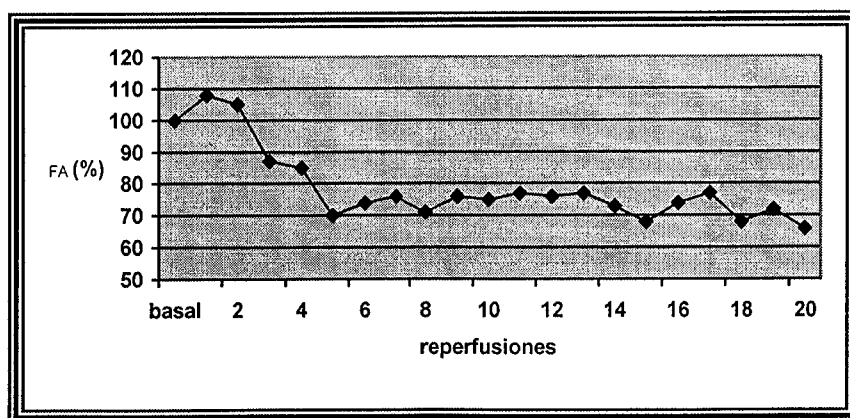
## **2.2.-Efectos de episodios repetidos breves de isquemia sobre la contractilidad miocárdica.**

La primera comunicación sobre los efectos que la isquemia subletal repetida ejerce en el miocardio se debe a Geft *y cols.* (1982), los cuales mostraron como oclusiones de 5 a 15 minutos cuando son repetidas podían producir un daño a nivel histoquímico acumulativo. Posteriormente otros autores han mostrado resultados similares en diversos protocolos de isquemias repetidas. Nicklas *y cols.* (1985) observan en un modelo canino, como tras 16 oclusiones repetidas sobre la arteria descendente anterior de 5 minutos seguidas de 10 minutos de reperfusión entre ellas, dejando una hora de recuperación tras finalizar el protocolo isquémico, provocaban un deterioro progresivo de la función sistólica regional de un 20% tras la recuperación de la primera oclusión, un 82% tras la octava y un 91% tras la última oclusión, presentando un 104% de afectación a la hora de recuperación ( $p < 0.015$ ). Así mismo se vió que este deterioro de la función regional no iba asociado a una evidencia enzimática o ultraestructural de necrosis miocárdica. Zhao *y cols.* (1992) encuentran

resultados parecidos en un modelo experimental canino en el que realizan 12 oclusiones sobre la arteria descendente anterior, con el mismo tiempo de isquemia y reperfusión que los anteriores autores.

Otros autores describen el efecto acumulativo; así, Gross y cols. (1992b) lo observan provocando oclusiones sobre la arteria descendente anterior de 5 minutos de duración y repetidas cuatro veces en un modelo canino, permitiendo 5 minutos de reperfusión entre ellas, y con una hora de recuperación posterior. Chen y cols. (1992) también comunican este efecto utilizando un modelo de isquemia de 5 minutos, repetido hasta 8 veces y con 10 minutos de reperfusión entre ellos, permitiendo una hora de recuperación posterior.

En el presente trabajo observamos como a partir del 3º procedimiento de isquemia/reperfusión la recuperación completa de la fracción de acortamiento que se objetivaba en las primeras reperfusiones (alcanzando valores de hiperdinamia), empieza a disminuir progresivamente con cada oclusión, hasta alcanzar un deterioro máximo significativo del 36% al final del protocolo experimental ( $p<0.05$ ), provocando un verdadero aturdimiento miocárdico y apuntando hacia un más que probable daño acumulativo (figura D.3).



**Figura D.3.-** Evolución de la fracción de acortamiento de la zona isquémica en la serie Placebo a lo largo del protocolo de isquemias/reperfusiones breves y repetidas.-

En experimentos previos realizados en nuestro grupo en los cuales se aplica el protocolo de isquemias breves y repetidas descrito en este trabajo (Pomar, 1992; Pomar *et al.*, 1995), observamos un comportamiento similar, si bien el daño en la función contráctil tiende a ser ligeramente menor y estadísticamente significativo a partir del 9º procedimiento de isquemia/reperfusión. Así tras la 9ª oclusión la fracción de acortamiento se encuentra afectada en un 7,1% ( $p<0.05$ ), tras la 20ª oclusión un 14,9% ( $p<0.05$ ) y tras 60 minutos de recuperación se encuentra afectada un 18,9% ( $p<0.05$ ) con respecto a los valores basales,

indicando que la disfunción postisquémica es progresiva y más evidente cuanto más tiempo de reperfusión permitimos tras la finalización de la injuria isquémica.

Nuestros resultados vemos que difieren con los comunicados por los autores anteriores en cuanto al grado de afectación, pudiendo deberse estas diferencias al distinto tiempo de isquemia, siendo nuestro modelo más suave, aunque con un menor tiempo de reperfusión entre las oclusiones, pero observando al igual que ellos un efecto acumulativo del daño producido.

Sin embargo otros investigadores consultados han obteniendo diferencias en cuanto a los resultados funcionales comunicados, mediante patrones de isquemia repetida diferentes. Así, Lange y *cols.* (1984), utilizando episodios de isquemia de mayor duración, observan como tres episodios de 15 minutos con intervalos de 30 minutos de reperfusión entre ellos y seguidos por 180 minutos de recuperación, producen una depresión de la función contráctil durante la isquemia y reperfusión, pero no observan el efecto acumulativo descrito anteriormente.

Reimer y *cols.* (1986) utilizando un protocolo isquémico consistente en 4 episodios de 10 minutos y separados por 20 minutos de reperfusión, seguidos por 4 días de recuperación, concluyen que los periodos intermitentes de reperfusión previenen del efecto acumulativo en cuanto a la deplección de fosfatos de alta energía, previniendo también de la necrosis, pese a que el tiempo total de isquemia sea de 40 minutos. A la misma conclusión había llegado anteriormente Swain y *cols.* (1984) utilizando un protocolo de 3 episodios de oclusión de 12 minutos sobre la arteria coronaria descendente anterior y con 10 minutos de reperfusión entre ellos.

Si observamos los tiempos totales de isquemia descritos observaremos que estos serían suficientes para provocar un daño irreversible del miocardio afectado; así, en el modelo de Nicklas y *cols.*, el tiempo total es de 80 minutos de isquemia, en el de Zhao y *cols.* de 60 minutos, Chen y *cols.* de 40 minutos (igual tiempo que en nuestro modelo); la diferencia con los modelos de isquemia única (< de 20 minutos de isquemia total) es que la disfunción mecánica se desarrolla de forma gradual, pero estando asociada al grado de carga isquémica total (40-60 minutos vs 10-15 minutos).

La diferencia fundamental observada de los trabajos analizados es que unos autores observan un efecto acumulativo de la isquemia que otros no describen. Si analizamos estos

trabajos podemos apreciar que el grado de afectación de la función puede que no esté en relación con el número de isquemias producidas ni con el tiempo de duración de cada una de ellas, sino con los distintos tiempos de reperfusión que existen entre ellas, permitiendo en mayor o menor medida la recuperación de la zona isquémica antes de una nueva injuria isquémica. Así, observamos que el grado de afectación de los valores de función regional es menor con tiempos de reperfusión mayores, no así con tiempos más breves. A este respecto Fujita y cols. (1988), con oclusioniones de dos minutos de duración y con intervalos de 30 minutos de reperfusión, observan que el acortamiento sistólico del área isquémica no se modifica por la isquemia repetida. Todo ello confirma la importancia que tiene la duración de los períodos de reperfusión en el caso de isquemias repetidas. Wynsen y cols. (1991) demuestran que con similar tiempo de isquemia, cuando los períodos de reperfusión son cortos, se produce un deterioro acumulativo en la fracción de acortamiento; por el contrario con intervalos más prolongados, la recuperación de la función contráctil, una vez cesada la isquemia, es total, sin objetivar disfunción post-isquémica acumulativa.

El modelo de isquemias breves y repetidas utilizado por nosotros en este trabajo es el que a más procesos isquémicos está sometido, pero también es el que tiene el período de isquemia mas breve de los descritos en la literatura, y el grado de afectación observado no difiere con el descrito por otros autores con tiempos de isquemia mayores, por lo que si la isquemia parece tener una influencia determinante, también debe de ser importante el poco tiempo de reperfusión que dejamos entre cada proceso (3 minutos), pudiendo también colaborar a la acomodación del daño el número de procesos de reperfusión que se dan en nuestro modelo.

Analizando los protocolos descritos anteriormente podemos observar como en los trabajos que no comunican el efecto acumulativo de la isquemia, sus períodos de reperfusión entre las oclusioniones son superiores a los 10 minutos; que en el caso de Reimer y cols. (1986) alcanza los 20 minutos. Sin embargo en el resto de trabajos en los que se describe este efecto, el tiempo de reperfusión entre isquemias es siempre menor de 10 minutos. Por tanto, podríamos cifrar en 10 minutos el tiempo máximo de reperfusión entre los diferentes procesos isquémicos para que exista un efecto acumulativo o no.

Otro aspecto que debemos considerar es el desarrollo de circulación colateral como respuesta a un estímulo isquémico, mecanismo que podría explicar la ausencia de disfunción postisquémica tras múltiples oclusioniones breves, con intervalos de reperfusión prolongados. Varios trabajos realizados por el grupo de D. Franklin en modelos caninos demuestran que, tras 15 a 20 días de oclusioniones repetidas de 2 minutos con intervalos de 30 minutos durante

8 horas diarias, desarrollan una circulación colateral suficiente para aportar los requerimientos metabólicos del área isquémica y evita la aparición de disfunción sistólica durante un episodio de isquemia (Takahashi *et al.*, 1982; Fujita *et al.*, 1987).

Posteriormente Mohri y *cols.* (1989) demuestran que la duración de la isquemia es vital para que la circulación colateral pueda desarrollarse. Así estos autores, con tiempos totales de isquemia iguales a los anteriores (90 minutos), observan como con oclusiones de dos minutos se desarrolla circulación colateral, y por el contrario, cuando las oclusiones son de 15 segundos, no existe estímulo suficiente para la angiogénesis.

En nuestro modelo el tiempo de cada oclusión es igual al de los anteriores autores, aunque el tiempo de isquemia total es menor, pensamos que no existe estímulo ni tiempo suficiente, dado que se producía el sacrificio del animal inmediatamente tras finalizar el protocolo isquémico.

Hemos observado también en nuestro trabajo como la zona sometida a isquemia repetida experimenta un aumento de su longitud tanto en telediástole como en telesístole. El aumento de la longitud en telesístole está directamente relacionado con la pérdida de acortamiento propio de la disfunción sistólica. Pero el aumento de la longitud telediastólica indica que en el miocardio aturdido la función diastólica está también afectada. Nicklas y *cols.* (1985) observan un aumento de las dimensiones de la zona isquémica, similar al observado por nosotros, con isquemias repetidas de 5 minutos. También en la clínica se ha demostrado persistencia de anormalidades diastólicas tras periodos repetitivos de isquemia durante la practica de angioplastias coronarias (Wijns *et al.*, 1986).

Al igual que ocurre ante una isquemia única y prolongada y como se ha puesto de manifiesto en trabajos previos (Nicklas *et al.*, 1985), hemos podido objetivar que el empeoramiento de la función sistólica en el tejido isquémico va acompañado de un incremento compensador en la función del tejido no-isquémico, más acusado a medida que van aumentando el número de oclusiones (máximo del 70% en la isquemia nº 11), con recuperación de los valores iniciales durante las reperfusiones, pero manteniendo cifras en todo momento por encima de las basales. Este aumento compensador, junto con la brevedad de los periodos de isquemia, probablemente sean los responsables de la ausencia de variaciones en la  $dP/dt$  (dato indirecto de la función ventricular) durante las oclusiones coronarias, a pesar del amplio territorio afectado.

Así mismo se ha objetivado como la función contráctil regional permanece deprimida durante un largo período de tiempo (dependiendo de la severidad, duración y localización



del episodio isquémico previo), a pesar de la restauración normal del flujo coronario. Gall y cols. (1993) ocluyendo la arteria descendente anterior del perro dos veces, con un tiempo de duración de isquemia total de 15 minutos cada una de ellas, y con una hora de reperfusión entre ellas, observan como la repetición de la isquemia retrasa la recuperación de la función, si lo comparamos con un episodio de oclusión única; y que esta disfunción puede seguir empeorando a pesar de la reperfusión. En un estudio realizado previamente en nuestro laboratorio observamos como tras finalizar el protocolo isquémico la fracción de acortamiento sigue afectándose de forma progresiva hasta un máximo en el 5º día de seguimiento del 67,88% con respecto al valor basal ( $p < 0.001$ ), tardando un total de 15 días para su total recuperación (Pallares, 1996). Esta disfunción acumulada Gall y cols. la denominan "*Myocardial Creep*" (Miocardio decrepito). Este concepto según estos autores podría ayudar a explicar la disfunción acumulada en los procesos de isquemia repetida.

"Creep" es una cualidad material definida como un cambio en la longitud segmentaria bajo unas condiciones de carga constantes y que histológicamente se correlacionaba con un ensanchamiento de las bandas I y un incremento de la longitud de las miofibrillas, y que no suele verse en los estudios histológicos debido posiblemente a las técnicas de fijación del tejido. Este incremento de la longitud de las miofibrillas mantiene menos puentes de actina-miosina y disminuye la demanda energética. Es un fenómeno estructural que persiste tras el cese del evento que lo pone en marcha (isquemia-carga), por lo que isquemias repetidas pueden producir tirones acumulativos o *creep*, sin producir necesariamente un daño acumulativo en la maquinaria metabólica celular. Por ello la contribución del fenómeno *creep* miocárdico a la disfunción tras isquemias repetidas concuerda con estudios previos que informan de una estructura histológica normal, disminución de la demanda energética y un pequeño efecto adicional sobre el metabolismo celular.

En el estudio ultraestructural observábamos como existía una disolución de las bandas Z, lo que permitía el contacto de mitocondrias de distinto sarcómero y su fusión. Es muy probable que el análisis futuro próximo de estas bandas nos aporte más información sobre el grado de disfunción observada en nuestro modelo.

Recientemente, Di Carli y cols. (2000), en un trabajo experimental sobre 10 perros sometidos a 4 procesos de isquemias de 5 minutos de duración, separados por 5 minutos de reperfusión, comprueban que el descenso persistente de la contractilidad segmentaria se asociaba a una disminución en la extracción de glucosa por parte del miocardio aturdido (73% respecto al basal;  $p < 0.001$ ) y a un descenso significativo del metabolismo oxidativo, que persistían a las 24 horas del protocolo isquémico, normalizándose a la semana. Estos

hallazgos sugieren una adaptación metabólica única en el miocardio sometido a isquemias múltiples.

A pesar de la gran cantidad de estudios realizados, el mecanismo fundamental de la disfunción contráctil en el miocardio aturdido no está completamente aclarado, implicándose en la actualidad, entre otras, alteraciones en la expresión y/o estado de fosforilación de proteínas reguladoras de la homeostasis del calcio, como el *fosfolambam*, junto a una reducción de los niveles de AMPc (Luss *et al.*, 2000); y alteraciones en el contenido y actividad de determinadas metaloproteinasas que contribuirían a la expansión miocárdica de disfunción contráctil (Lu *et al.*, 2000).

Podemos concluir, tras analizar nuestros resultados y los de los autores que hemos consultado, que los determinantes de la disfunción postisquémica son la duración de la isquemia, la duración de los períodos de reperfusión (tanto en cuanto impiden que se complete la reperfusión) y el número de isquemias/reperfusiones, de tal forma que la intensidad y duración de la disfunción van a ser directamente proporcionales a la duración y número de isquemias/reperfusiones e inversamente proporcional a la duración de los períodos de reperfusión.

### **3.- ALTERACIONES MORFOLÓGICAS EN EL MIOCARDIO SOMETIDO A ISQUEMIA/REPERFUSIÓN. ESTUDIO ULTRAESTRUCTURAL.-**

Después de demostrar que, tanto tras isquemias breves y repetidas como tras una isquemia única y prolongada, se produce una afectación de la contractilidad, el siguiente objetivo en nuestro trabajo fue conocer si dichas alteraciones de la función regional tenían su traducción a nivel ultraestructural, y fundamentalmente a nivel mitocondrial.

La reperfusión precoz es el requisito fundamental para la supervivencia del tejido isquémico, sin embargo, existen evidencias de que la reperfusión no está exenta de riesgos y que éstos, de forma paradójica, podrían producir lesiones que llegaran a destruir células potencialmente viables (Opie, 1989). Desde el punto de vista morfológico la reperfusión tras un período suficientemente prolongado de isquemia conduce a una desintegración de miocitos, con tumefacción celular, alteraciones en el sarcoplasma, tumefacción y fragmentación de las mitocondrias y contracción de sarcómeros con formación de múltiples bandas de contracción (necrosis por contracción) (Herdson *et al.*, 1965; Frank *et al.*, 1986).

Por el contrario, en los infartos no reperfundidos se ven menos anomalías, con miofibrillas relajadas y con una estructura celular conservada (necrosis por coagulación).

La necrosis en bandas de contracción asociadas con la reperfusión habitualmente involucra grandes áreas contiguas de miocardio, pero después de episodios isquémicos más breves, este tipo de lesión puede ser bastante focal, hallándose miocitos destruidos inmediatamente adyacentes a células intactas (Schaper y Schaper, 1983).

En los distintos modelos analizados en los que se provoca un aturdimiento del miocardio isquémico, y en los que este episodio es único (menos de 20 minutos), las lesiones ultraestructurales observadas tras la reperfusión son semejantes, independientemente de la duración de la isquemia (10, 15 minutos). Así se observa como cambios más significativos la distribución de la cromatina en el área perinuclear, la disminución de la densidad citoplasmática y la aparición de gránulos de lipofucsina, edema interfibrilar y aumento del volumen mitocondrial, con desorganización de las crestas y relajación y alargamiento de las bandas I.

### ***3.1. Isquemias breves y repetidas.-***

El estudio morfológico realizado bajo microscopio óptico en nuestro modelo, en el cual provocamos múltiples episodios de isquemia/reperfusión, no reveló signos evidentes de necrosis ni infiltración por neutrófilos en ninguna muestra de tejido isquémico ni en las muestras de tejido control. Henrichs *y cols.* (1987), en un modelo canino con períodos repetidos de isquemia de 3 minutos de duración y seguidos de intervalos de reperfusión de 7 minutos, tampoco detectaron necrosis cuando el tiempo acumulado de isquemia era de 45 minutos, y solo en uno de los trece perros utilizados encontraron mínimas zonas de necrosis en tejido subendocárdico después de 90 minutos de isquemia acumulada. Por el contrario, tras 90 minutos de oclusión permanente evidenciaron necrosis en grandes zonas de epicardio y endocardio en el 95% de los casos.

Cuando estudiamos con microscopía electrónica la ultraestructura de las muestras de tejido control, observamos que existe un pequeño porcentaje de mitocondrias dañadas, las cuales representan la consecuencia del recambio metabólico normal existente en el tejido. En el análisis del tejido de la zona isquémica, aparentemente íntegro al microscopio óptico, hemos encontrado importantes alteraciones de la estructura mitocondrial consistentes principalmente en aclaramiento de su matriz, desorganización de crestas, vacuolización y disminución de su densidad numérica. Además hemos observado una mayor proporción de mitocondrias dañadas con respecto a la zona control, próximas a la significación. En cuanto

a su tamaño y morfología, las mitocondrias de la zona isquémica aparecen más hinchadas, con un aumento significativo en el área, perímetro y eje *mayor*, lo que da lugar a un volumen mitocondrial aumentado.

En el núcleo hemos visto cambios en la disposición de la cromatina, que pasa de una situación de interfase, en donde predominan los acúmulos perinucleares, a una dispersión de la cromatina (núcleos menos electrodensos), reflejando la intensa actividad que esta desarrollando el núcleo para la transcripción de ciertos genes responsables de poner en marcha los procesos necesarios para el recambio mitocondrial y recuperación funcional del tejido.

Deteniéndonos en la evaluación de la lesión mitocondrial, la valoración de las mitocondrias dañadas pasa de un 8,6% en la zona control a un 14%, tras la aplicación del protocolo isquémico, mientras que las mitocondrias fusionadas pasan del 2,8% al 3,5%, diferencias no estadísticamente significativas. Resultados similares han sido obtenidos por nuestro grupo en trabajos previos utilizando el mismo protocolo isquémico (Pallarés, 1996). En él se podía observar un aumento significativo en el daño mitocondrial tras la realización de las isquemias, junto con un aumento en el porcentaje de mitocondrias fusionadas, que alcanzaba el 54% a las 24 horas de realizado el protocolo isquémico. Por el contrario, el porcentaje de mitocondrias emparejadas no mostraba variaciones significativas. Estos hallazgos ponen de manifiesto la importancia del momento en el que se realiza el estudio. Así en el análisis realizado inmediatamente tras la finalización del protocolo isquémico, el daño mitocondrial es ligeramente superior al tejido control. En cambio, cuando el análisis se realiza a las 24 horas, las alteraciones mitocondriales son más evidentes e importantes. Ello implica un daño mitocondrial progresivo e íntimamente relacionada con la disfunción postisquémica observada.

Cuando los procesos isquémicos son breves y repetidos, con tiempos de reperfusión largos, no se observan diferencias en la ultraestructura con respecto al tejido control; pero cuando los tiempos de reperfusión son también cortos, si se observan alteraciones tras la recuperación, lo cual concuerda con nuestras observaciones (Basuk *et al.*, 1986).

En estudios realizados previamente en nuestro laboratorio, se ha podido observar que las lesiones ultraestructurales mitocondriales descritas persistían incluso tras varios días de realizado el protocolo isquémico. Incluso a nivel del citoplasma persistía la presencia de gránulos de lipofucsina (formados por productos de degradación de las mitocondrias dañadas); así al 5º día, el porcentaje de gránulos encontrados era del 2% ( $p < 0.01$ ), siendo a los 10-15 días de 2,7% en la zona aturdida contra un 0.4% de la zona control ( $p < 0.01$ )

(Pallarés, 1996). Posteriormente se observaba una recuperación progresiva del daño mitocondrial entre los 10-15 días.

De los autores consultados no hemos encontrado ningún trabajo en el que se realice un estudio ultraestructural semejante al nuestro, con inclusión del análisis estereológico mitocondrial.

Algunos autores han atribuido la disfunción postisquémica a las alteraciones estructurales de la matriz colágena extracelular. Zhao *y cols.* (1987), después de 12 oclusioniones de 5 minutos de duración con intervalos de reperfusión de 10 minutos, observaron con microscopía electrónica que el tejido con disfunción postisquémica presentaba una matriz colágena con fibras enrolladas y discontinuas e incluso zonas con pérdida de matriz. Este autor piensa que esa pérdida de colágeno es la causa principal del aumento en la *compliance* miocárdica y de la pérdida de contractilidad que se observa en el miocardio aturdido.

En contra de esta teoría Whittaker (1991) ha comunicado que el daño colágeno solamente aparece cuando la disfunción postisquémica está producida por oclusioniones repetidas y no por oclusioniones aisladas a pesar de que en los dos casos puede existir una similar afectación de la función contráctil.

En nuestra opinión, uno de los principales substratos patológicos del aturdimiento miocárdico en el miocardio sometido a isquemias breves y repetidas sería el daño ultraestructural del aparato mitocondrial que impide que las fibras afectadas dispongan de la energía necesaria para contraerse de un modo adecuado y por lo tanto llevan a una disfunción regional evidente que persistirá hasta que los orgánulos intracelulares se hayan regenerado. Este daño mitocondrial, *asociado probablemente a daño funcional*, podría relacionarse con el número de procesos de reperfusión y la sobrecarga de calcio que pueden originar.

Otras alteraciones que hemos descrito, como la rotura de las bandas Z también podrían contribuir a la afectación de la función, quedando pendiente un análisis más detallado para futuros estudios. Finalmente podemos observar que tanto las alteraciones metabólicas como ultraestructurales que se producen con la isquemia pueden volver a recuperarse con la restauración del flujo coronario que se había interrumpido, y ésta depende tanto del tiempo de isquemia como de reperfusión.

### 3.2.- Isquemia única.-

La presencia de alteraciones mitocondriales ha sido observada por otros investigadores con período de isquemia único y más prolongado en el tiempo, de 10-20 minutos de duración. Todos los corazones muestran pérdida de glucógeno, agregación periférica de la cromatina nuclear y generalmente cambios mitocondriales moderados, con hinchazón mitocondrial en mayor o menor grado, y sin signos de daño irreversible (necrosis) (Heggtveit A., 1969) Greve *y cols.* (1990) analizan estos cambios morfológicos en gatos con tórax abierto sometidos a diferentes tiempos de oclusión de la arteria interventricular anterior y, tras 10 minutos de isquemia, observan mitocondrias hinchadas, aumento de la fragilidad del sarcolema y acúmulos de gotas lipídicas. A los 20 minutos de isquemia la fragmentación del sarcolema, el agrupamiento y la marginación de la cromatina y un importante edema citoplasmático son evidentes. Así mismo se objetivó un aumento de volumen mitocondrial en todos los grupos.

El estudio morfológico realizado bajo microscopio óptico en nuestro modelo de isquemia única de 15 minutos, no reveló signos evidentes de necrosis ni infiltración por neutrófilos en ninguna muestra de tejido, ni de la zona isquémica ni de la zona control. Sin embargo cuando estudiamos con microscopía electrónica la ultraestructura de las muestras de tejido control observamos que existe un pequeño porcentaje de mitocondrias dañadas y fusionadas, así como gránulos de lipofucsina y vacuolización intramitocondrial, parámetros que representan el recambio metabólico existente en el tejido normal (datos similares a los objetivados en el protocolo de isquemias breves y repetidas).

Al analizar el tejido post-isquémico tras 60 minutos de reperfusión, no hemos encontrado diferencias significativas respecto al tejido control en cuanto al daño mitocondrial, las fusiones y emparejamientos mitocondriales y los gránulos de lipofucsina. Tampoco se han encontrado diferencias en el tamaño y la morfología de las mitocondrias de ambas zonas.

Estos hallazgos son similares a los encontrados por otros autores y ponen de manifiesto la importancia de los tiempos de reperfusión en las alteraciones ultraestructurales ante una isquemia única. Así, Jennings *y cols.* (1985) en un modelo de isquemia de 15 minutos en el perro, observan que tras 3 minutos de reperfusión se objetiva un importante hinchazón mitocondrial, mientras que tras 20 minutos de reperfusión, la ultraestructura miocárdica fue esencialmente normal, prácticamente indistinguible de la zona control, con la presencia de glucógeno y la distribución uniforme de la cromatina nuclear; estos hallazgos se mantenían tras 1, 24 y 96 horas de reperfusión. Tampoco Reimer *y cols.* (1983) objetivaron diferencias

ultraestructurales entre el tejido control y una zona sometida a 15 minutos de isquemia y 24 horas de reperfusión.

Basuk *y cols.* (1986) estudian la ultraestructura celular inmediatamente después de una oclusión de 10 minutos de la arteria coronaria circunfleja en el perro y aprecian ligera marginación de la cromatina nuclear, ausencia de gránulos intramitocondriales y pérdida parcial de glucógeno. En otro grupo de animales con un período de isquemia similar pero seguidos de 20 minutos de reperfusión observan una completa recuperación de las alteraciones intracelulares, y en un tercer grupo después de cuatro oclusiones de 10 minutos con intervalos de reperfusión de 20 minutos, tampoco encuentra alteraciones. Estos hallazgos son concordantes y podrían explicar las experiencias de Wynsen (1991) sobre la importancia de los períodos de reperfusión en la aparición de disfunción postisquémica.

Podemos concluir que cuando el análisis estructural se realiza tras un tiempo mínimo de unos 20 minutos tras producirse la reperfusión, los diferentes autores consultados no han encontrado diferencias con respecto a los hallazgos en tejidos controles, como ha ocurrido en nuestro modelo. Pensamos que la ausencia de alteraciones en la estructura mitocondrial apunta a alteraciones en la función mitocondrial (por ejemplo una inhibición en la utilización del gradiente electroquímico de  $H^+$  para la producción energética), o bien a alteraciones extramitocitarias, como las responsables de la disfunción contráctil persistente observada en el tejido sometido a una isquemia única de 15 minutos. Algunos autores han objetivado disminuciones de la reserva coronaria en perros sometidos a una isquemia breve y reversible, sugiriendo que la magnitud de las anomalías vasculares tras la isquemia aumentan con la duración de la obstrucción coronaria (Triana y Bolli, 1991). Chandrashekhar *y cols.* (1999b), en un modelo de cardiomiocito aislado, sugieren que anomalías en la matriz extracelular o en el acoplamiento entre el miocito y el tejido intersticial pudieran ser las responsables de la génesis de la disfunción objetivada en el aturdimiento miocárdico.

#### 4.- TRIMETAZIDINA Y ATURDIMIENTO MIOCÁRDICO.-

##### 4.1.- ESTUDIOS EXPERIMENTALES.-

“Cito y cardioprotección” deben definirse estrictamente como la capacidad de un agente o una intervención en mejorar directamente la capacidad del miocito para sobrevivir al daño inducido por la isquemia/reperfusión, independientemente de otras acciones hemodinámicas o posibles efectos en la circulación coronaria. Estos términos indican la capacidad de un agente de actuar a nivel celular, molecular, metabólico, en la homeostasis iónica y/o en la función de membrana, que son afectadas durante la isquemia/reperfusión y conducen hacia el daño irreversible. El efecto citoprotector del agente puede ser fácilmente testado a nivel experimental, donde los efectos coronarios pueden ser controlados y separados de sus efectos directos sobre el metabolismo o a nivel molecular del miocito. Los parámetros más utilizados para analizar su acción protectora son: 1) reducción en el tamaño del infarto de miocardio; 2) recuperación de la función mecánica y/o metabólica; 3) utilización de sustratos; 4) reducción del lactato; 6) recuperación rápida de los depósitos de alta energía; 8) integridad de las membranas celulares e intracelulares; 9) metabolismo de la adenosina; 9) toxicidad del oxígeno y 10) eliminación de las sustancias intracelulares.

Muchos han sido los agentes que han sido analizados en preparaciones de corazón perfundido o aislado y que han sido clasificados mediante estos *endpoints* como cardioprotectores (calcioantagonistas, betabloqueantes, derivados de carnitina, diferentes tipos de antioxidantes, etc) y, por supuesto, la TMZ.

Los trabajos experimentales realizados en células, tejidos u órganos aislados y en el animal entero demuestran que la TMZ actúa a nivel del metabolismo celular, oponiéndose punto por punto a todas las consecuencias que el déficit de oxígeno induce en la célula isquémica, comportándose como un verdadero agente antiisquémico. Así se ha observado que la TMZ:

1.- **Preserva la producción energética.** En corazones aislados de rata perfundidos con una solución hipóxica, la TMZ evita la caída de las tasas intracelulares de compuestos ricos en energía, como son el ATP y la fosfocreatina. En la reperfusión permite una restauración más rápida y completa del potencial energético de la célula, acelerando la recuperación de las reservas energéticas (Allibardi *et al.*, 1998). En un modelo de corazón aislado de rata en parada cardíaca, la adición de TMZ al líquido de cardioplegia mejora significativamente el estado energético, caracterizado por una aceleración de la síntesis de fosfocreatina, de la reconstitución del *pool* de ATP y una menor acumulación de fósforo inorgánico. Como



consecuencia de ello, la función cardíaca, representada por la presión ventricular izquierda, mejora significativamente (Aussedat, 1993). Posteriormente el mismo grupo confirmó los datos en un modelo similar de conservación a largo plazo de corazones de rata, objetivando también una mayor restauración de la formación de NADPH en el grupo tratado con TMZ, lo que traduce una mayor eficacia en la producción de ATP a nivel mitocondrial (Kay *et al*, 1995). Esta mejora en la fosforilación de nucleótidos de adenina podría ser resultado de un uso mitocondrial más eficiente del oxígeno residual, como ya sugirió Lavanchy y *cols.* (1987) en un estudio sobre los efectos de TMZ en corazones aislados de rata. En él se analizó mediante determinaciones de fósforo<sup>31</sup> por espectroscopia con resonancia magnética nuclear, el efecto de la TMZ sobre las concentraciones de ATP, fosfocreatina y fósforo inorgánico (Pi) en corazones de rata sometidos a situaciones de isquemia global parcial y total. Observaron como la restauración de los procesos de fosforilación en la reperfusión (a través del cociente ATP/Pi) es más rápida bajo el influjo de la TMZ que en corazones normales; en el grupo perfundido con TMZ la concentración de ATP fue mayor (38%), junto con una menor acumulación de Pi en comparación con el grupo control.

**2.- Limita la acidosis intracelular y los trastornos iónicos inducidos por los desórdenes metabólicos asociados a la isquemia.** El desarrollo de la acidosis durante la isquemia es un proceso multifactorial que tiene como resultado una producción excesiva de protones y una eliminación reducida (o ausente) de protones en la célula. La acción de la TMZ sobre los sistemas de transporte iónico de las membranas ha sido estudiado por Renaud (1988) en membranas purificadas a partir de cultivos en capas monocelulares de miocitos de diferentes especies animales. Los resultados demuestran que, en condiciones fisiológicas, la TMZ no modifica en absoluto ni la estructura ni la función de los canales de sodio y del calcio dependientes de la diferencia de potencial, ni la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa. Por el contrario, en condiciones de carga ácida, la TMZ protege a la célula cardíaca contra la acumulación de H<sup>+</sup> durante la isquemia, limitando la acumulación intracelular de Na<sup>+</sup> y de Ca<sup>++</sup> y evitando la aparición del edema y de las perturbaciones eléctricas de la membrana. Este resultado confirma la hipótesis de Lavanchy y *cols.* (1987) de que la TMZ protege la célula contra la acidosis celular al poner de manifiesto en sus investigaciones que la acidosis intracelular inducida por la isquemia se desarrollaba más lentamente cuando los corazones estaban perfundidos con TMZ (pH de 6.4 vs 6.0, al final de la isquemia) en un modelo de corazón de rata. Al limitar la acumulación de protones en las células miocárdicas isquémicas, la TMZ reduce la entrada de Na<sup>+</sup> en relación con la activación de la bomba Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> y secundariamente reduce la acumulación intracelular de Ca<sup>++</sup> inducida por la bomba Na<sup>+</sup>-Ca<sup>++</sup>. De esta forma, la TMZ puede indirectamente, y al menos temporalmente, limitar la acumulación de calcio en el miocardio isquémico. Similares resultados se han obtenido en un modelo de isquemia moderada (70%) sobre corazón de ratas, en el que se demuestra

una menor reducción del pH intracelular durante la isquemia en el grupo tratado con TMZ, más acusado cuando el sustrato metabólico son ácidos grasos (EL Banani, 1998). Así mismo, la TMZ mejora la viabilidad de las células aisladas de miocardio de rata sometido a hipoxia en presencia de concentraciones extracelulares elevadas de calcio (Cruz *et al*, 1987). En ausencia de TMZ en el medio de incubación, el stress hipoxico en presencia de calcio provoca una reducción de al menos el 60% en el número de células miocárdicas viables, mientras que la adición de TMZ se acompaña de un aumento significativo en el número de células viables asociado a un mantenimiento superior de los niveles celulares de ATP. Así mismo se objetiva una preservación del contenido intracelular de  $K^+$  de los miocitos aislados de rata y mantenidos en condiciones de hipoxia.

**3.- Protege la célula y las estructuras celulares de los efectos tóxicos de los radicales libres.** La TMZ disminuye la peroxidación de los lípidos de membrana y disminuye la fuga de potasio, lo cual favorece el mantenimiento tanto de la respiración mitocondrial como de la integridad de las membranas y, en consecuencia, el mantenimiento de la vida y las funciones celulares (Maridonneau-Parini *et al.*, 1987). Dicho efecto no parece realizarse a través de la estimulación de las enzimas intracelulares encargadas de eliminar los radicales libres. Maupoil y *cols.* (1990) estimaron la producción de radicales libres derivados del oxígeno durante la reperfusión del corazón aislado de rata sometido a un período de bajo flujo de 10 minutos de duración ( $1,2 \text{ ml} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Sus hallazgos indicaron que la adición de TMZ ( $10^{-5} \text{ M}$ ) en la solución de perfusión cardíaca disminuía la cantidad de radicales libres producidos durante la reperfusión, en especial el radical peroxilo. Guarnieri y Muscari (1988) han estudiado la formación del radical superóxido y de dialdehído malónico (producto de degradación de la lipoperoxidación) en mitocondrias de corazón de ratas intoxicadas con monocrotalina. Esta sustancia, un alcaloide de origen vegetal, provoca insuficiencia cardíaca en la rata y reduce la función mitocondrial, con deplección de compuestos de alta energía y producción de radicales libres. En dicho modelo, la intoxicación por monocrotalina se consigue mediante una única inyección de 105 mg/kg. El grupo tratado recibe a continuación trimetazidina (5mg/Kg) durante 21 días; posteriormente se preparan las mitocondrias a partir de los corazones aislados. En comparación con el grupo de ratas controles que sólo recibieron la monocrotalina, la administración de trimetazidina redujo la gravedad de la insuficiencia cardíaca inducida por el alcaloide, preservó la respiración mitocondrial y la producción de ATP y disminuyó considerablemente la formación de superóxidos y de dialdehído malónico en un 50% aproximadamente. Paralelamente la administración de TMZ sola a animales no intoxicados no modificó ninguno de estos parámetros. Este estudio realizado in vivo demuestra un efecto protector de la TMZ frente a los radicales libres y subraya una propiedad fundamental: la TMZ sólo presenta actividad farmacológica en un contexto patológico. Por el contrario, carece

absolutamente de acción apreciable sobre los tejidos que se encuentran en condiciones fisiológicas. El efecto en la mitocondria parece depender de la administración de TMZ in vivo, dado que ello no ocurre cuando la TMZ es directamente administrada en la mitocondria aislada *in vitro*.

4.- **Reduce el fenómeno inflamatorio.** Como hemos visto en la introducción, algunos estudios han enfatizado la importancia de la respuesta inflamatoria en el tejido miocárdico isquémico, caracterizado por edema e infiltración celular. Esta respuesta inflamatoria puede agravar las lesiones isquémicas y extender la necrosis en casos de isquemia permanente. También se ha demostrado en varios modelos experimentales de ligadura coronaria que, procedimientos tales como la deplección de neutrófilos y/o la administración de sustancias que inhiben la infiltración leucocitaria, se acompañaba de una reducción en el tamaño del infarto miocárdico (Ma *et al*, 1992). Williams y cols. (1993) en un modelo de isquemia temporal (30 min.) seguido de 3 horas de reperfusión en el conejo capaz de estimular la infiltración leucocitaria a través de neutrófilos marcados con indio<sup>111</sup>, demostraron que la administración intravenosa de TMZ prevenía la activación de los neutrófilos, disminuyendo su concentración en la zona isquémica en las primeras horas postreperfusión, pero no en el área necrótica. Dicho efecto no parece ser resultado de una acción directa sobre los neutrófilos, dado que la acumulación de dichas células en la piel secundaria a la administración subcutánea de mediadores quimiotácticos, no se vió modificada por la administración de TMZ. El edema intracelular no se vió modificado por el tratamiento farmacológico.

Así mismo también se ha objetivado que la TMZ inhibe la producción de tromboxano A<sub>2</sub>. Al parecer, la TMZ produce una inhibición de la cascada del ácido araquidónico y, por tanto, una disminución de la producción de tromboxano A<sub>2</sub> que se traduce en un descenso de la agregabilidad plaquetaria *in vitro* (Shirahase *et al.*, 1988). En un modelo canino de enfermedad coronaria, la TMZ previene la agregación plaquetaria sin provocar trastornos en la coagulación ni incremento en el tiempo de sangrado; poniéndose en duda que este efecto sea debido a una inhibición de los receptores de trombina o de fibrinógeno, o a una interferencia con el metabolismo del ácido araquidónico (Belcher *et al.*, 1993).

5.- **Reduce la contractura isquémica.** La contractura isquémica es uno de los puntos clave de la isquemia grave de miocardio. Aunque la contractura en sí misma es potencialmente reversible, puede provocar un problema importante al establecer un círculo vicioso, comprimiendo las arterias coronarias y disminuyendo aún más el flujo coronario isquémico ya disminuido. Así, la prevención de la contractura debería ser uno de los objetivos en el enfoque global del descenso de la lesión cardíaca isquémica irreversible en

modelos animales. Opie y Boucher (1995) evaluaron el efecto de la trimetazidina sobre el desarrollo de contractura isquémica en ratas *Wistar* y objetivaron como la adición de trimetazidina ( $10^{-6}$  M) a la solución de perfusión limita la contractura isquémica en corazones, tanto sin pretratamiento como con tratamiento previo con TMZ. Sin embargo la preservación es significativamente mejor en el grupo pretratado con TMZ, según lo indica la reducción de dos tercios en la contractura isquémica máxima.

En resumen, la TMZ, actuando en una fase anterior a la sucesión de los acontecimientos asociados con la isquemia celular, permite por un lado la recuperación del metabolismo energético y, por otro lado la reducción de la acidosis intracelular. La consecuencia directa de estas acciones es el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana indispensables para la función eléctrica y contráctil del miocardio. Al mismo tiempo, permite atenuar o retardar la fase agravante asociada al choque oxidante del proceso de reperfusión. Todos estos datos experimentales sugieren un efecto antiisquémico directo y real de la TMZ, sin relación con alteraciones en la balanza aporte-demanda de oxígeno y que se van a traducir en una disminución de una de las consecuencias funcionales más importantes de la isquemia y la reperfusión: el aturdimiento miocárdico.

Todas las características anteriormente descritas, así como los resultados de los diferentes autores consultados bajo diferentes condiciones isquémicas (tanto *in vivo* como *in vitro*), nos animaron a utilizar este fármaco para estudiar su comportamiento bajo 2 condiciones isquémicas diferentes: en nuestro modelo de aturdimiento miocárdico por isquemias breves y repetidas, y ante una isquemia única, más prolongada en el tiempo y que había demostrado en otros estudios producir aturdimiento.

Así, en el modelo de isquemias breves y repetidas, cuando comparamos la evolución de la fracción de acortamiento de la zona isquémica en la serie tratada con TMZ durante la aplicación de las sucesivas fases de oclusión coronaria, observamos un comportamiento similar a la serie Placebo, sin diferencias significativas y con caída de la FA a valores de acinesia/discinesia. Durante la fase de reperfusión, observamos un mejor comportamiento de la FA en la serie tratada con TMZ en la que se objetiva una completa recuperación de sus valores durante las sucesivas reperfusiones, sin objetivarse un verdadero aturdimiento miocárdico al final del protocolo experimental, si bien este mayor grado de recuperación en la serie TMZ no muestra diferencias significativas respecto a la serie Placebo donde sí se produce una disfunción contráctil (97% vs 64% respecto del valor basal). Pensamos que esta tendencia protectora de la TMZ en la lesión por reperfusión no alcanza valores de significación dado el pequeño número de la muestra analizada, de tal manera que con una mayor muestra o bien con un mayor número de isquemias/reperfusiones, posiblemente la

balanza se inclinara hacia la TMZ de forma significativa. Así vemos que si calculamos la recuperación media global de todas las reperfusiones, observamos como ésta es significativamente superior en el grupo tratado con TMZ en relación a la serie Placebo (116.29% vs 78.09%;  $p < 0.001$ ), lo que apunta hacia un probable efecto protector de la TMZ en la lesión por reperfusión, limitando así el aturdimiento miocárdico.

Nuestros resultados difieren de los encontrados por Koning y cols. (1993) en un protocolo isquémico muy similar, pero utilizando un modelo animal y una vía de administración del fármaco muy distintas. Dichos autores estudiaron el efecto de la TMZ en la recuperación de la contractilidad regional en cerdos anestesiados y sometidos a 15 oclusiones de 2 minutos de duración de la arteria descendente anterior, seguida de 120 minutos de reperfusión. La función contractil miocárdica fue determinada mediante técnicas de sonometría, insertando cristales piezo-eléctricos en la zona isquémica (similar a nuestro estudio). La TMZ fue infundida en las coronarias ( $33 \mu\text{gr.Kg}^{-1}.\text{min}^{-1}$ ) desde 15 minutos antes de la primera oclusión hasta finalizar la última. Los resultados mostraron que la TMZ no ejerce ninguna influencia sobre los cambios hemodinámicos, la función regional cardíaca y los eventos metabólicos inducidos por isquemias repetidas, en comparación con un grupo control. Nosotros pensamos que probablemente para ejercer su efecto se necesita una impregnación crónica del miocardio con TMZ, como es factible que ocurriera en nuestra serie donde ésta fue administrada durante un periodo de tiempo previo (1 semana), si bien no hemos encontrado en la literatura ninguna base que apoye nuestra hipótesis.

Con respecto a la función segmentaria de la zona no sometida a isquemia, observamos un ligero incremento de sus valores durante la obstrucción coronaria (“efecto compensador”), de hasta un 25% en el grupo TMZ, sin diferencias significativas respecto al aumento que se observaba también en la serie Placebo durante la obstrucción coronaria. Cuando comparamos la FA de la zona control durante las reperfusiones, vemos que los valores son ligeramente mayores en el grupo Placebo, sin llegar a ser significativo, probablemente porque en este grupo la recuperación de la FA de la zona isquémica es menor y se necesita una mayor contractilidad “compensadora” del resto de los segmentos.

Un punto que debemos destacar es que este ligero efecto citoprotector de la TMZ se realiza sin ejercer modificaciones de los parámetros hemodinámicos (FC,  $dP/dt$  y PVI), los cuales no presentan diferencias en relación con la serie Placebo, como ha sido puesto de manifiesto por múltiples autores.

Otro aspecto que hemos analizado es si estas ligeras diferencias observadas en cuanto a los parámetros de función regional en relación a la serie Placebo, se traducían en cambios a nivel ultraestructural.

En el análisis de la zona control de ambas series (Placebo y TMZ), no hemos encontrado diferencias significativas en cuanto al daño mitocondrial, si bien el porcentaje de mitocondrias dañadas, fusionadas y emparejadas es discretamente superior en el grupo tratado con TMZ. Un dato importante es la existencia de una mayor cantidad de gránulos de lipofucsina en la serie tratada con TMZ ( $p < 0.05$ ). La interpretación de estas modificaciones ultraestructurales en el tejido control puede ser muy compleja, pero pensamos que probablemente ello sea traducción de una aceleración del recambio mitocondrial. Llama la atención que existen diferencias significativas en cuanto a la morfología y tamaño mitocondriales en ambos grupos. Así, las mitocondrias del grupo tratado con TMZ presentan un perímetro y un eje *mayor* superiores al grupo Placebo, mientras que el eje *menor* es más pequeño, sin cambios en el área mitocondrial, adquiriendo las mitocondrias una morfología alargada y estrecha (“*en bastoncillo*”).

Al igual que ocurre en la serie Placebo, cuando analizamos las mitocondrias de la zona isquémica en la serie TMZ observamos un ligero incremento en el daño mitocondrial y en el número de fusiones mitocondriales, así como una ligera disminución en su número por sarcómero en comparación con la zona control, sin llegar a ser significativo. Con respecto al tamaño mitocondrial, observamos que las mitocondrias de la zona isquémica presentan un perímetro, área y eje *menor* superiores a la zona control, adquiriendo una morfología más “hinchada”.

Cuando comparamos la zona isquémica de la serie Placebo y de la serie TMZ, no hemos observado diferencias significativas, con unos porcentajes de daño y emparejamiento mitocondriales similares en ambas series. Con respecto a las fusiones y vacuolas mitocondriales, éstas son discretamente superiores en el grupo tratado con TMZ, lo cual podría relacionarse con una mayor actividad mitocondrial para afrontar la agresión que supone la hipoxia. Así, mediante la fusión las mitocondrias de diferentes sarcómeros se intentaría optimizar la fabricación de ATP en situación de bajo contenido en oxígeno. Sería interesante valorar la evolución de estas alteraciones a las 24 horas de la reperusión, momento en el que las lesiones ultraestructurales son más evidentes, como se ha puesto de manifiesto en estudios previos realizados por nuestro grupo (Pallarés, 1996). Como hemos visto en el apartado de resultados, las mitocondrias de la zona isquémica del grupo tratado con TMZ presentan una morfología más alargada y un mayor perímetro junto con una tendencia a eje *menor* más pequeño que las mitocondrias del grupo Placebo, manteniendo la

morfología en “*bastoncillo*” que se objetiva en la zona control. Da la impresión que la isquemia contrarrestara las disminuciones del eje *menor* objetivada en las mitocondrias de la serie tratada con TMZ.

El hecho de que esa tendencia a atenuar el aturdimiento miocárdico no vaya paralela con una mejoría en el porcentaje de daño mitocondrial (aunque sí con alteraciones en la morfología mitocondrial) podría apuntar a que el daño estructural objetivado en la mitocondria no sería el único factor responsable del aturdimiento, sino que intervendrían otros factores que escapan a los objetivos de nuestro estudio (pérdida de sensibilidad de las miofibrillas, alteraciones bioquímicas, ...).

El miocardio aturdido puede representar un problema importante en pacientes con episodios cortos y repetidos de isquemia (por ejemplo: isquemia silente) que puede conducir a una disfunción ventricular izquierda persistente que, en el caso de que fueran frecuentes y actuasen sobre diversas zonas miocárdicas, podrían desarrollar una miocardiopatía isquémica. En tal situación, la prevención de la insuficiencia cardíaca pasaría por la utilización profiláctica de fármacos cardioprotectores antiisquémicos.

Cuando analizamos los datos del 2º modelo de isquemia única y prolongada, observamos que, al igual que ocurría en las isquemias breves y repetidas, la TMZ no modifica los parámetros hemodinámicos, sin encontrar diferencias sustanciales entre el grupo tratado y el grupo Placebo, ni en situación basal ni durante la realización del protocolo de isquemia-reperfusión. Cuando analizamos los datos de función segmentaria de la zona sometida a isquemia no hemos objetivado ningún efecto beneficioso de la TMZ con respecto al grupo Placebo, con una evolución de la fracción de acortamiento de la zona isquémica similar a lo largo de todo el experimento: caída de los valores de la FA a cifras de acinesia-discinesia durante la obstrucción coronaria, con importante recuperación de sus cifras durante los primeros momentos de perfusión y posterior empeoramiento progresivo a lo largo de la perfusión, alcanzando valores del 41% a los 60 minutos (aturdimiento miocárdico). Ello apunta hacia la posibilidad de que la TMZ solo sea eficaz ante isquemias moderadas (30-60% del flujo) o bien completas pero de breve duración y no ante una isquemia total más prolongada en el tiempo donde el aporte de oxígeno es nulo y en el que la lesión por perfusión es también de mayor intensidad. La pregunta que surge en estos momentos es si la TMZ podría acelerar en el tiempo la recuperación del aturdimiento en nuestro modelo de isquemia única.

Con respecto a la función segmentaria de la zona no sometida a isquemia, observamos un ligero incremento de sus valores durante la obstrucción coronaria, al igual que ocurría en

el protocolo de isquemias breves y repetidas, si bien en este caso este incremento no resulta estadísticamente significativo, probablemente por el menor tamaño de la zona sometida a isquemia. Este comportamiento es similar en ambas series (TMZ y Placebo), sin mostrar diferencias estadísticamente significativas.

Nuestros resultados difieren de los encontrados con otros autores en los que, sobre modelos diferentes, evidencian una reducción de las consecuencias funcionales de la isquemia. Así, en un modelo de corazón aislado de rata, la TMZ consigue una mayor recuperación del gasto cardíaco tras una isquemia completa de 25 minutos seguida de 30 minutos de reperfusión, en relación con el grupo control (80% vs 55%;  $p < 0,01$ ), sin modificar la frecuencia cardíaca ni las presiones aórticas (Rahman *et al.*, 1989).

A pesar de esta ausencia de beneficio en la recuperación de la disfunción post-isquémica en el grupo tratado con TMZ, quisimos analizar si existían diferencias en el análisis estructural de las mitocondrias entre ambos grupos.

Como ya vimos en el apartado de resultados, cuando comparamos la zona no sometida a isquemia en ambas series (TMZ y Placebo) observamos que, si bien no existen diferencias estadísticamente significativas, existe una tendencia hacia un mayor daño mitocondrial en el grupo tratado con TMZ. Así mismo encontramos diferencias entre ambos grupos en el análisis de la morfología y tamaño mitocondrial: en el grupo tratado con TMZ las mitocondrias son más alargadas y estrechas que en el grupo Placebo ( $p < 0.05$ ), adoptando una morfología de “*bastoncillo*” y con un área menor (próxima a la significación), datos muy similares a los encontrados en el protocolo de isquemias breves y repetidas

En el análisis de la zona isquémica con respecto a la zona control del grupo tratado con TMZ, vemos que no existen diferencias entre ambos grupos en cuanto al daño mitocondrial, con menor número de fusiones mitocondriales. En el análisis del tamaño, las mitocondrias de la zona isquémica son más cortas y más anchas que las de la zona control, perdiendo esa morfología de *bastoncillo* y adquiriendo una morfología de mayor volumen a los 60 minutos de reperfusión.

Cuando comparamos los datos de la zona isquémica con el grupo Placebo, no hemos encontrado diferencias significativas, con un porcentaje de daño y emparejamiento mitocondrial similar en ambas series. Con respecto a las vacuolas y gránulos de lipofucsina, éstos son ligeramente superiores en el grupo TMZ, sin llegar a ser significativo. En cuanto al tamaño mitocondrial, observamos que las mitocondrias isquémicas del grupo TMZ son más cortas que las del grupo Placebo, con un área, perímetro y eje *menor* similares en ambos



grupos. Da la sensación que la isquemia contrarrestaría las diferencias morfológicas objetivadas en la zona control del grupo tratado con TMZ, cambiando hacia una morfología más elipsoidal, y precisando más tiempo de reperfusión que la mitocondria de la serie Placebo para recuperar su morfología inicial (*en bastoncillo*).

Así pues vemos que la ausencia de beneficios hemodinámicos de la TMZ en la lesión por isquemia/reperfusión en nuestro protocolo de isquemia única y prolongada, guarda relación directa con el análisis estructural de las mitocondrias, en el que no hemos encontrado diferencias significativas entre las zonas isquémicas de ambas series.

Dado que, como hemos visto anteriormente, tras 20 minutos de reperfusión no se objetivan cambios significativos en la ultraestructura del tejido isquémico, sería interesante analizar el daño mitocondrial en fases más tempranas, tras una reperfusión inferior a los 20 minutos, con el fin de comprobar si el tratamiento con TMZ modifica el daño mitocondrial objetivado tras una isquemia prolongada (Basuk et al., 1986).

La interpretación de estas modificaciones en la morfología mitocondrial objetivadas en el tejido control de las series tratadas con TMZ de ambos protocolos isquémicos puede ser muy compleja, pero a tenor de los resultados parece importante mantener esa morfología "*en bastoncillo*" para objetivar una mejoría en el aturdimiento miocárdico postisquémico (como se ha puesto de manifiesto en el protocolo de isquemias breves y repetidas). En cambio en el protocolo de isquemia única y prolongada, la pérdida de esa morfología tras la isquemia se correlaciona con la ausencia de mejoría en el aturdimiento miocárdico. Quizás esa morfología mitocondrial observada en los animales tratados con TMZ ponga de manifiesto la presencia de mitocondrias más jóvenes y más activas desde el punto de vista metabólico, con un aumento en el recambio mitocondrial y una aceleración en la regeneración de las mismas (representado por el mayor daño mitocondrial observado en la zona control del grupo TMZ), dado que al quedar bloqueada parcialmente la betaoxidación de los ácidos grasos por parte de la TMZ (teóricamente), la mitocondria necesita trabajar, en condiciones de normoxia, más y metabolizar mayor cantidad de glucosa para generar la misma cantidad de ATP que si metabolizara los ácidos grasos (más de 6 veces); de esta manera la mitocondria precisaría de mayor superficie de membrana para obtener el ATP y lo conseguiría a expensas del "*alargamiento*" en su morfología.

En la literatura no hemos encontrado ningún estudio similar al nuestro para poder comparar los resultados, aunque si se han analizado otras alteraciones ultraestructurales. Así, estudios previos ponen de manifiesto que la TMZ protege al miocardio de las alteraciones tisulares inducidas por la isquemia en ratas sometidas a ligadura coronaria irreversible

seguida de reperfusión. (Camilleri, 1990). La TMZ parece reducir significativamente el volumen de la necrosis y la extensión de las alteraciones estructurales del tejido, observadas tanto con microscopía óptica como electrónica, con una marcada reducción del edema, así como una mayor conservación de las células endoteliales y un menor incremento de la permeabilidad de la membrana de las células miocárdicas en corazones aislados y perfundidos de rata (Didier, 1984). Estos datos favorables han sido atribuidos al menor edema celular observado con la TMZ que favorecería la conservación de la circulación capilar, evitando el fenómeno de “no-reflujo”.

La TMZ también reduce la fibrosis inducida por isquemia/reperfusión. Kajstura y cols. (1996) provocan la obstrucción de la arteria coronaria izquierda en ratas anestesiadas. La TMZ, diluida en agua, fue administrada oralmente a dosis de 10-20 mg.Kg<sup>-1</sup>.dia. El efecto de la TMZ fue estudiado en términos de reducción de la fibrosis inducida por isquemia/reperfusión. Los autores concluyen que la TMZ reduce significativamente este proceso.

La TMZ también ha mostrado su eficacia en la reducción de otra de las consecuencias de la lesión por isquemia/reperfusión: la inestabilidad eléctrica. En un modelo de isquemia miocárdica transitoria (10 minutos) realizada *ex vivo* mediante la ligadura de la arteria coronaria izquierda del corazón aislado de rata, la administración preventiva de trimetazidina (48 h, 24 h y 6 h antes de la experimentación) a altas dosis (administración intraperitoneal), condujo a una reducción en la duración de los episodios de fibrilación ventricular inducidos por la reperfusión ( $327 \pm 34$  s. en el grupo tratado vs  $424 \pm 40$  en el grupo placebo). Al mismo tiempo se objetivó una menor acumulación miocárdica de calcio en el grupo tratado con TMZ. Estos hallazgos condujeron a los autores a formular la hipótesis que la prevención de la acumulación de calcio por la TMZ debía de ser la responsable, en parte, de la reducción en las arritmias de reperfusión (Leris y Boucher, 1993). En nuestro estudio un perro del grupo Placebo presentó un episodio de fibrilación ventricular durante los primeros momentos de la reperfusión tras la isquemia de 15 minutos y dada la escasa incidencia del acontecimiento, no hemos podido obtener resultados concluyentes al respecto.

Ya hemos visto en el análisis de la ultraestructura del tejido sometido a isquemias breves y repetidas un ligero incremento de mitocondrias dañadas y bandas Z afectadas. Debido a la importancia que las bandas Z tienen en la contractilidad, por su estrecha relación con los miofilamentos (los procesos de fusión mitocondrial descritos en este proyecto entre mitocondrias de distinto sarcómero se realiza por destrucción de éstos), consideramos

interesante valorar los niveles de troponina T como marcador de la disfunción celular durante el aturdimiento miocárdico.

En estudios previos realizados en nuestro laboratorio sobre dos modelos de isquemia similares a los realizados en este trabajo (breves y múltiples y única y prolongada), se objetivó un aumento significativo de los niveles de troponina T al final de la reperfusión, tanto en el modelo de isquemias breves (que resultó máximo a las 24 horas) como en el modelo de isquemia única (máximos valores al 5º día) (Capdevila *et al.*, 2001). Los niveles de troponina fueron superiores en el modelo de isquemia única en comparación con el protocolo de isquemias múltiples, a pesar de que la oclusión fue distal y comprometió a menor masa miocárdica. A la luz de estos resultados parece ser que la duración del proceso de isquemia es el más importante determinante para la liberación de troponina T, siendo necesario que la isquemia sea continua. Este resultado seguramente se debe a que la lesión producida por una isquemia de más larga duración puede producir mayores lesiones a nivel del miofilamento liberándose mayor número de moléculas en sangre. La presencia de numerosos procesos de reperfusión, con el aporte de radicales libres que ello supone, resulta de menor importancia para la liberación de troponina. Parece ser que los miofilamentos son más sensibles a la isquemia y está claro que si ésta se fracciona en episodios breves los daños no son aditivos. Probablemente isquemias de corta duración o que incluyan poca masa miocárdica, aunque sean repetidas no producen una elevación significativa de la troponina T en sangre periférica.

En nuestro modelo de isquemias breves y múltiples vemos que en el grupo Placebo se produce un ligero aumento, no significativo, de los niveles de troponina T en sangre venosa periférica tras la realización del protocolo isquémico. Probablemente el hecho de no objetivar un incremento en los niveles de troponina estribe, por un lado, en la precocidad de extracción de la muestra tras la realización del experimento, precisando un mayor tiempo para objetivar el incremento de los niveles de troponina, y, por otro lado, en que la determinación se realiza en sangre periférica y no a nivel del seno coronario, donde probablemente los niveles sean mejor reflejo de lo que está ocurriendo a nivel miocárdico. Cuando comparamos los resultados con el grupo tratado con TMZ, vemos que no existen diferencias entre los niveles de troponina T basales y tras la realización del protocolo isquémico.

Recientemente se ha realizado un estudio doble-ciego con el fin de evaluar el efecto protector de la trimetazidina durante la cirugía de bypass en 30 pacientes mediante la determinación de troponina T. En el grupo tratado con TMZ, los niveles de troponina T fueron estadísticamente inferiores a los del grupo Placebo ( $p < 0.01$ ) en los sucesivos

controles realizados (5 minutos, 12, 24 y 48 horas tras la intervención), concluyendo los autores que la TMZ reducía el daño por isquemia-reperfusión durante la cirugía de bypass, sin ningún efecto hemodinámico postoperatorio (Tunerir *et al.*, 1999).

## **4.2.- -LA TMZ EN LOS ENSAYOS CLÍNICOS.-**

Aunque los trabajos experimentales demuestran sin ningún género de duda que la TMZ protege el metabolismo, la estructura y la función del miocardio isquémico, los ensayos clínicos resultan indispensables para poder trasladar estos efectos protectores al hombre. Son diversas las situaciones patológicas en las que se ha testado la TMZ:

### **4.2.1.-EVALUACIÓN EN MONOTERAPIA.-**

#### **4.2.1.1.- Estudios controlados contra placebo.-**

Passeron (1986) y Sellier (1990) realizaron 2 estudios similares, de diseño doble ciego y controlado con placebo en un total de 86 pacientes con angina de esfuerzo estable. Los enfermos recibieron monoterapia con TMZ o placebo. Los resultados pusieron de manifiesto una mayor reducción de la frecuencia en el número de las crisis anginosas (de  $8,1 \pm 0,3$  a  $2,9 \pm 0,5$  con TMZ y de  $7,6 \pm 0,2$  a  $4,9 \pm 0,5$  con placebo;  $p < 0,001$ ; estudio Passeron) y el consumo de nitroglicerina sublingual en el grupo de la TMZ, así como una elevación en el umbral de aparición del dolor isquémico de esfuerzo, como lo demuestra la prolongación del tiempo de aparición del descenso del segmento ST en la prueba de esfuerzo ( $5,5 \pm 0,6$  vs  $4,7 \pm 0,5$  minutos;  $p = 0,034$ ; grupo Sellier). Paralelamente se objetivó un aumento del trabajo total, duración del esfuerzo y porcentaje de la frecuencia máxima teórica alcanzada en la prueba de esfuerzo con TMZ. Todo ello implica que el paciente coronario, al hacer el mismo esfuerzo físico, corre menos riesgo de lesión isquémica del miocardio al ser tratado con TMZ, y en consecuencia dispone de un mayor margen de seguridad con respecto a la isquemia.

#### **4.2.1.2.- Estudios contra fármacos de referencia.-**

La eficacia de la TMZ, demostrada y determinada mediante estudios de monoterapia, ha sido asimismo comparada a la de otras sustancias de uso habitual en el tratamiento de la insuficiencia coronaria.

*A).- Comparación con nifedipino.-*

En este estudio, realizado por un diseño cruzado y doble ciego, se reclutaron 39 pacientes que fueron tratados sucesivamente con TMZ (60 mg al día) y nifedipino (40 mg al día) durante 6 semanas. Los pacientes presentaban una media de 2,4 crisis de angina por semana y todos ellos tenían una prueba de esfuerzo positiva junto con lesiones documentadas por angiografía coronaria. Ambos fármacos disminuyeron el número de crisis de angina (60%), con similares resultados de eficacia en cuanto a la frecuencia de las crisis semanales y los parámetros de la prueba de esfuerzo (trabajo total, duración del esfuerzo, tiempo de aparición del descenso del segmento ST de 1 mm). Sin embargo se observó una mejor tolerancia de la TMZ cuando se analizaron los diferentes efectos secundarios: 5 pacientes en el grupo TMZ (principalmente problemas gástricos) y 12 en el grupo nifedipino (los bien conocidos signos de la vasodilatación periférica: cefalea, rubor y edema en las piernas) (Dalla-Volta *et al.*, 1990).

*B).- Comparación con propranolol.*

El estudio TEMS (Trimetazidine European Multicenter Study) se realizó en 19 de los centros de cardiología hospitalaria más importantes de Europa. Se trata de un estudio en condiciones de doble ciego y con monoterapia, comparándose la TMZ (20 mg/8 horas) con el propranolol (40 mg/8 horas) en 149 pacientes afectados de angina estable y enfermedad coronaria documentada (ya sea por coronariografía o IMA previo) durante 3 meses. Ambos fármacos presentaron una similar reducción en la incidencia de las crisis y del consumo de nitroglicerina por semana, así como una idéntica mejoría de la tolerancia al esfuerzo demostrada por los parámetros analizados en la prueba de esfuerzo (duración máxima de esfuerzo, tiempo de aparición del descenso del segmento ST, amplitud del descenso). Al final del estudio la prueba de esfuerzo fue negativa en el 30% de los pacientes que recibieron TMZ, un resultado comparable al observado en el grupo del propranolol. En cambio la frecuencia cardíaca y el producto frecuencia x presión en reposo y en el máximo del esfuerzo (índice del consumo de O<sub>2</sub> por el miocardio) permanecieron sin modificaciones en el grupo TMZ, pero disminuyeron significativamente con propranolol. Ello sugiere que la mejoría de la tolerancia al esfuerzo con TMZ no está ligada a una reducción de la demanda en oxígeno del miocardio por medio de una actividad hemodinámica (Detry *et al.*, 1994). Los resultados de este estudio multicéntrico deben ser interpretados cuidadosamente ya que la ausencia de diferencias estadísticamente significativas no es sinónimo de "similitud". La principal crítica de este estudio fue la ausencia de comparación con un grupo placebo, y más aún habiéndose demostrado que el placebo podía mejorar tanto la sintomatología como los resultados de la prueba de esfuerzo en pacientes con angina. Los autores justificaron este

“déficit” basándose en el hecho de que la TMZ ya había demostrado su superioridad antianginosa respecto al placebo en estudios previos y que además no resultaba ético tratar con placebo durante 4 meses a pacientes que padecían de angina en estadio II-III de la Canadian Heart Association.

Adicionalmente, un segundo examen posterior de los datos de monitorización ambulatoria con Holter destinado a aumentar la amplitud de este estudio, ha demostrado incluso que TMZ fue significativamente más eficaz que propranolol en reducir el perfil isquémico circadiano durante la vida diaria, con disminución del número de episodios isquémicos y el área isquémica total ( $p < 0.02$ ) si bien la reducción total del tiempo de isquemia fue similar en ambos grupos (22% vs 23%) (Detry *et al.*, 1995). Llama la atención el hecho de que no se objetivó mejoría en los episodios de isquemia, en especial la isquemia silente, con el propranolol, hecho discordante con los datos publicados en la literatura médica, y que fue atribuido, según los autores, a un tamaño muestral demasiado reducido para obtener conclusiones en lo referente a los episodios de isquemia silente.

#### **4.2.2.- EVALUACIÓN EN TRATAMIENTO ASOCIADO.-**

Habitualmente la asociación de dos antianginosos proporciona una eficacia global que es inferior a la suma de la de cada uno de ellos por separado, dado que suelen tener una acción hemodinámica y reducir el trabajo cardíaco. Sin embargo la TMZ proporciona una suma de eficacia del 100% al poseer un mecanismo de acción diferente al de los restantes fármacos.

Este hecho se ha objetivado durante un estudio multicéntrico doble ciego y controlado con placebo, sobre 29 pacientes coronarios en asociación con un calcioantagonista (nifedipino). Estos pacientes presentaban una angina de esfuerzo que era insuficientemente controlada con dicho calcioantagonista con test de esfuerzo persistentemente positivo, por lo que se asoció como complemento TMZ o placebo durante 15 días. La eficacia fue evaluada con criterios ergométricos: nivel de esfuerzo alcanzado en el momento de la depresión de 1 mm del segmento ST. El análisis de los resultados puso de manifiesto que, después de añadir TMZ a nifedipino mejoraron los resultados de rendimiento de la prueba de esfuerzo, con un mayor nivel de esfuerzo máximo alcanzado (aumento del 31% en el grupo TMZ vs 2% en el grupo placebo;  $p < 0.001$ ) (Monpère *et al.*, 1990). Similares resultados se han obtenido con la asociación de diltiazem en varios estudios con 67 y 64 pacientes respectivamente con arteriopatía coronaria y sin objetivar aumento en la incidencia de efectos secundarios, sugiriendo que la combinación de diltiazem y TMZ en enfermos con angina estable y prueba de esfuerzo positiva podía influir favorablemente en los parámetros de esfuerzo, sobre todo

en el umbral isquémico y reducir el coste miocárdico del esfuerzo (Levy *et al.*, 1995; Machanda *et al.*, 1997). También su asociación con propranolol en comparación con dinitrato de isosorbide + propranolol mostró unos resultados superiores, con reducción de la angina (63% vs 31%;  $p < 0.001$ ), un menor consumo de nitroglicerina sublingual (-69% vs -35%;  $p < 0.02$ ) y aumento de la capacidad de ejercicio (Michaelides *et al.*, 1997).

Los resultados de un extenso estudio no comparativo (TRIMPOL-1) realizado en 700 hombres y mujeres con una prueba de esfuerzo positiva a pesar del tratamiento con un fármaco antianginoso convencional (nitrato de acción prolongada,  $\beta$ -bloqueantes o calcioantagonista) revelaron que los episodios anginosos y el uso de nitroglicerina disminuían significativamente tras la adición de trimetazidina durante 4 semanas (Szwed *et al.*, 1997), incluso también en pacientes diabéticos (Szwed *et al.*, 1999).

#### **4.2.3.- EVALUACIÓN EN SITUACIONES DE ISQUEMIA EXTREMA.-**

##### **4.2.3.1.- Cirugía extracorpórea (CEC).**

Pese a los considerables avances de los protocolos de cardioplejia y protección miocárdica, la ausencia de perfusión coronaria durante la CEC sigue produciendo un importante sufrimiento del miocardio con necrosis celular, como demuestra la elevación postoperatoria de los niveles de miosina, mioglobina, CK-MB y la disminución de la función ventricular izquierda.

En un estudio realizado por Fabiani (1992) sobre 19 pacientes coronarios programados para cirugía de revascularización coronaria, el pretratamiento de 3 semanas con TMZ, junto con su adición a la solución cardiopléjica, mejoró la función ventricular antes de la intervención, así como una menor elevación de los niveles postoperatorios de miosina (lo que indica una limitación del daño miocárdico), y una ausencia de modificación en los niveles de dialdehído malónico - un subproducto fundamental de la peroxidación lipídica de las membranas celulares (lo que indica una reducción de la lesión secundaria a los radicales libres), en relación con el grupo control. Estos datos sugieren que la TMZ reduce la producción de radicales libres derivados del oxígeno durante la reperfusión, pero no concuerdan con los comunicados en un estudio más extenso, aleatorizado y doble ciego, realizado en 40 pacientes evaluables sometidos a una derivación aortocoronaria. En este ensayo, los efectos de la TMZ (4 mg en bolo antes de la incisión cutánea seguido de 2,5 mg/h por vía intravenosa hasta la sexta hora del postoperatorio y  $10^{-6}$  mol/l con la solución cardiopléjica) sobre la acumulación de malodialdehído 20 minutos después del

despinzamiento no fueron significativamente diferentes de los observados con placebo (Vedrinne *et al.*, 1996).

#### **4.2.3.2.- Angioplastia coronaria (ACTP).-**

Al inflar el balón durante la angioplastia coronaria se produce una isquemia aguda y breve, comparable a una verdadera crisis de angor, que se traduce por un ascenso del segmento ST del ECG y por la aparición de un dolor torácico de tipo anginoso, proporcionando un modelo humano de oclusión coronaria aguda único para analizar los acontecimientos tempranos de la evolución de la isquemia regional.

En un estudio, a doble ciego y controlado con placebo, sobre 20 pacientes coronarios sometidos a ACTP (con obstrucciones de 60 segundos de duración), la administración intracoronaria única de TMZ (6 mg) redujo significativamente la magnitud del ascenso del segmento ST y el aumento de la amplitud de la onda T, retrasó el momento de máxima intensidad de estos signos electrocardiográficos de isquemia y disminuyó significativamente la intensidad del dolor anginoso, en relación con el grupo placebo. Dichos efectos beneficiosos fueron obtenidos sin provocar modificaciones hemodinámicas sistémicas, tales como la frecuencia cardíaca o la presión arterial, ni a través de circulación colateral (dado que las presiones de oclusión coronaria permanecieron sin alteraciones), sugiriendo un efecto citoprotector directo (Kober *et al.*, 1992).

#### **4.2.3.3.- Cardiopatía isquémica avanzada.-**

Otra demostración de que la citoprotección eficaz se mantiene en la enfermedad crónica procede de un estudio realizado sobre un grupo de 20 pacientes coronarios, sometidos a isquemia crónica, que habían desarrollado una miocardiopatía isquémica severa, no subsidiaria de revascularización miocárdica (Brottier *et al.*, 1990). La función cardíaca de estos pacientes se hallaba alterada de forma permanente, bien por un fenómeno de hibernación (miocardio viable pero insuficientemente alimentado para ser funcionante), bien por el desarrollo de fibrosis miocárdica, focos microscópicos de necrosis o infartos macroscópicos, o por una combinación de ambos. El estudio se diseñó con objeto de averiguar si la acción antiisquémica de la TMZ (60 mg/día) permitiría detener la evolución de esta temible patología.

Todos los pacientes presentaban una insuficiencia cardíaca grave con disnea en estadio III y IV de la clasificación de la NYHA. La fracción de eyección isotópica oscilaba entre el 22 y el 28% en el momento de su inclusión. Todos ellos recibieron, antes del ensayo y



durante el mismo, el tratamiento convencional de la insuficiencia cardíaca (diuréticos y/o glucósidos y/o nitratos de acción retardada). A los 6 meses de seguimiento, el grupo tratado con TMZ conservaba la función cardíaca, con volumen cardíaco y fracción de eyección isotópica estables y prevenía la escalada terapéutica de la insuficiencia cardíaca; por el contrario los parámetros del grupo placebo continuaron deteriorándose pese a reforzar el tratamiento de la insuficiencia cardíaca, con una disminución del 16% en la fracción de eyección determinada por radionúclidos y un aumento del 4% del volumen cardíaco ( $p=0.034$ ). Así mismo se objetivó una mejoría de la disnea en todos los pacientes del grupo tratado con TMZ en comparación con solo 1 de los 11 pacientes del grupo placebo ( $p<0.001$ ). Sin embargo estos resultados deben interpretarse con cautela por diversos motivos: 1) la FEVI fue mayor en el período basal en los enfermos tratados con TMZ que en los que recibieron placebo; 2) los pacientes del grupo placebo tenían más calcioantagonistas añadidos (4 frente a 0), lo cual puede haber contribuido a la reducción de la FEVI en este grupo; y 3) la variación absoluta de la FEVI en los tratados con TMZ no fue estadísticamente significativa. Por consiguiente los resultados de este ensayo no son concluyentes y deberán confirmarse en posteriores estudios bien controlados.

#### **4.2.3.4.- Infarto de miocardio.-**

En un estudio doble ciego sobre 60 pacientes con diagnóstico de infarto agudo de miocardio (IAM), la administración de TMZ conseguía una reducción de la presencia de potenciales tardíos tras el IAM sin modificar la presión sanguínea ni la frecuencia cardíaca, en comparación con el grupo control (Ozdemir *et al.*, 1999).

En el estudio EMIP-FR trial (European Myocardial Infarction Project-Free Radicals) realizado en pacientes con IAM, se compararon los efectos de la TMZ vs placebo, estratificándose según el uso o no de terapia trombolítica. El régimen terapéutico incluía la inyección IV de 40 mg de TMZ, seguida de infusión continua de 60mg/día durante 48 horas vs placebo. En el estudio principal no hubo beneficio en el análisis por intención de tratar, pero el análisis por protocolo mostró una reducción en la mortalidad hospitalaria en el grupo de pacientes que no recibió terapia trombolítica (EMIP-FR, 2000). En un subestudio sobre 306 pacientes en los que se estudió la función ventricular, hubo una reducción en el número de segmentos disquinéticos en el grupo tratado con TMZ, indicando una mejor contractilidad regional, si bien no hubo beneficios en términos de volumen ventricular o función sistólica global (Meneveau *et al.*, 1997).

También ha sido evaluada su valor como tratamiento coadyuvante en la ACTP primaria en el IAM. Un ensayo clínico aleatorizado, el estudio LIST (Limitation of infarct size by

trimetazidine) ha comparado la trimetazidina por vía intravenosa con un placebo en el contexto de la angioplastia coronaria transluminal percutánea primaria en 94 enfermos, empleando monitorización continua del segmento ST durante y después de la recanalización de la arteria del infarto. En dicho estudio la TMZ aceleró la normalización del segmento ST y pareció reducir la incidencia de exacerbación de dicho segmento. Estos resultados indican que la TMZ acelera y, posiblemente, mejora la reperfusión del miocardio, por lo cual merece nuevos estudios como tratamiento coadyuvante de la ACTP primaria (Steg *et al.*, 2001).

#### 4.2.3.5.- Ecocardiografía con dobutamina.

En un estudio aleatorizado, doble ciego y cruzado realizado en 15 pacientes con cardiopatía isquémica crónica (13 varones,  $62 \pm 8$  años) y una respuesta positiva a la ecocardiografía con dobutamina, el tratamiento con 20 mg de TMZ oral tres veces al día durante 15 días mejoró la función del ventrículo izquierdo en comparación con placebo. El fármaco redujo la media del índice de puntuación de la motilidad parietal del ventrículo izquierdo tanto en reposo (1,34 vs 1,40;  $p=0,013$ ) como durante la infusión máxima de dobutamina (1,6 vs 1,71;  $p= 0.018$ ), respecto al placebo. Así mismo la administración de TMZ también permitió utilizar mayores dosis de dobutamina (28,7 vs 22,7  $\mu\text{g}/\text{Kg}/\text{min.}$ ;  $p=0,003$ ) y una infusión más prolongada (17,9 vs 15,3 min.;  $p=0.019$ ) hasta el desarrollo de la isquemia, en comparación con el placebo. La TMZ no afectó significativamente la frecuencia cardíaca, la presión arterial sistólica ni el doble producto, tanto en reposo como durante la ecocardiografía. Todo ello puso de manifiesto una reducción de la gravedad de las alteraciones inducidas por la dobutamina por parte de la TMZ en el paciente con enfermedad coronaria crónica (LU *et al.*, 1998).

En resumen podemos decir que la TMZ ha sido probada en clínica en pacientes con isquemia cardíaca mediante estudios prospectivos controlados con placebo con distribución aleatoria y estudios comparativos contra fármacos antianginosos clásicos (dinitrato de isosorbide,  $\beta$ -bloqueantes y antagonistas del calcio). En todos estos estudios la TMZ ha dado pruebas de efectos comparables y de un efecto adicional cuando se la asocia con estos agentes, desplazando el umbral anginoso y mejorando los síntomas clínicos y los parámetros de la prueba de esfuerzo.

Sin embargo, en la clínica, es más difícil testar y detectar el efecto citoprotector de un agente. Ello es debido a: 1) es muy difícil, por no decir imposible separar los efectos moleculares de determinadas intervenciones de sus efectos hemodinámicos; y 2) están poco definidos y discutidos los *endpoints* válidos para asegurar la protección cardíaca. En la práctica, con respecto al último punto, el único *endpoint* discutido para determinar el efecto

citoprotector de un agente en el campo del infarto de miocardio es la reducción de la mortalidad y la mejoría de la función cardíaca. El efecto citoprotector de una intervención debe ser probada mediante estudios clínicos serios, metodológicamente correctos y del tamaño muestral suficientes para detectar su impacto en el pronóstico de la enfermedad. Sin embargo, incluso ante una reducción clara de la mortalidad, es difícil, si no imposible, establecer si el beneficio en el pronóstico es debido a la acción citoprotectora del agente o a otros efectos indirectos (Ferrari *et al*, 1998).

El final se complica más por el hecho de que el hallazgo del efecto citoprotector de un agente detectado a nivel experimental, no es necesariamente un buen predictor de su beneficio clínico. Claramente este fenómeno contribuye a aumentar el riesgo de fallo en los estudios clínicos. Por ello y según los resultados clínicos de la TMZ, es demasiado pronto para poder hablar de un tratamiento “milagro” por la TMZ pues éstos ensayos únicamente han demostrado que, como máximo, su efecto es similar a los antianginosos convencionales y aún no existen estudios con una amplia muestra que hayan puesto de manifiesto una mejoría de la supervivencia en los pacientes tratados con TMZ.

No podemos decir que la TMZ vaya a sustituir a los antianginosos convencionales, pero sí que puede ocupar un lugar importante en dos situaciones concretas: 1) pacientes con crisis de angina (sintomática o no) y que no se controlan con antianginosos o que éstos están contraindicados por la situación hemodinámica del paciente (disfunción ventricular, hipotensión,...) y, 2) en situación de isquemia/reperfusión aguda y brusca, como son tras ACTP, postfibrinólisis y en el mantenimiento del corazón para trasplante.

En definitiva, se puede considerar a la TMZ como un nuevo fármaco antianginoso, con un mecanismo de acción diferente no hemodinámico, que puede ser administrado solo o en asociación, para reducir la aparición de crisis anginosas y mejorar la tolerancia al esfuerzo en los pacientes con coronariopatía y angina de pecho.

Podemos concluir con las palabras de Lopaschuk publicadas en *Circulation* en 1997:

*“La optimización farmacológica del metabolismo energético cardíaco, sin provocar efectos hemodinámicos, inotrópicos o cronotrópicos negativos, puede resultar especialmente útil en el tratamiento de la cardiopatía isquémica, en particular en pacientes sintomáticos que están recibiendo ya las máximas dosis de las terapias tradicionalmente toleradas. Los datos experimentales y clínicos apoyan ahora el concepto de que inhibir la preferencia por los sustratos energéticos del metabolismo de los ácidos grasos, promoviendo el metabolismo de la glucosa, representa un enfoque eficaz para tratar el infarto agudo de miocardio y la angina inducida por el ejercicio”*(Lopaschuk y Stanley, 1997).

# ***CONCLUSIONES***

1. Cuando el miocardio es sometido a los protocolos isquémicos analizados en el presente trabajo, ya sea isquemias breves y repetidas o una isquemia única y prolongada, se objetiva una depresión de la función contráctil segmentaria durante la obstrucción coronaria, que persiste a pesar de la restauración completa del flujo coronario (“aturdimiento miocárdico”).
2. Dependiendo del modelo en el que se realiza el estudio ultraestructural, el aturdimiento miocárdico se va a relacionar o no con alteraciones en el sistema mitocondrial. En el modelo de isquemias breves y repetidas, la disfunción post-isquémica se relaciona con un aumento en el tamaño mitocondrial (“edema”), con tendencia a un deterioro de su estructura, facilitando la fusión de estos orgánulos entre sarcómeros contiguos. En el modelo de isquemia única y prolongada, el análisis mitocondrial tras 60 minutos de reperfusión no muestra diferencias notables entre el tejido isquémico y el tejido control, poniéndose de manifiesto una completa recuperación de las alteraciones mitocondriales, a pesar de persistir la disfunción contráctil.
3. La trimetazidina, administrada desde una semana antes de la aplicación de los modelos experimentales, produce una serie de alteraciones a nivel mitocondrial en la zona no sometida a isquemia en ambos protocolos, caracterizada por un ligero incremento del daño mitocondrial y un aumento en el número de fusiones mitocondriales, así como la adopción de una morfología característica, alargada y estrecha, que hemos denominado “*en bastoncillo*”.
4. Al someter a una injuria isquémica al grupo tratado con trimetazidina, se observan en el tejido miocárdico cambios significativos a nivel ultraestructural. En el protocolo de isquemias breves y repetidas se produce un aumento significativo del tamaño mitocondrial, pero manteniendo esa morfología en “*bastoncillo*” (alargada y con un eje menor más pequeño). Durante la isquemia única y prolongada de 15 minutos de duración seguida de 60 minutos de reperfusión, la mitocondria adquiere un aspecto más elipsoidal, debido a un aumento de su eje menor.
5. Paralelamente a los cambios morfológicos observados en el protocolo de isquemias breves y repetidas, se observa una tendencia hacia la mejoría en el comportamiento de la fracción de acortamiento de la zona isquémica durante las fases de reperfusión, así como un menor deterioro de la función regional al final de la experimentación, sin llegar a ser significativo respecto a la serie Placebo.

6. Por el contrario, en el modelo de isquemia única y prolongada, la no recuperación de la morfología basal (tras trimetazidina) de la mitocondria despues de la injuria isquémica, se acompaña de ausencia de efectos beneficiosos en la función regional de la zona sometida a isquemia, con un comportamiento de la fracción de acortamiento similar al grupo Placebo.
  
7. Estas modificaciones en la morfología mitocondrial y en la fracción de acortamiento se producen sin variaciones en los parámetros hemodinámicos analizados (frecuencia cardíaca, presión ventricular izquierda,  $dP/dt$  y flujo coronario basal).

# ***BIBLIOGRAFÍA***

- **Aiello E; Jbra RI, Cole WC.** Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia: The role of oxygen radical-induced no-reflow phenomenon. *Cir Res* 1995; 77: 153-162.
- **Aikawa R, Komura I, Yamazaki T, Zou Y, Kudoh S, Tanaka M et al.** Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. *J Clin Invest* 1997; 100: 1813-1821.
- **Akasaka T, Yoshikawa J, Yoshida K, Kato H, Okumachi F, Koizumi K et al.** Mechanical and electrocardiographic sequence of coronary artery occlusion: an echocardiographic study during coronary angioplasty. *J Cardiogr* 1986; 16: 819-830.
- **Alam M, Khaja F, Brymer J, Marzelli M, Goldstein S.** Echocardiographic evaluation of left ventricular function during coronary artery angioplasty. *Am J Cardiol* 1986; 57: 20-25.
- **Albertine KH, Weyrich AS, Ma XL.** Quantification of neutrophil migration following myocardial ischemic and reperfusion in cats and dogs. *J Leukocyte Biol* 1994; 55: 557-566.
- **Allen DG, Orchard CH.** Myocardial contractil function during ischemia and hypoxia. *Cir Res* 1987; 60: 153-168.
- **Allibardi S, Chierchia SL, Margonato V, Meratii G, Meri G, Dell'Antonio G, Samaja M.** Effects of trimetazidine on metabolic and functional recovery of postischemic rat hearts. *Cardiovasc Drugs Ther* 1998; 12 (6): 543-549.
- **Andrés L.** Cronificación de la disfunción segmentaria mediante repetición de procesos breves de isquemia/reperfusión. Tesis Doctoral 2001. Facultad de Medicina de Valencia.
- **Apstein CS.** Metabolic approaches in ischemic heart disease. *Eur Heart J* 1999; 1: 01-010.
- **Artigou JY, Chamiot JC, Bonnefont-Rousselot D, Salloum J, Gosgogeat Y.** Le traitement antioxydant dans l'ischémie reperfusion myocardique. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 105-109.
- **Auchsmach JA, Cavero I, Gross GJ.** Nicorandil attenuates myocardial dysfunction associated with transient ischemia by opening ATP-dependent potassium channels. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 765-771.
- **Aussedat J, Ray A, Kay L, Vendy M, Harpey C, Rossi A.** Improvement of long-term preservation of isolated arrested rat heart: beneficial effect of the antiischemic agent trimetazidine. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 128-135.
- **Basuk WI, Reimer KA, Jennings RB.** Effect of repetitive brief episodes of ischemia on cell volume, electrolytes and ultrastructure. *J Am Coll Cardiol* 1986; 8: 33-41.
- **Belcher Ph, Drake-Holland A, Hynd J, Noble NIM.** Effects of trimetazidine on in vivo coronary arterial platelet thrombosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993; 7: 149-157.
- **Bell GI, Kayano T, Buse JB, Burant CF, Takeda L, Lin D et al.** Molecular biology of mammalian glucose transporters. *Diabetes Care* 1990; 13: 198-208.
- **Bertels GL, Remme WJ, Pillay M, Schönfeld HW, Kruijssen D.** Effects of L-propionyl-carnitine on ischemia-induced myocardial dysfunction in men with angina pectoris. *Am J Cardiol* 1994; 74: 125-130.



- **Best PJM, Hasdai D, Sangioirgi G, Schwartz RS, Holmes DR, Simari RD, Lerman A.** Apoptosis. Basic concepts and implications in coronary artery disease. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 14-22.
- **Bolli R, Cannon RO, Speir E, Goldstein RE, Epstein SE.** Role of cellular proteinases in acute myocardial infarction. *J Am Coll Cardio* 1983; 68 (suppl I): 16-24.
- **Bolli R, Zhu WX, Hartley CJ, Michael LH, Repine J, Hess ML et al.** Attenuation of dysfunction in the postischemic "stunned" myocardium by dimethylthiourea. *Circulation* 1987; 76: 458-468.
- **Bolli R, Pate BS, Joroudi MO, Lai EK, McPay PB.** Demonstration of free radical generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest* 1988a; 82: 476-485.
- **Bolli R, Zhu WX, Thornby JI, Pdraig GO, Roberts R.** Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs. *Am J Physiol* 1988b; 254: H102-H114.
- **Bolli R.** Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 1990; 82: 723-728.
- **Bolli R.** Superoxide dismutase 10 years later: A drug in search of a use. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 231-233.
- **Bolli R.** Myocardial "Stunning" in man. *Circulation* 1992; 86: 1671-1691.
- **Bolling SF, Bies LE, Bove HL, Gallagher KP.** Augmenting intracellular adenosine improves myocardial recovery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 469-474.
- **Boucher F, Hearse D, Opie L.** Effects of trimetazidine on ischemic contracture in isolated perfused rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994; 24: 45-49.
- **Braasch W, Gudbjarnson S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ.** Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anaesthetized dogs. *Circ Res* 1968; 23: 429-438.
- **Braunwald E, Kloner RA.** The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.
- **Brevetti G, Perna S, Sabba C, Martone D, Condorelli M.** Propionyl-L-carnitine in intermittent claudication: double-blind, placebo-controlled, dose titration, multicenter study. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1411-1416.
- **Broderick TL, Quinney HA, Barker CC, Lopaschuk GD.** Beneficial effects of carnitine on mechanical recovery of rat hearts reperfused after a transient period of global ischemia is accompanied by a stimulation of glucose oxidation. *Circulation* 1993; 87: 972-980.
- **a) Bromont P.** Determinación de la DL50 del diclorhidrato de trimetazidina en varias especies animales. *Biologia Servier*. TO 501601001.
- **b) Bromont P.** Investigación de la dosis máxima tolerada de diclorhidrato de trimetazidina en la rata Wistar. *Biologia Servier*. TO 501601002.
- **c) Bromont P.** Estudio del diclorhidrato de trimetazidina en la reproducción y la embriogénesis en la rata Wistar en 3 generaciones. *Biologia Servier*. TE 501601004.

- **Brottier L, Barat JL, Combe C, Boussens B, Bonnet J, Bricaud H.** Therapeutic value of a cardioprotective agent in patients with severe ischemic cardiomyopathy. *Eur Heart J* 1990; 11: 207-212.
- **Buda AJ, Lefkowitz CA, Gallagher KP.** Augmentation of regional function in nonischemic myocardium during coronary occlusion measured with two-dimensional echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 175-180.
- **Bugge-Asperheim B, Leraand S, Kill R.** Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; 24: 361-371.
- **Burton KP.** Evidence of direct toxic effects of free radicals on the myocardium. *Free Radic Biol Med* 1988; 4: 15-24.
- **Cabadés A, Cosín J, Hernandiz A, Ferrando C.** Coronary blood flow and reperfusion arrhythmias. *New Trends Arrhyt* 1985; 3: 229-237.
- **Camacho SA, Lanzer P, Toy BJ, Gober J, Valenza M, Botvinick EH *et al.*** In vivo alterations of high-energy phosphates and intracellular pH during reversible ischemia in pigs: a <sup>31</sup>P magnetic resonance spectroscopy study. *Am Heart J* 1988; 116: 701-708.
- **Camilleri JP.** Effects of trimetazidine on experimental reperfused infarction in the rat. *Eur Heart J* 1988; 9 (suppl 1): 217.
- **Campbell B, Adams J, Shin YK, Lefler AM.** Cardioprotective effects of a novel proteasome inhibitor following ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31 (2): 467-476.
- **Capdevila C, Portolés M, Hernandiz A, Pallarés V, Cosín J.** La troponina T como posible marcador del daño miocárdico menor. Su aplicación en el miocardio aturdido y en la isquemia silente. *Rev Esp Cardiol* 2001; 54: 580-591.
- **Capone RJ, Most AJ.** Myocardial hemorrhage after coronary reperfusion in pigs. *Am J Cardiol* 1978; 41: 259-266.
- **Carafoli E, Penniston JT.** La señal del calcio. *Investigación y Ciencia* 1986; 112: 28-37.
- **Cargnoni A, Pasini E, Ceconi C, Curello S, Ferrari R.** Insight into cytoprotection with metabolic agents. *Eur Heart J* 1999; 1: 040-048.
- **Catella-Lawson F, Fitzgerald GA.** Confusion in reperfusion. Problems in the clinical development of antithrombotic drugs. *Circulation* 1997; 95 (4): 793-795.
- **Celermajer DS.** Endothelial dysfunction: Does it matter? It is reversible?. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30 (2): 325-333.
- **Chandrashekar B, Mitchell D, Colston J, Freeman G.** Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, Interleukin-6 receptor, and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1999a; 99: 427-433.
- **Chandrashekhar Y, Prahash AJ, Sen S, Gupta S, Anand IS.** Cardiomyocytes from hearts with left ventricular dysfunction after ischemia-reperfusion do not manifest contractile abnormalities. *J Am Coll Cardiol* 1999b; 34 (2): 594-602.

- **Charlat ML, O'Neill PG, Hartley CJ, Roberts R, Bolli R.** Prolonged abnormalities of left ventricular diastolic wall thinning in the "stunned" myocardium in conscious dogs: Time course and relation to systolic function. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 185-194.
- **Chen C, Morishige N, Masuda M, Lin W, Wieland W, Thone F et al.** R56865, a Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>-overload inhibitor, reduces myocardial ischemia-reperfusion injury in blood-perfused rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 1445-1459.
- **Chen G, Askenase AD, Chen K, Horowitz LN, Segal BL.** The contraction of stunned myocardium: isovolumetric bulging and wasted ejection shortening in dog heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 115-125.
- **Chierchia S, Lazzari M, Freedman B, Brunelli C, Maseri A.** Impairment of myocardial perfusion and function during painless myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 924-929.
- **Cinca J, Janse MJ, Morena H, Candell J, Valle V, Durrer D.** Mechanism and time course of early electrical changes during acute coronary artery occlusion. An attempt to correlate the early ECG changes in man to the cellular electrophysiology in the pig. *Chest* 1980; 77: 499-505.
- **Cinca J.** Bases fisiopatológicas de las arritmias de la isquemia y reperfusión coronaria. *Rev Esp Cardiol* 1988; 41: 244-253.
- **Cocco G, Rousseau MF, Bouvy T, Cheron P, Williams G, Detry JM et al.** Effects of a new metabolic modulator, ranolazine, on exercise tolerance in angina pectoris patients treated with beta-blockers or diltiazem. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: 131-138.
- **Cohn PF.** Silent myocardial ischemia: classification, prevalence and prognosis. *Am J Med* 1985; 79 (suppl 3A): 2-7.
- **Cole WC, McPherson CD, Sontag D.** ATP-regulated K<sup>+</sup> channels protect the myocardium against ischemia reperfusion damage. *Circ Res* 1991; 69: 571-581.
- **Coronel R, Fiolet JWT, Wilms-Schopmen FJG, Schpapherder AFM, Johnson TA, Gette LS.** Distribution of extracellular potassium and its relation to electrophysiologic changes during acute myocardial ischemia in the isolated perfused porcine heart. *Circulation* 1988; 77: 1125-1138.
- **Cosín J, Rivera M, Solaz J, Hernandiz A, Andres F.** Efectos del captopril en la prevención de las alteraciones mecánicas miocárdicas inducidas por la isquemia aguda. *Rev Lat Cardiol* 1990; 11; 46-53.
- **Cosín J, Rivera M, Hernandiz A, Andres F.** Effects of captopril on regional segment motion during acute coronary occlusion. *Clin Cardiol* 1992; 15: 411-416.
- **Cruz C, Zaoui A, Ayoub S.** Alterations des myocytes isolés des ventricles de coeur de rat adulte: protection par la trimetazidine. *Concous Med* 1987; 36: 3470-3475.
- **Crystal RG, Ramon JR.** GSH system. Glutation: eje de la defensa antioxidante. *Excerpta Medica* 1992: 5-6.
- **Dalla-Volta S, Maraglino G, Della-Valentina P, Viena P, Desideri A.** Comparaison of trimetazidine with nifedipine in effort angina: a double-blind, crossover study. *Cardiovasc Drug Ther* 1990; 4: 853-860.
- **Deedwania PC, Carbajal EV.** Silent ischemia during daily life is an independent predictor of mortality in stable angina. *Circulation* 1990; 81: 748-756.

- **De Greave J, Campbell B.** The plasma, urinary and faecal kinetics of radioactivity and unchanged drug following oral administration of <sup>14</sup>C-trimetazidine to human volunteers. Internal report 1985.
- **De Scheerder IK, Van der kraay AM, Lamers JMJ, Koster JF, De Jong JF, Serruys PW.** Myocardial malondialdehyde and uric release after short-lasting coronary occlusions during coronary angioplasty: potential mechanisms for free radical generation. *Am J Cardiol* 1991; 68 : 392-395.
- **Detry JM, Sellier P, Pennaforte S, Cokkinos D, Dargie H, Mathes P *et al.*** Trimetazidine: a new concept in the treatment of angina. Comparison with propranolol in patients with stable angina. *Brit J Clin Pharmacol* 1994; 37: 279-288.
- **Detry JM, Leclercq P (On behalf of the trimetazidine European Multicenter Study Group).** Trimetazidine European Multicenter Study versus propranolol in stable angina pectoris: contribution of holter electrocardiographic ambulatory monitoring. *Am J Cardiol* 1995; 76: 8B-11B.
- **Dhalla N, Elmosechi A, Hata T, Makino N.** Status of myocardial antioxidants in ischemic-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47: 446-456.
- **Diaz R, Paolasso EC, Piegas LS, Tajer CD, Moreno MG, Corvalan R *et al*, on behalf of the ECLA (Estudios Cardiológicos Latinoamérica) Collaborative Group.** Metabolic modulation of acute myocardial infarction. The ECLA Glucose-Insulin-Potassium Pilot Trial. *Circulation* 1998; 98: 2227-2234.
- **DiCarli MF, Prcevski P, Singh TP, Janisse J, Ager J, Muzik O, Vander Heide R.** Myocardial blood flow, function and metabolism in repetitive stunning. *J Nucl Med* 2000; 41 (7): 1227-1234.
- **Didier JP.** Les effets de la trimetazidine sur le coeur isolé perfusé de rat en hypoxie: étude hemodynamique et histologique. *Gaz Med Fr* 1984; 91: 28-34.
- **Diez J.** Apoptosis y enfermedades cardíacas. En Diez J, Fortuño M, Gonzalez A, Ravassa S, ed. *Apoptosis y enfermedades cardiovasculares*. Madrid. Ediciones Ergon 1999; 73-96.
- **Drake-Holland A, Belcher P, Hynd J, Noble MIM.** Infarct size in rabbits: a modified method illustrated by the effects of propranolol and trimetazidine. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 250-258.
- **Eddy LJ, Stewart JR, Jones HP, Engerson TD, McCord JM, Downey JM.** Free radical producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts. *Am J Physiol* 1987; 253: 709-721.
- **El Banani H, Bernard M, Cozzone P, James F, Feuvray D.** Ionic and metabolic imbalance as potential factors of ischemia reperfusion injury. *Am J Cardiol* 1998; 82: 25K-29K.
- **Ellis SG, Henschke CI, Sandor T, Wynne J, Braunwald E, Kloner RA.** Time course of functional and biochemical recovery of myocardium salvaged by reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 1047-1055.
- **EMIP-FR Study Group.** Effect of 48 h. intravenous trimetazidine on short-and-long-term outcomes of patients with acute myocardial infarction with and without thrombolytic therapy. A double-blind, placebo-controlled, randomized trial. The EMIP-FR Group. *European Myocardial Infarction Project-Free Radicals*. *Eur Heart J* 2000; 18: 1537-46.
- **Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD, Peterson MA, Schmid-Schonbeim GW.** Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 1986; 251: H314-H322.

- **Fabiani JN, Emerit I, Massonet-Castel S, Paris M, Chevalier P, Sevara V et al.** Cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery graft surgery. *J Cardiovasc Surg* 1992; 33 (4): 486-491.
- **Fantini E, Demaison L, Sentex E, Grynberg A, Athias P.** Some biochemical aspects of the protective effect of trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Moll Cell Cardiol* 1994; 26: 949-958.
- **Farber NE, Pieper G, Gross G.** Regional differences in postischemic recovery in the stunned canine myocardium. *Am Heart J* 1987; 114: 1086-1095.
- **Farber NE, Pieper GM, Thomas JP, Gross GJ.** Beneficial effects of iloprost in the stunned canine myocardium. *Cir Res* 1988; 62: 204-215.
- **Farber NE, Gross GJ.** Prostaglandin E1 attenuates postischemic contractile dysfunction after brief coronary occlusion and reperfusion. *Am Heart J* 1989; 118: 17-24.
- **Ferez S, De la Peña E, Marquez M, Eid G.** Daño miocárdico por reperfusión: su impacto en la clínica. Parte I. *Arch Inst Cardiol Mex* 1998; 68: 431-437.
- **Ferrari R.** The role of free radicals in ischaemic myocardium. *Br J Clin Pract* 1990; 44: 301-305.
- **Ferrari R.** Metabolismo y función del miocardio. Roma: Biblioteca Científica/Fundación Sigma Tau, 1992.
- **Ferrari R.** The role of mitochondria in ischemic heart disease. *J Cardiovasc Pharmacol* 1996; 38 (suppl 1): S1-S10.
- **Ferrari R, Pepi P, Ferrari F, Nesta F, Benigno M, Visioli O.** Metabolic derangement in ischemic heart disease and its therapeutic control. *Am J Cardiol* 1998; 82: 2K-13K.
- **Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser RR, Rothbaum DA, Burwell LR et al.** Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89: 1982-1991.
- **Flameng W, Andres J, Fernandez P, Matheussen M, Van Belle H.** Mitochondrial function in myocardial stunning. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1-11.
- **Fliss H, Gattinger D.** Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996; 79: 949-956.
- **Folts J.** An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; 83 (suppl IV): 3-14.
- **Forman MB, Velasco CE, Jackson EK.** Adenosine attenuates reperfusion injury following regional myocardial ischemia. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 9-17.
- **Frank JS, Brady AJ, Fransworth S, Motting G.** Ultrastructure and function of myocytes after calcium depletion and repletion. *Am J Physiol* 1986; 250: H256-H275.
- **Froelicher VF, Yanowitz FG, Thompson AJ.** The correlation of coronary angiography and the electrocardiographic response to maximal treadmill testing in 76 asymptomatic men. *Circulation* 1974; 48: 597.

- **Fujita M, McKown MD, McKown DP, Hartley JW, Franklin D.** Evaluation of coronary collateral development by regional myocardial function and reactive hyperemia. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 377-384.
- **Fujita M, Mikuniya A, McKown DP, McKwon MD, Franklin D.** Regional myocardial volume alterations induced by brief repeated coronary occlusion in conscious dogs. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 1048-1053.
- **Galinier M, Bounhoure JP.** Actions des inhibiteurs de l'enzyme de conversion sur l'ischémie myocardique et les lésions de reperfusion. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 99-104.
- **Gall SA, Maier GW, Glower DD, Gaynor JW, Cobb FR, Sabiston DC, Rankin JS.** Recovery of myocardial function after repetitive episodes of reversible ischemia. *Am J Physiol* 1993; 264: 1130-1138.
- **Gallagher KP, Okasada G, Hess OM, Koziol JA, Kemper WS, Ross J Jr.** Subepicardial segmental function during coronary stenosis and the rol of myocardial fiber orientation. *Cir Res* 1982; 50: 352-359.
- **García ML, Sanchez CJ.** Revalidando los criterios de reperfusión no invasivos en pacientes con IAM sometidos a trombolisis farmacológica. *Arch Inst Cardiol Mex* 1993; 63: 463-468.
- **García-Dorado D, Fernandez F.** Mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y la reperfusión miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 1988; 41: 109-118.
- **Gaspardone A, Shine KI, Seabrooke SR, Poole-Wilson PA.** Potassium loss from rabbit myocardium during hypoxia: evidence for passive efflux linked to anion extrusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986; 18: 389-399.
- **Geft IL, Fishbein ML, Ninomiya K, Hashida J, Chaux E, Yano J et al.** Intermittent brief periods of ischemia have acumulative effect and may cause myocardial necrosis. *Circulation* 1982; 66.
- **Goto Y, Igarashi Y, Yamada O, Hiramori K, Suga H.** Hyperkinesis without the Frank-Starling mechanism in a nonischemic regions of acutely ischemic excised canine heart. *Circulation* 1988; 77: 468-477.
- **Gottlieb RA, Burlenson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL.** Reperfusion injury induces apoptosís in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-1628.
- **Gradinac S, Coleman GM, Taegtmeier H, Sweeney MS, Frazier OH.** Improved cardiac function with glucose-insulin-potassium after aortocoronary bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1989; 48: 484-489.
- **Greenfield RA, Swain JL.** Description of myofibrillar energy use: dual mechanism that may contribute to postischemic dysfunction in stunned myocardium. *Circ Res* 1987; 60: 283-289.
- **Gressin V, Louvard Y, Gorgels APM, Pezzano M, Lardoux H.** Arrhythmies de reperfusion. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 69-77.
- **Greve G, Rotevatn S, Svendby K, Grong K.** Early morphologic changes in cat heart muscle cells after acute coronary artery occlusion. *Am J Pathol* 1990; 136: 237-283.
- **Gross GJ, Auchampach JA.** Blockage of ATP-sensitive potassium channels prevents myocardial preconditioning in dogs. *Circ Res* 1992a; 70: 223-233.

- **Gross GJ, O'Rourke ST, Pell LR, Warltier DC.** Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occlusions: role of oxygen radicals. *Am J Physiol* 1992b; 263: 1703-1709.
- **Guarnieri TJ.** Relationship between intracellular calcium activity and intracellular sodium activity. *Circulation* 1985; 72 (supl III): 372.
- **Guarnieri C, Muscari C.** Beneficial effects of trimetazidine on mitochondrial function and superoxide production in the cardiac muscle of monocrotalin-treated rats. *Biochem Pharmacol* 1988; 37 (24): 4685-4688.
- **Guarnieri C, Finelli C, Zini M, Muscari C.** Effects of trimetazidine on the calcium transport and oxidative phosphorylation of isolated rat heart mitochondria. *Basic Res Cardiol* 1997; 92: 90-95.
- **Hall JL, Henderson J, Hernandez LA, Kellerman LA, Stanley WC.** Hyperglucemia results in an increase in myocardial interstitial glucose and glucose uptake during ischemia. *Metabolism* 1996; 45: 542-549.
- **Han J.** Mechanism of ventricular arrhythmias during coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1969; 24: 800.
- **Hanich RF, Levine JH, Prood C, Weiss JL, Callands DJ, Spear JF, Moore EN.** Electrophysiologic recovery in postischemic stunned myocardium despite persistent systolic dysfunction. *Am Heart J* 1993; 125: 23-32.
- **Harris AS.** Potassium and experimental coronary occlusion. *Am Heart* 1966; 71: 797-802.
- **Hattori S, Weintraub WS, Agarwal JB, Bodenheimer MM, Banka VS, Helfant RH.** Contrasting ischemic contraction patterns by zone and layer in canine myocardium. *Am J Physiol* 1982; 243: 852-855.
- **Haunstetter A, Izumo S.** Apoptosis. Basic mechanisms and implications for cardiovascular disease. *Circ Res* 1998; 82: 1111-1129.
- **Hearse DJ.** Cellular damage during myocardial ischemia. En: Hearse DJ, ed. *Enzymes in cardiology diagnosis and research*. Chichester: John Wiley and Sons, 1980; 1.
- **Hearse DJ, Tosaki A.** Free radicals and calcium: simultaneous interacting trigger as determinants of vulnerability to reperfusion-induced arrhythmias in the rat heart. *J Moll Cell Cardiol* 1988; 20: 213-223.
- **Heggtveit A.** Contributions of electron microscopy to the study of myocardial ischaemia. *Bull Wld Hlth Org* 1969; 41: 865-872.
- **Henrichs KJ, Matsuoka H, Schaper J.** Influence of repetitive coronary occlusions on myocardial adenine nucleosides, high energy phosphates and ultrastructure. *Basic Res Cardiol* 1987; 82: 557-565.
- **Herdson PB, Sommers HM, Jennings RB.** A comparative study of the fine structure of normal and ischemic dog myocardium with special reference to early changes following temporary occlusion of a coronary artery. *Am J Pathol* 1965; 46: 367-386.
- **Herzog WR, Califf RM.** Efforts to prevent reperfusion injury. En: Califf RM, Mark DB, Wagner GS, eds. *Acute coronary care*. 2<sup>a</sup> ed. St. Louis: Miss, 1995; 377-389.

- **Hess ML, Okabe E, Poland J, Werner M, Stewart JR, Greenfield LJ.** Glucose, insulin, potassium protection during the course of hypothermic global ischemia and reperfusion: a new proposed mechanism by the scavenging of free radicals. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5: 35-43.
- **Hess ML, Manson NH.** 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: 969-985.
- **Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie J, Maroko PR, Vatner SF.** Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56: 978-985.
- **Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P, Leusen F, Fishbein MC, Vatner SF.** Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusion. *Am J Physiol* 1978; 234: H653-H659.
- **Higginsol I, Tang A, Knoll G, Calvin J.** Effect of intracoronary diltiazem on infarct size and regional function in the ischemic reperfused canine heart. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 868-875.
- **Hjalmarson A.** Effects of betablockage on sudden cardiac death during acute myocardial infarction and the post infarction period. *Am J Cardiol* 1997; 80: 35J-39J.
- **Holly TA, Drincic A, Byun Y, Nakamura S, Harris K, Kloche FJ et al.** Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31 (9): 1709-1715.
- **Homans DC, Sublett E, DAI XZ, Bache RJ.** Persistence of regional left ventricular dysfunction after exercise-induced myocardial ischemia. *J Clin Invest* 1986; 77: 66-73.
- **Hoshida S, Yamashita N, Kawahara K, Kuzuya T, Hori M.** Amelioration by quinapril of myocardial infarction induced by coronary occlusion/reperfusion in a rabbit model of atherosclerosis. *Circulation* 1999; 99: 434-440.
- **Iliceto S, Scrutinio D, Bruzzi P, D'Ambrosio G, Boni L, Di Biase M et al.** Effects of L-carnitine administration on left ventricular remodeling after acute anterior myocardial infarction: the L-carnitine ecocardiografia digitalizzata infarto miocardico (CEDIM) trial. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 380-387.
- **Illes RW, Silverman NA, Krukenkamp IB, Del Nido PJ, Levitsky S.** Amelioration of postischemic stunning by desferoxamine blood cardioplegia. *Circulation* 1989; 80 (Suppl III): III30-III35.
- **Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K, Yoshioka J, Yamaguchi H, Nishimura T.** Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res* 1999; 84 (12): 1401-1406.
- **Inauen ME, Granger DN, Meininger CJ, Schelling ME, Granger HJ, Kviety PR.** Anoxia-reoxygenation-induced, neutrophil-mediated endothelial cell injury: Role of elastase. *Am J Physiol* 1990; 28: H925-H931.
- **Ito BR, Tate H, Kobayashi M, Schaper W.** Rerillar energy use: dual mechanism that may contribute to postischemic dysfunction in stunned irreversible injured, postischemic canine myocardium retains normal contractile reserve. *Cir Res* 1987; 61: 834-846.



- **Ito Y, Imai S, Ui G, Nakanu M, Imai K, Kamiyama H *et al.*** A Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange inhibitor (SM-20550) protects from microvascular deterioration and myocardial injury after reperfusion. *Eur J Pharmacol* 1999; 374 (3): 355-366.
- **Jay D, Zamorano R, Cuellar A, Muñoz E, Gleason R.** Estudio in vitro del mecanismo por el cual el captopril atenua el daño miocárdico por perfusión. *Arch Inst Cardiol Mex* 1991; 61: 303-307.
- **Jennings RB.** Myocardial ischemia observations, definitions and speculations. *J Mol Cell Cardiol* 1970; 1: 345-349.
- **Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergern Ch Jr, Reimer KA.** Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites and ultrastructure. *Circ Res* 1985; 56: 262-278.
- **Jennings RB, Hawkins HK, Loewe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA.** Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Cardiol* 1987; 92: 187-214.
- **Jeroudi MO, Triana FJ, Patel BS, Bolli R.** Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning". *Am J Physiol* 1990; 259: H889-H901.
- **Kajstura J, Liu Y, Baldini A, Boashen L.** Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *J Am Coll Cardiol* 1996; 27: 521<sup>a</sup>.
- **Kalaycioglu S, Sinci V, Imren Y, Oz E.** Metoprolol prevents ischemia-reperfusion injury by reducing lipid peroxidation. *Jpn Circ J* 1999; 63: 718-721.
- **Kantor P, Lucien A, Kozack R, Lopaschuk G.** The antianginal drug trimetazidine shifts cardiac energy metabolism from fatty acid oxidation to glucose oxidation by inhibiting mitochondrial long-chain 3-Ketoacyl coenzyme A thiolase. *Circ Res* 2000; 86: 580-588.
- **Kaplinsky E, Ogawa S, Michelson EL, Dreifus LS.** Instantaneous and delayed ventricular arrhythmias after reperfusion of acutely ischemic myocardium: evidence for multiple mechanisms. *Circulation* 1981; 63: 333-340.
- **Karmazin M.** The sodium-hydrogen exchange system in the heart: Its role in ischemic and reperfusion injury and therapeutic implications. *Can J Cardiol* 1996; 12 (10): 1074-1082.
- **Katz AM, Hecht HH.** The early pump failure of the ischemic heart. *Am J Med* 1969; 47: 497.
- **Katz AM.** *Physiology of the heart.* New York. Raven Press. 1977: 35-50.
- **Katz AM, Reuter H.** Cellular calcium and cell death. *Am J Cardiol* 1979; 44: 188-190.
- **Kawabata H, Sugiyama K, Katori R.** Effect of acetylsalicylic acid on metabolism and contractility in the ischemic reperfused heart. *Jpn Circ J* 1996; 60: 961-971.
- **Kay L, Finelu C, Aussedat J, Guarnieri C, Rossi A.** Improvement of long-term preservation of the isolated arrested rat heart by trimetazidine: effects on the energy state and mitochondrial function. *Am J Cardiol* 1995; 76: 45B-49B.
- **Kennedy JA, Horowitz JD.** Effect of trimetazidine on carnitine palmitoyltransferase-1 in the rat heart. *Cardiovas Drugs Ther* 1998; 12 (4): 359-363.

- **Kerber RE, Marcus ML, Wilson R, Ehrhardt J, Abboud FM.** Effects of acute coronary occlusion on the motion and perfusion of the normal and ischemic interventricular septum: an experimental echocardiographic study. *Circulation* 1976; 54: 828-835.
- **Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wideranging implication in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- **Khales H, Hellige G, Hunneman DH, Mezger VA, Bretschneider HJ.** Influence of myocardial substrate utilization on the oxygen consumption of the heart. *Clin Cardiol* 1982; 5: 286-293.
- **Khaper N, Rigatto C, Seneviratne C, Li T, Singal PK.** Chronic treatment with propranolol induces antioxidant changes and protects against ischemia-reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 3335-3344.
- **Klein HH, Nebendahl K, Schubote M, Kreuzer H.** Intracoronary hyperosmotic manitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol* 1985; 80: 251-259.
- **Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB, Reimer KA.** The no-flow phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 1974; 54: 1496-1508.
- **Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E.** Studies of experimental coronary artery reperfusion: Effect of infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983; 68 (suppl I): I8-I15.
- **Kloner RA, Kirshenbaum J, Lange R, Antman EM, Braunwald E.** Experimental and clinical observations on the efficacy of esmolol in myocardial ischemia. *Am J Cardiol* 1985; 56: 40F.
- **Kloner RA, Przyklenk K.** Progress in cardioproteccion: the role of calcium antagonists. *Am J Cardiol* 1990; 66: 2H-9H.
- **Knight CH, Fox K.** From antianginal drugs to myocardial cytoprotective agents. *Am J Cardiol* 1995; 76: 4B-7B.
- **Kober G, Buck T, Sievert H, Vallbracht C.** Myocardial protection during percutaneous transluminal coronary angioplasty: effect of trimetazidine. *Eur Heart J* 1992; 13: 1109-1115.
- **Koning NMG, Krams E, Xiao CS, Van Meegeen JR, Bezstarosti K, Lamers JMJ, Verdouw PD.** Intracoronary trimetazidine does not improves recovery of regional function in a porcine model of repeated ischaemia. *Cardiovasc Drugs Ther* 1993; 7: 801-807.
- **Kukielka GL, Smith CW, Manning AM, Youker KA, Michael LH, Entman ML.** Induction of interleukin-6 synthesis in the myocardium. Potential role in postreperfusion inflammatory injury. *Circulation* 1995; 92 (7): 1866-1875.
- **Kukreka R, Kontos H, Hess M.** Captopril and enalaprilat do not scavenge the superoxide anion. *Am J Cardiol* 1990; 65: 24I-27I.
- **Lange R, Ware J, Kloner RA.** Absence of a cumulative deterioration of regional function during three repeated 5 or 15 minute coronary occlusions. *Circulation* 1984; 69:400-408.
- **Lavallee M, Cox D, Patrick TA, Vatner SF.** Salvage of myocardial function by coronary artery reperfusion 1, 2 and 3 hours after occlusion in concious dogs. *Circ Res* 1983; 53: 235-247.
- **Lavanchy N, Martin J, Rossi A.** Anti-ischemic effects of trimetazidine: <sup>31</sup>P-NMR spectroscopy in the isolated rat heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987; 286: 97-110.

- **Lazar HL, Philippides G, Fitzgerald C, Lancaster D, Shemin RJ, Apstein C.** Glucose-insulin-potassium solutions enhance recovery after urgent coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1997; 113: 354-362.
- **Lee J, Allen D.** Changes in intracellular free calcium concentration during long exposures to simulated ischemia in isolated mammalian ventricular muscle. *Circ Res* 1992; 71: 58-69.
- **Lefer AM, Campbell B, Shin YK, Scalia R, Hayward R, Lefer DJ.** Simvastatin preserves the ischemic-reperfused myocardium in normocholesterolemic rat hearts. *Circulation* 1999; 100 (2): 178-184.
- **Lerch R.** Oxidative substrate metabolism during postischemic reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 525-544.
- **Leris J, Boucher F.** Rationale for trimetazidine administration in myocardial ischaemia-reperfusion syndrome. *Eur Heart J* 1993; 14: 34-40.
- **Levine JH, Moore EN, Weisman HF, Kadish AH, Becker LC, Spear JF.** Depression of action potential characteristics and a decreased space constant are present in postischemic, reperfused myocardium. *J Clin Invest* 1987; 79: 107-116.
- **Levy RD, Shapiro LM, Wright C, Morkus L, Fox KM.** Haemodynamic response to myocardial ischemia during unrestricted activity, exercise testing and atrial pacing assessed by ambulatory pulmonary artery pressure monitoring. *Br Heart J* 1986; 12-18.
- **Levy S, for the Group of South of France Investigators.** Combination therapy of trimetazidine with diltiazem in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 76: 12B-16B.
- **Lièvre M, Boissel JP.** Antagonistes calciques et ischemie ou ischemie/reperfusion myocardiques. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 91-98.
- **Liedtke JA, DeMaison L, Mellis SH.** Effects of L-carnitine on mechanical recovery during reflow in intact hearts. *Am J Physiol* 1988; 255: H169-H176.
- **Liu B, Clanachan AS, Schulz R, Lopaschuk GD.** Cardiac efficiency is improved following ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ Res* 1996; 79: 940-948.
- **Long X, Crow MT, Sollot SJ, O'Neill L, Menees DS, DeLourdes M *et al.*** Enhanced expression of p53 and apoptosis induced by blockade of the vacuolar proton ATPase in cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1998; 101: 1453-1461.
- **Lopaschuk GD, Stanley WC.** Glucose metabolism in the ischemic heart. *Circulation* 1997; 95: 313-315.
- **Lopaschuk GD.** Treating ischemia heart disease by pharmacologically improving cardiac energy metabolism. *Am J Cardiol* 1998; 82: 14K-17K.
- **Lopaschuk GD, Kozak R.** Trimetazidine inhibits fatty acid oxidation in the heart. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: A112.
- **Lopaschuk GD.** Optimizing cardiac energy metabolism: a new approach to treating ischaemic heart disease. *Eur Heart J* 1999; 1: 032-039.
- **Lu C, Dabrowski P, Fragasso G, Chierchia SL.** Effects of trimetazidine on ischemic left ventricular dysfunction in patients with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1998; 1: 82: 898-900.

- **Lu L, Gunda-Smith Z, Woessner JF, Ursell PC, Nissen T, Galardy RE *et al.*** Matrix metalloproteinases and collagen ultrastructure in moderate myocardial ischemia and reperfusion in vivo. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 27: H601-H609.
- **Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TI, Wayne RR, Mudge GH, Alexander W *et al.*** Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med* 1986; 315 (17): 1046-1051.
- **Lüscher TF, Wenzel RR, Noll G.** Local regulation of the coronary circulation in health and disease: role of nitric oxide and endothelin. *Eur Heart J* 1995; 16 (suppl C): 51-58.
- **Luss H, Meissner A, Role N, Van Aken H, Boknik P, Kirchhefer U *et al.*** Biochemical mechanism of stunning in conscious dogs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 279 (1): H176-184.
- **Ma X-L, Lefer D, Lefer A, Rothlein R.** Cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992; 86: 937-946.
- **Malmberg K, Ryden L, Efendil S, Herlit J, Nicol P, Waldenstrom A *et al.*** Randomized trial of insulin-glucose followed by subcutaneous insulin treatment in diabetic patients with acute myocardial infarction (DIGAMI study): Effects on mortality at 1 year. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26 (1): 57-65.
- **Manchanda SC, Krishnaswami S.** Combination treatment with trimetazidine and diltiazem in stable angina pectoris. *Heart* 1997; 78: 353-357.
- **Marban E.** Myocardial stunning and hibernation. *Circulation* 1991; 83: 681-688.
- **Maridonneau-Parini I, Harpey C.** Effect of trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells. *Br J Clin Pharmacol* 1985; 20 (2): 148-151.
- **Marsch SC, Dalmas S, Philbin DM, Ryder WA, Foex P.** Myocardial ischemia and reperfusion are associated with an increased stiffness of remote non ischemic myocardium. *Anesth Analg* 1996; 82: 695-701.
- **Marti S, Pallarés V, Capdevila C, Hernandiz A, Portolés M, Cosín J.** Precondicionamiento isquémico. ¿Es siempre un fenomeno beneficioso?. *Rev Esp Cardiol* 1999; 52: 429-436.
- **Maseri A, Chierchia S, Davies G, Glazier J.** Mechanisms of ischemic cardiac pain silent myocardial ischemia. *Am J Med* 1985; 79 (suppl 3A): 7-11.
- **Matoba S, Tatsumi T, Keira N, Kawahara A, Akashi K, Kobara M *et al.*** Cardioprotective effect of angiotensin-converting enzyme inhibition against hypoxia/reoxygenation injury in cultured rat cardiac myocytes. *Circulation* 1999; 99: 817-822.
- **Matre K, Hexeberg E, Grong K, Lekuen J.** Local myocardial function following coronary occlusion in cats. Effect on non-ischaemic regions. *Clin Physiol* 1987; 7: 511-523.
- **Maupoil V, Rochette L, Tabard A, Clauser P, Harpey C.** Evolution of free radical formation during low-flow ischemia and reperfusion in isolated rat heart. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; 4: 791-796.
- **Maupoil V, Chaillot B, Brunotte F, Rochette L.** Identification et evaluation des radicaux libres dans la sequence ischémie-reperfusion cardiaque. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 63-68.

- **McCord JM.** Are free radicals a major culprit? En: Hearse DJ, Yellon DM, eds. Therapeutic approaches to myocardial infarct size reduction. Nueva York: Raven Press, 1984; 209.
- **McCord JM.** OFR, a link between reperfusion injury and inflammation. Federation Proc 1987; 46: 2402-2406.
- **McCormack JG, Barr RL, Wolff AA, Lopaschuk GD.** Ranolazine stimulates glucose oxidation in normoxic, ischemic and reperfused ischemic rat hearts. Circulation 1996; 93: 135-142.
- **McVeigh JJ, Lopaschuk GD.** Dichloroacetate stimulation of glucose oxidation improves recovery of ischemic rat hearts. Am J Physiol 1989; 259: H1079-H1085.
- **Meehan AG, Higgins AJ.** Oleate plus oxfenicine improves functional recovery assessed via an intraventricular balloon in ischemic reperfused rat hearts. Ann NY Acad Sci 1994; 723: 343-344.
- **Menasche P, Grousset C, Movas G, Piwnica.** A promising approach for improving the recovery of heart transplants. Prevention of free radical injury through iron chelation by deferoxamine. J Thorac Cardiovasc Surg 1990; 100: 13-21.
- **Meneveau N, Khalife K, Louis J.** Free radicals, thrombolytic therapy and myocardial infarction: results of the EMIP-FR angiography substudy. Eur Heart J 1997; 18:171.
- **Meng H, Pierce GN.** Involvement of sodium in the protective effect of 5-(N,N-dimethyl)-amiloride on ischemia-reperfusion injury in isolated rat ventricular wall. J Pharmacol Exp Ther 1991; 256: 1094 -1100.
- **Meng H, Maddaford TG, Pierce GN.** Effect of amiloride and selected analogues on postischemic recovery of cardiac contractile function. Am J Physiol 1993; 264: H1813-H1835.
- **Michaelides AP, Vyssoulis K, Dimopoulos K.** Antianginal efficacy of the combination of trimetazidine-propranolol compared with isosorbide dinitrate-propranolol in patients with stable angina. Clin Drug Invest 1997; 13: 8-14.
- **Mitani A, Kinoshita K, Fukamachi K, Sakamoto M, Kurisu K, Tsuruhara Y et al.** Effects of glibenclamide and nicorandil on cardiac function during ischemia and reperfusion in isolated perfused rat hearts. Am J Physiol 1991; 261: H1864.H1871.
- **Mody FV, Singh B, Mohiuddin I, Coyle K, Buxton D, Hansen H et al.** Trimetazidine-induced enhancement of myocardial glucose utilization in normal and ischemic myocardial tissue: An evaluation by positron emission tomography. Am J Cardiol 1998; 82: 42K-49K.
- **Moffat MP, Karmazyn M.** Protective effects of the potent Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibition methylisobutylamiloride against post-ischemic contractile dysfunction in rat and guinea-pigs hearts. J Moll Cell Cardiol 1993; 25: 959-971.
- **Mohri M, Tomoike H, Noma M, Inoue T, Hisano K, Nakamura M.** Duration of ischemia is vital for collateral development: repeated brief coronary artery occlusions in conscious dogs. Cir Res 1989; 64: 287-296.
- **Moncada S.** The "Sanchez Medal" award lecture: Nitric oxide 1994. Rev Invest Clin 1994; 46 (suppl I): 15-17.
- **Monpere C, Brochier M, Demange J, Ducloux G, Warn JF.** Combination of trimetazidine with nifedipine in effort angina. Cardiovasc Drugs Ther 1990; 4 (suppl 4): 824-825.

- **Moreno-Sanchez R.** Inhibition of oxidative phosphorylation by a  $\text{Ca}^{2+}$  induced disimintion of the adenine nucleotide translocation. *Biochim Biophys Acta* 1985; 724: 278-285.
- **Moreno-Sanchez R, Torres-Marquez ME, Devars S.** Oxidación de sustratos en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex* 1991; 60: 587-591.
- **Mubagwa K.** Sarcoplasmic reticulum function during myocardial ischemia and reperfusion. *Cardiovas Res* 1995; 30 (2): 166-175.
- **Murphy E, Perlmon M, London RE, Steenbergen C.** Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991; 68: 1250-1258.
- **Myers CL, Weiss SJ, Kirsh MM.** Involvement of hydrogen peroxide and hydroxyl radical in the oxygen paradox: Reduction of creatine kinase release by catalasa, allopurinol of deferoxamine, but not superoxide dismutase. *J Moll Cell Cardiol* 1985; 17: 675-648.
- **Naka Y, Stern D, Pinsky D.** Fisiopatología y bioquímica de la isquemia, necrosis y reperfusión miocárdicas. En: Fuster V, Ross R, Topol E, eds. *Atherosclerosis y enfermedad arterial coronaria*. Barcelona: Springer-Verlag Iberica 1997; 867-878.
- **Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefler DJ, Zhao Z, Fowler WC, McGee DS et al.** Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992; 263: H1650-H1658.
- **Narula J, Haider N, Virmani R, DiSalvo T, Kologie FD, Hajjar R.** Apoptosis in myocytes in end stage heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1182-1189.
- **Nayler WG, Szeto J.** Effect of verapamil on contractility, oxygen utilization and calcium exchangeability in mammalian heart muscle. *Cardiovasc Res* 1972; 6: 120-128.
- **Nayler WG, Ferrari R, Williams A.** Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol* 1980; 46: 242-248.
- **Nayler WG.** El miocárdico isquémico y los antagonistas del calcio. En: Opie L, ed. *Protección miocárdica mediante antagonistas del calcio*. Barcelona: Ediciones médicas, 1998; 46-61.
- **Nicklas JM, Becker LC, Bulkley BH.** Effects of repeated brief coronary occlusion on regional left ventricular function and dimension in dogs. *Am J Cardiol* 1985; 56: 473-478.
- **Nielsen TT, Bagger JP, Thomassen A.** Improved myocardial lactate extraction after propranolol in coronary artery disease: effecteded by peripheral glutamate and free fatty acid metabolism. *Br Heart* 1986; 55: 140-147.
- **Ning XH, Zweng TN, Gallagher KP.** Ejection and isovolumetric contraction-phase wall thickening in nonischemic myocardium during coronary occlusion. *Am J Physiol* 1990; 258: 490-499.
- **Noma A.** ATP-regulated  $\text{K}^+$  channels in cardiac muscle. *Nature* 1983; 305: 147-148.
- **Noma S, Askenase AD, Agarwal JB, Helfant RH.** The effect of changes in afterload on systolic bulging. *Circulation* 1988; 77: 221-226.
- **Nonami Y.** The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury. *Jpn Circ J* 1997; 61: 119-132.

- **Ohtsuka S, Kakahana M, Doi T, Sugishita Y, Ito I.** Effects of acutely impaired regional function on remote myocardial wall motion and blood flow in the canine left ventricle studied by coronary occlusion and hypoxic perfusion. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 433-439.
- **Olafson B, Forman MB, Puet DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC *et al.*** Reduction of reperfusion injury in canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation* 1987; 76: 1135-1145.
- **Olivier MR, Kurien VA, Greenwork TW.** Relation between serum-free-fatty acids and arrhythmia and death after myocardial infarction. *Lancet* 1968; 1: 710-715.
- **Opie LH.** Role of carnitine in fatty acid metabolism of normal and ischemic myocardium. *Am Heart J* 1979; 97: 373-388.
- **Opie LH, Owen EP, Dennis SC.** Glycolysis prevent ischemic contracture. *Circulation* 1985; 72 (suppl III): III-349.
- **Opie LH, Dphil MD.** Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80: 1049-1062.
- **Opie LH, Boucher FR.** Trimetazidine and myocardial ischemic contracture in isolated rat heart. *Am J Cardiol* 1995; 76: 38B-40B.
- **Opie LH.** Glucose and the metabolism of ischemic myocardium. *Lancet* 1995; 345: 1520-1521.
- **Ozdemir R, Tuncer C, Aladag M, Guven A, Sezgin AT, Pekdemir H *et al.*** Effect of trimetazidine on late potentials after acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther* 1999; 13 (2): 145-149.
- **Padilla F, García-Dorado D, Agullo L, Inserte J, Paniagua A, Mirabet *et al.*** L-arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* 2000; 46 (3): 412-420.
- **Pallandi RT, Perry MA, Campbell TJ.** Proarrhythmic effects of an oxigen-derived free radical generating system on action potentials recorded from guinea pig ventricular myocardium: A possible cause of reperfusion-induced arrhythmias. *Circ Res* 1987; 61: 50-54.
- **Pallarés V, Cosín J, Hernández A, Pomar F, Portolés M.** El aturdimiento miocárdico en la isquemia. *Clínica Cardiovascular* 1995; 13: 37-48.
- **Pallarés V.** Alteraciones en la función y ultraestructura miocárdica inducidas por isquemias repetidas de corta duración. Tesis doctoral. 1996. Facultad de Medicina de Valencia.
- **Pashkow F, Holland R, Brooks H.** Early changes in contractility and coronary blood flow in the normal areas of the ischemic porcine heart. *Am Heart J* 1977; 93: 349-357.
- **Passeron J.** Efficacité de la trimetazidine dans l'angor d'effort stable de l'insuffisant coronarien chronique. *Presse Med* 1986; 15 (35): 1775-1778.
- **Pearson PJ, Lin PJ, Schaff HV.** Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992; 103: 1147-1154.

- **Peng CF, Davis JL, Murphy ML, Straub KD.** Effects of reperfusion on myocardial wall thickness, oxidative phosphorylation, and  $Ca^{++}$  metabolism following total and partial myocardial ischemia. *Am Heart J* 1986; 112: 1238-1244.
- **Persad S, Gupta KK, Dhalla NS.** Status of  $Ca^{2+}$ -channels in hearts perfused with  $Ca^{2+}$ -free medium as well as upon reperfusion ( $Ca^{2+}$  paradox). *J Mol Cell Cardiol* 1995; 27: 513-522.
- **Peters JW, Foote SC.** Chemistry of superoxide ion. Reaction with hydroperoxides. *J Am Chem Soc* 1976; 98: 873-875.
- **Pfeffer MA, Braunwald E, Moyer LA, Basta L, Brown EJJ, Cuddy TE et al, on behalf of the SAVE Investigators.** Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction: result of the Survival And Ventricular Enlargement trial. *N Engl J Med* 1992; 327: 669-677.
- **Pichardo J, Chávez R, Bravo C, Zazueta C, Chávez E.** Protección por Ketorolaco en el daño producido por isquemia y reperfusión miocárdica. *Arch Inst Cardiol Mex* 1994; 64: 325-330.
- **Pierce GN, Cole WC, Liu K, Massaeli H, Maddaford TG, Chen YJ et al.** Modulation of cardiac performance by amiloride and several selected derivatives of amiloride. *J Pharmacol Exp Ther* 1993; 265: 1280-1291.
- **Pilati CE.** Macromolecular transport in canine coronary microvasculature. *Am J Physiol* 1990; 258: H748-753.
- **Pinsky DJ, Oz MC, Koga S, Taha Z, Broekman MJ, Marcus AJ et al.** Cardiac preservation is enhanced in a heterotopic rat transplant model by supplementing the nitric oxide pathway. *J Clin Invest* 1994; 93: 2291-2297.
- **Piper HM, García-Dorado D, Ovize M.** A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38: 291-300.
- **Pogwzdz SM, Corr PB.** Electrophysiologic mechanisms underlying arrhythmias due to reperfusion of ischemia myocardium. *Circulation* 1987; 76: 404-426.
- **Pomar F.** Alteraciones funcionales y estructurales del miocardio por episodios repetidos de isquemia de duración breve. *Cardioprotección farmacológica. Tesis Doctoral. 1992. Facultad de Medicina de Valencia.*
- **Pomar F, Cosin J, Portolés M, Faura M, Renau J, Hernandez A et al.** Functional and ultrastructural alterations of canine myocardium subjected to very brief coronary occlusions. *Eur Heart J* 1995; 16: 1482-1490.
- **Pornin M, Harpey C, Allac J, Sellier P, Ourbak P.** Effects of trimetazidine on systemic hemodynamics in patients with coronary artery disease. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22 (suppl 22): 150A
- **Preuss KC, Gross GJ, Brooks HL, Warltier DC.** Time course of recovery of "stunned" myocardium following variable periods of ischemia in conscious and anesthetized dogs. *Am Heart J* 1987; 114: 696-703.
- **Prinzmetal M, Schwartz LL, Corday E, Spritaler R, Bergman HC, Kruger HE.** Studies on the coronary circulation: loss of myocardial contractility after coronary artery occlusion. *Ann Int Med* 1949; 31: 429-449.



- **Przyklenk K, Kloner RA.** Effect of verapamil on post-ischemic “stunned” myocardium: importance of timing in treatment. *J Am Coll Cardiol* 1988; 11: 614-623.
- **Przyklenk K, Whittaker P, Kloner RA.** Zofenopril, a newly developed sulfhydryl containing converting enzyme inhibitor, enhances contractile function of “stunned” myocardium. En: McGregor GA, Severs PS, eds. *Current advances in ACE inhibition*. Edinburgh. Churchill Livingstone. 1989a:1279.
- **Przyklenk K, Ghafari GB, Eitzman D, Kloner RA.** Nifedipine administered after reperfusion ablates systolic contractile dysfunction of postischemic “stunned” myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1989b; 13: 1176-1183.
- **Qiu Y, Rizvi A, Tang XL, Manchikaladudi S, Takano H, Jaddon AK et al.** Nitric oxide triggers late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1997; 273: H2931-H2936.
- **Rahman F, Toshima Y, Kohno H, Kinoshita K, Tokunaga K.** The protective effects of trimetazidine on normothermic ischemic myocardium in rats. *Jpn J Surg* 1989; 19 (3): 346-350.
- **Randhawa MP Jr, Lasley RD, Mentzzer RM Jr.** Adenosine and the stunned heart. *J Card Surg* 1993; 8 (suppl 3): 323-337.
- **Rankin JS, McHale PA, Arentzen CE, Ling D, Greenfield JC Jr, Anderson RW.** The three-dimensional dynamic geometry of the left ventricle in the conscious dog. *Circ Res* 1976; 39: 304-313.
- **Ray PS, Maulik G, Cordis GA, Bertelli AA, Bertelli A, Das DK.** The red wine antioxidant resveratrol protects isolated rat hearts from ischemia reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 1999; 27 (1-2): 160-169.
- **Reeves RC, Evanochko WT, Canby RC, McMillin JB, Pohost GM.** Demonstration of increased myocardial lipid with postischemic dysfunction (“myocardial stunning”) by proton nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 739-744.
- **Reimer KA, Jennings R, Tatum A.** Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. *Am J Cardiol* 1983; 52: 72A-81A
- **Reimer KA, Murry CE, Yamasawa I, Hill ML, Jennings RB.** Four brief periods of myocardial ischemia cause no cumulative ATP loss or necrosis. *Am J Physiol* 1986; 251: 1306-1315.
- **Renaud JF.** Internal pH, Na<sup>+</sup> and Ca<sup>++</sup> regulation by trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovasc Drugs Ther* 1988; 1 : 677-686.
- **Rigaud M, Rocha P, Bosch J, Farcot JC, Bardet J, Bourdarias JP.** Regional left ventricular function assessed by contrast angiography in acute myocardial infarction. *Circulation* 1979; 68: 130-139.
- **Rivera JM, Cosín J, Hernández A, Solaz J, Andrés F, Caffarena T, Graullera B.** Diferencias regionales en la función contráctil del subendocardio y el subepicardio del ventriculo izquierdo en el perro. *Rev Esp Cardiol* 1989a; 42: 192-198.
- **Rivera JM, Cosín J, Hernández A, Solaz J, Andrés F.** Función miocárdica segmentaria durante la isquemia transitoria. Influencia de la orientación fibrilar. El estrato y la zona en el miocardio del perro *CV Wordl Report* 1989b; 2: 127-134.

- **Rivera JM, Cosín J, Hernández A, Andrés F, Solaz J.** Estudio de la acción cardioprotectora del propranolol durante las isquemias transitorias de duración breve. *Rev Lat Cardiol* 1992; 13: 8-13.
- **Rochette L, Maupoil V.** De l'ischémie aux lésions de reperfusion. *Arch Mal Coeur* 1993; 86 (IV): 13-17.
- **Roseman MD.** Painless myocardial infarction: A review of the literature and analysis of 220 cases. *Ann Intern Med* 1954; 41: 1-7.
- **Rosen MR, Janse NS, Myerburg RJ.** Arrhythmias induced by coronary artery occlusion: wath are the electrophysiological mechanisms? En: Hearse DJ, Manning AF, Janse MJ, eds. *Life threatening arrhythmias during ischemia and infarction*. Nueva York: Raven Press, 1987; 11.
- **Rosenkraz ER, Buckberg GD.** Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 1235-1246.
- **Royer RJ.** Etude pharmacocinétique de la trimetazidine chez l'homme après administration unique de 40 mg par voi VI et orale en comprimés et en gouttes. Internal report, 1986.
- **Ruffolo RR, Feuerstein GZ.** Pharmacology of carvedilol: ratinale for use in hypertension coronary artery disease and congestive heart failure. *Cardiovasc Drugs Ther* 1997; 11: 247-256.
- **Ruiz-Meana M, García-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabés JA, Oliveras J, Soler J.** Efecto del edema osmótico durante la reoxigenación sobre la viabilidad celular. Estudio en el miocito aislado. *Rev Esp Cardiol* 1995; 48: 266-271.
- **Rupp H, Schultze W, Vetter R.** Dietary medium-chain triglycerides can prevent changes in myosine and SR due to CPT 1 inhibition by etomoxir. *Am J Physiol* 1995; 269: R630-R640.
- **Rushmer RF, Franklin DL, Ellis RM.** Left ventricular dimensions recorder by sonocardiometry. *Circ Res* 1956; 4: 684-689.
- **Sawa Y, Bai HZ, Suzuki K, Tsujimoto Y, Matsuda H.** Overexpression of Bcl-2 gene improves the myocardial tolerance to ischemia-reperfusion by preventing DNA fragmentation. *Circulation* 1995; 92: I-772.
- **Schaer GL, Spaccavento LJ, Browne KF, Krueger KA, Krichbaum D, Phelan JM *et al.*** Beneficial effects of ReothRx injection in patients receiving thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. Results of a randomized, double blind, placebo controlled trial. *Circulation* 1996; 94: 298-307.
- **Schaper J, Schaper W.** Reperfusion of ischemic myocardium: ultraestructure and histochemical aspects. *J Am Coll Cardiol* 1983; 1: 1037-1046.
- **Schaper J, Meiser E, Stämmler T.** Ultrastructural morphometric analysis of myocardium from dogs, rats, hamsters, mice and from human hearts. *Circ Res* 1985; 56: 377-391.
- **Schaper W, Binz K, Sass S.** Influence of collateral blood flow and of variations in MVO<sub>2</sub> in tissue ATP content in ischemic and infarcted myocardium. *J Moll Cel Cardiol* 1987; 19: 19-37.
- **Schelbert HR, Buxton D.** Insights into coronary artery disease gained from metabolic imaging. *Circulation* 1988; 78: 496-504.
- **Schofer J, Montz R, Mathey DG.** Scintigraphic evidence of the "no reflow" phenomenon in human beings after coronary thrombolysis. *J Am Coll Cardiol* 1985; 5: 593-598.

- **Scholz W, Albus U.** Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange and its inhibition in cardiac ischemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1993; 88: 443-445.
- **Schulz R, Wambolot R.** Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995; 30 (3): 432-439.
- **Schwartz GG, Schaefer S, Meyerhoff DJ, Gober J, Fochler P, Massie B et al.** Dynamic relation between myocardial contractility and energy metabolism during and following brief coronary occlusion in the pig. *Cir Res* 1990; 67: 490-500.
- **Schwartz GG, Greyson C, Wisneki JA, García J.** Inhibition of fatty acid metabolism alters myocardial high energy phosphates in vivo. *Am J Physiol* 1994; 267: H224-H231.
- **Seenberg C, Hill M, Jennings R.** Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic and ischemic myocardium. *Cir Res* 1985; 57: 864-875.
- **Sellier P.** Chronic effects of trimetazidine on ergometric parameters in effort angina. *Cardiovasc Drugs Ther* 1990; (suppl 4): 822-823.
- **Sentex E, Sergiel JP, Lucien A, Grynber A.** Is the cytoprotective effect of trimetazidine associated with lipid metabolism? *Am J Cardiol* 1998; 82: 18K-24K.
- **Sethi R, Takeda N, Nagano M, Dhalla NS.** Beneficial effects of vitamin E treatment in acute myocardial infarction. *J Cardiovas Pharmacol Ther* 2000; 5 (1): 51-58.
- **Sharkey SW, Murakami MAM, Smith SA, Apple ES.** Canine myocardial creatine kinase isoenzymes after chronic coronary artery occlusion. *Circulation* 1991; 84: 330-340.
- **Sharma G, Varley K, Kim S, Barwinsky J, Cohen M, Dhalia N.** Alterations in energy metabolism and ultrastructure upon reperfusion of the ischemic myocardium after coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1975; 36: 234-243.
- **Sheps DS, Ballenger MN, De Gent GE, Krittayaphong R, Dittman E, Maixner W et al.** Psychological responses to a speech stressor: correlation of plasma beta-endorphin levels at rest and after psychological stress with thermally measured pain threshold in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1995; 25: 1499-1503.
- **Shirahase H, Suzuki Y, Osumi S, Kakeya N, Nurahashi K.** Inhibitory effects of trimetazidine dihydrochloride on aggregation, serotonin release and malondialdehyde production in rabbit platelets. *Jpn J Pharmacol* 1988; 47: 29-34.
- **Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM.** Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1991; 260: H426-H435.
- **Siegmund B, Schlack W, Piper HM.** Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation* 1997; 96: 4372-4379.
- **Sigwart U, Grbil M, Payot M, Goy JJ, Essinger A, Fischer A.** Ischemic events during coronary artery balloon occlusion. En: Rutishauer W, Roskamm H, eds. *Silent myocardial ischemia*. Berlin. Springer-Verlag 1984: 29-36.
- **Sodi-Pallarés D, Testelli MR, Fishleder BI, Bisteni A, Medrano G, Friedland CH et al.** Effects of intravenous infusion of a potassium-glucose-insulin solution on the electrocardiographic signs of myocardial infarction. *AM J Cardiol* 1962; 9: 166-181.

- **Soei LK, Sassen LMA, Fan DS, Veen T, Krams R, Verdouw PD.** Myofibrillar Ca<sup>2+</sup> sensitization predominantly enhances function and mechanical efficiency of stunned myocardium. *Circulation* 1994; 90: 959-969.
- **Sommers HM, Jennings RB.** Experimental acute myocardial infarction: histologic and histochemical studies of early myocardial infarcts induced by temporary or permanent occlusion of a coronary artery. *Lab Invest* 1964; 13: 1491-1502.
- **Spedding M, Mir AK.** Direct activation of Ca<sup>2+</sup> channels by palmitoyl carnitine putative endogenous ligand. *Br J Pharmacol* 1987; 92: 457-468.
- **Spencer AP, Larson DS, Crouch MA.** Vitamin E and coronary artery disease. *Arch Intern Med* 1999; 159: 1313-1320.
- **Stacpoole PW.** The pharmacology of dichloroacetate. *Metabolism* 1989; 38: 1124-1144.
- **Steg PG, Grollier G, Gallay P, Morice M, Karrillon GJ, Benamer H et al.** A randomized double-blind trial of trimetazidine as adjunctive therapy to primary PTCA for acute myocardial infarction. *Int J Cardiol* 2001; 77: 263-73.
- **Stern S, Tzivoni D.** Early detection of silent ischaemic heart disease by 24-hour electrocardiographic monitoring of active subjects. *Br Heart J* 1974; 35: 481.
- **Steurer G, Yang P, Rad V, Mohl W, Glogar D, Smetana R.** Acute myocardial infarction, reperfusion injury and intravenous magnesium therapy: basic concepts and clinical implications. *Am Heart J* 1996; 132 (Pt 2; suppl 2): 478-482.
- **Streeter DD Jr, Spotnitz HM, Patel DP, Ross J Jr, Sonnenblick EH.** Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. *Circ Res* 1969; 24: 339-237.
- **Sung CP, Arleth AJ, Ohlstein EH.** Carvedilol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 221-227.
- **Swain JL, Sabina RL, Hines JJ, Greenfield JC Jr, Holmes EW.** Repetitive episodes of ischemia (12 min) do not produced a cumulative depletion of high energy phosphates compounds. *Cardiovasc Res* 1984; 18:264-269.
- **Szwed H, Pachocki R, Domzal-Bochenska M, Szymczak K, Szydowski Z, Paradowski A et al.** Efficacy and tolerance of trimetazidine, a metabolic antianginal, in combination with a hemodynamic antianginal in stable exertion angina. TRIMPOL I, a multicenter study. *Presse Med* 2000; 29: 533-538.
- **Szwed H, Sadowski Z, Pachocki R, Domzal-Bochenska M, Szymczack K, Szydowski Z et al.** TRIMPOL-II-multicenter study. Efficacy and safety of trimetazidine in patients with stable angina pectoris under beta-blocker therapy. Preliminary results (abstract). 8<sup>th</sup> International Symposium on Cardiovascular Pharmacotherapy; 1999 Mar 18-Apr 1; Amsterdam.
- **Taegtmeyer H.** Metabolismo energético del corazón: De los conceptos básicos a las aplicaciones químicas. *Current Problems in Cardiology* 1994; 6.
- **Taegtmeyer H, King L, Jones B.** Energy substrate metabolism, myocardial ischemia, and targets for pharmacotherapy. *Am J Cardiol* 1998; 82: 54K-60K.
- **Taegtmeyer H.** Metabolism- the lost child of cardiology. *Am J Cardiol* 2000; 36: 1386-1388.

- **Takahashi M, McKown D, McKown M, Franklin D.** Regional myocardial function and reactive hyperemia in conscious dogs during coronary collateral regression. *Circulation* 1982; 66 (suppl H): H-1.
- **Tamura A, Sato T, Frujii T.** Quenching action of oxygen radical by indapamide and its metabolites. *J Med Pharm Sci* 1987; 18: 1469-1473.
- **Tan L-B, Jalil JE, Pilk R, Janichi JS, Weber KT.** Cardiac myocyte necrosis induced by angiotensin II. *Circ Res* 1991; 69: 1185-1195.
- **Targarona EM, Lopez-Boado MA, Sanfey H, Fernandez-Cruz L.** Síndrome de isquemia-reperusión. *Gastroenterología y Hepatología* 1992; 15: 163-170.
- **Tellez F, Carvajal K, García C, Vasquez C, Chavez E, Moreno-Sanchez R.** Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y reperusión en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex* 1996; 66: 162-187.
- **Tennant R, Wiggers CJ.** The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol* 1935; 112: 351-361.
- **Theroux P, Franklind D, Ross J Jr, Kemper WS.** Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ Res* 1974; 35: 896-908.
- **Theroux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S.** Regional myocardial function in the conscious dog during acute coronary occlusion and responses to morphine, propranolol, nitroglycerin and lidocaine. *Circulation* 1976; 53: 302-314.
- **Theroux P, Ross J Jr, Franklin D, Cowell JW, Bloor CM, Sasayama S.** Regional myocardial function and dimensions early and late after myocardial infarction in the unanesthetized dog. *Circ res* 1977; 40: 158-165.
- **Thomsen JH, Shug AL, Yap VU, Patel AK, Harras TJ, De Felice SL.** Improved pacing tolerance of the ischemic human myocardium after administration of carnitine. *Am J Cardiol* 1979; 43: 300-305.
- **Timour Q, Clauser P, Harpey C, Faucol G.** Tissue distribution after intravenous administration of trimetazidine in dogs. *Eur J Pharmac* 1990; 183: 200-201.
- **Triana JF, Bolli R.** Decreased flow reserve in "stunned" myocardium after a 10-min coronary occlusion. *Am J Physiol* 1991; 261: H793-804.
- **Tsao PS, Aoki N, Lefer DJ, Johnson G, Lefer AM.** Time course of endothelial dysfunction and myocardial injury during myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *Circulation* 1990; 82 (4): 1402-1412.
- **Turnerir B, Colak O, Alatas O, Besogul Y, Kural T, Aslan R.** Measurement of troponin T to detect cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg* 1999; 68: 2173-2176.
- **Uchida Y, Yoshimoto N, Murau S.** Cyclic fluctuations in coronary blood pressure and flow induced by coronary artery constriction. *Jpn Heart J* 1975; 16: 454-464.
- **Vanoverschelde JLJ, Janier MF, Bakke JE, Marshall DR, Bergmann SR.** Rate of glycolysis during ischemia determines extent of ischemic injury and functional recovery after reperfusion. *Am J Physiol* 1994; 264: H1785-H1794.

- **Vedrinne JM, Vedrinne C, Bompard D, Lehot JJ, Boissel JP, Champsaur G *et al.*** Myocardial protection during coronary artery bypass graft surgery: a randomized, double-blind, placebo-controlled study with trimetazidine. *Anesth Analg* 1996; 82: 712-718.
- **Verrier RL, Hagestad EL.** Mechanisms involved in reperfusion arrhythmias. *Eur Heart J* 1986; 7 (supl A): 13-22.
- **Wang P, Zweier JL.** Measurement of nitric oxide and peroxynitrite generation in the postischemic heart: evidence for peroxynitrite-mediated reperfusion injury. *J Biol Chem* 1996; 271: 2923-2930.
- **Watanabe T, Shintani F, Fu T, Kato K.** Maximal ratio of the left ventricular pressure fall in early stage of myocardial ischemia following experimental coronary occlusion. *Jpn Heart J* 1975; 16: 583-591.
- **Weis HR, Rodriguez E, Tse J, Scholz PM.** Effect of increased myocardial cyclic GMP induced by cyclic GMP-phosphodiesterase inhibition on oxygen consumption and supply of rabbit hearts. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1994; 21: 607-614.
- **Weisfeldt M.** Exploring myocardial ischemia: silent and symptomatic. *Am J Med* 1986; 80 (4C): 1-5.
- **Weiss J, Shine KI.** Extracellular  $K^+$  accumulation during early myocardial ischemia. Implications for arrhythmogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 1981; 13: 699-704.
- **Welbourn C, Golman G, Paterson IS.** Pathophysiology of ischemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 1991; 78: 651-655.
- **Westin W, Mullane K.** Does captopril attenuate reperfusion induced myocardial dysfunction by scavenging free radicals?. *Circulation* 1988; 77 (supl D): 30.
- **Whittaker P, Boughner DR, Kloner RA, Przyklenic K.** Stunned myocardium and myocardial collagen damage: Differential effects of single and repeated occlusions. *Am Heart J* 1991; 121: 434-441.
- **Wijns W, Serruys PW, Slager C, Grimm J, Krayenbuehl HP, Hugenholtz PG *et al.*** Effect of coronary occlusion during percutaneous transluminal angioplasty in humans on left ventricular chamber stiffness and regional diastolic pressure-radius relations. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 455-461.
- **Williams FM, Tanda K, Kus M, Williams TJ.** Trimetazidine inhibits neutrophil accumulation after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit. *Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 828-833.
- **Williams MW, Taft CS, Ramnauth S, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J.** Endogenous nitric oxide (NO) protects against ischaemia-reperfusion injury in the rabbit. *Cardiovasc Res* 1995; 30 (1): 79-86.
- **Witkowski FX, Corr PB.** Mechanism responsible for arrhythmias associated with reperfusion of ischemic myocardium. *Ann NY Acad Sci* 1984; 427: 187-198.
- **Woods KL, Fletcher S, Roffe C, Halder Y.** Intravenous magnesium sulphate in suspected acute myocardial infarction: Results of the second leicester intravenous magnesium intervention trial (LIMIT-2). *Lancet* 1992; 339: 1553-1558.
- **Wolfson RG, Patel VC, Neold GH, Yellon DM.** Inhibition of nitric oxide synthesis reduces infarct size by an adenosine-dependent mechanism. *Circulation* 1995; 91 (5): 1545-1551.

- **Wyat HL, Forrester JS, Da Luz PL, Diamond GA, Chagrasulis R, Swan HJC.** Functional abnormalities in nonoccluded regions of myocardium after experimental coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1976; 37: 366-372.
- **Wynsen JC, Kenny D, Brooks HL, Warltier DC.** Regional myocardial function after repetitive brief episodes of ischemia: effect of altering the duration of the reperfusion period. *Am Heart J* 1991; 121: 1331-1338.
- **Xi L, Jarret N, Hess M, Kukreja R.** Essential role of inducible nitric oxide synthase in monophosphoryl lipid A – Induced late cardioprotection. *Circulation* 1999; 99: 2157-2163.
- **Yamazaki S, Fujibayashi Y, Rajagopalan RE, Meerbaum S, Corday E.** Effects of staged versus sudden reperfusion after acute coronary occlusion in the dog. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7: 564-572.
- **Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, Maruyama Y.** Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation* 1998; 97: 276-281.
- **Young LH, Renfu Y, Russel R, Hu X, Caplan C, Ren J et al.** Low-flow ischaemia leads to translocation of canine heart GLUT-4 and GLUT-1 glucose transporters to the sarcolemma in vivo. *Circulation* 1997; 95 (2): 415-422.
- **Yue TL, Cheng HY, Lisko PG, McKenna PJ, Feuerstein R, Gu JL et al.** Carvedilol, a new vasodilator and beta adrenoceptor antagonist, is an antioxidant and free radical scavenger. *J Pharmacol Exp Ther* 1992a; 26: 92-98.
- **Yue TL, McKenna PJ, Ruffolo RR.** Carvedilol, a new beta-adrenoceptor antagonist and vasodilatador antihypertensive drug, inhibits superoxide from humans neutrophils. *Eur J Pharmacol* 1992b; 214: 277-280.
- **Yue TL, MA XL, Wang X, Roamnic AM, Liu GL, Loudon C et al.** Possible involvement of stress-activated protein kinase signaling pathway and *Fas* receptor expression in prevention of ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis by carvedilol. *Cir Res* 1998; 82: 166-174.
- **Zarco P.** Radicales libres de oxígeno en la isquemia y reperfusión miocárdica. *Rev Lat Cardiol* 1988; 9: 35-48.
- **Zarco P.** Metabolismo cardíaco y radicales libres. *Rev Clin Esp* 1989; 185: 415-422.
- **Zhao M, Zhang H, Robinson TF, Sonnenblick EH, Eng C.** Profound structural alterations of the extracellular collagen in postischemic (“stunned”) but viable myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 1322-1338.
- **Zhao M, Sonnenblick EH, Zhang H, Eng C.** Increase in myofilament separation in the stunned myocardium. *J Moll Cell Cardiol* 1992; 24: 1143-1154.
- **Zhao ZQ, Nakamura M, Wang NP, Willox J, Shearer S, Ronson et al.** Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death. *Cardiovasc Res* 2000; 45: 651-660.
- **Zimmerman ANE, Hulsmann WC.** Paradoxical influence of calcium ion on the permeability of the cell membranes of the isolated rat heart. *Nature* 1966; 211: 646-647.
- **Zimmerman JC.** Therapeutic application of oxygen radical scavengers. *Chest* 1991; 100: 189-192.