

UNIVERSITAT AUTÒNOMA DE BARCELONA  
FACULTAT DE MEDICINA  
DEPARTAMENT DE MEDICINA

TESI DOCTORAL

**LIMITACIÓN DE LA EXTENSIÓN DE LA NECROSIS MIOCÁRDICA POST-REPERFUSIÓN  
MEDIANTE LA ESTIMULACIÓN DE LA SÍNTESIS DE GMP CÍCLICO**

Realitzada per Ferran Padilla Marchán per optar al grau de Doctor en Medicina.

Servei de Cardiologia  
Departament de Medicina  
Hospital General Universitari Vall d'Hebron.

Barcelona, maig de 2002

D. David García-Dorado García, Doctor en Medicina y Jefe de Sección del Servicio de Cardiología del Hospital General Uiversitari Vall d'Hebron de Barcelona, y D<sup>a</sup> M<sup>a</sup> Pilar Tornos i Mas, Doctora en Medicina, Jefe de Sección del Servicio de Cardiología del Hospital General Uiversitari Vall d'Hebron, y Profesora Titular del Departament de Medicina de la Universitat Autònoma de Barcelona,

CERTIFICAN:                    Que la presente tesis doctoral "*Limitación de la extensión de la necrosis miocárdica post-reperfusión mediante la estimulación de la síntesis de GMP cíclico*", presentada por FERRAN PADILLA MARCHÁN para aspirar al grado de Doctor en Medicina, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Dr. David García-Dorado

Dra. M<sup>a</sup> Pilar Tornos i Mas.

Barcelona, 21 de mayo de 2002.

A mis padres

A Cristina

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David García-Dorado, director de esta tesis doctoral, por haberme introducido en el Laboratorio de Cardiología Experimental del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d'Hebron, por su apoyo constante, por ser fuente inagotable de motivación intelectual, y por haberse mostrado no sólo como director de este trabajo y responsable del Laboratorio, sino como amigo, consejero y mentor durante estos años.

A la Dra. M<sup>a</sup> Pilar Tornos, por haber aceptado ser tutora de esta tesis doctoral, y por su apoyo, su amistad, y su ejemplo de rigurosidad y profesionalidad, tanto en su faceta asistencial como docente.

A todos los miembros del Laboratorio de Cardiología Experimental con los que he tenido el placer de trabajar desde 1999, cuando yo todavía era residente del Servicio de Cardiología. Sin su apoyo, su generosidad y buen humor, de buen seguro que esta tesis no se hubiera podido realizar.

Quiero agradecer al Dr. José A. Barrabés el haber sido un modelo a seguir, tanto en la clínica como en el Laboratorio, habiéndome enseñado todo lo que sé del modelo de isquemia-reperfusión miocárdica en el corazón porcino *in situ*, además de colaborar activamente en muchos de los experimentos, en su diseño, y en la discusión crítica de los resultados.

Gracias al Dr. Luis Agulló y a Javier Inserte, por todo lo que me han enseñado, por su generosidad, y por haber participado en el diseño de los experimentos y en la realización activa de parte fundamental de los trabajos, como son las determinaciones de GMPc y los experimentos en el corazón aislado de rata, respectivamente.

Gracias a Lourdes Trobo, pieza fundamental en su función como técnico de laboratorio, por su excelente trabajo en el modelo de corazón porcino *in situ*, donde hemos compartido incontables horas de trabajo.

Mis agradecimientos a Noelia Escalona y Amaya Paniagua, que participaron activamente realizando las determinaciones de GMPc tanto plasmáticas como en tejido miocárdico.

Finalmente, quiero expresar mi gratitud al Dr. Jordi Soler-Soler, Jefe del Servicio de Cardiología del Hospital Vall d'Hebron, donde me formé como cardiólogo, por su ejemplo constante y por haberme permitido formar parte de este grupo. Su apoyo, su comprensión y sus consejos sinceros han hecho fácil lo difícil, y son un valor añadido a este tiempo de trabajo.

*Gracias, por supuesto, a Cristina, por haber sido a la vez cimiento y tejado de esta casa. Este trabajo ha recibido su constante estímulo y comprensión y, finalmente, ha visto la luz en la etapa más ilusionante de mi vida.*

***Índice***

<b>Introducción</b> .....	2
<b>1. Impacto socio-sanitario de la cardiopatía isquémica</b> .....	2
<b>2. Interrogantes abiertos sobre los tratamientos de reperfusión</b> .....	4
<b>3. El daño por isquemia y reperfusión miocárdica</b> .....	5
<b>3.1. Daño celular letal por reperfusión</b> .....	6
3.1.1. Mecanismos implicados en el daño celular letal por reperfusión .....	6
3.1.1.1. <i>La recuperación de la energía</i> .....	7
3.1.1.2. <i>La normalización del pH intracelular</i> .....	9
3.1.1.3. <i>Normalización de la osmolalidad tisular</i> .....	11
3.1.1.4. <i>Propagación de la necrosis célula a célula</i> .....	11
<b>3.2. Aturdimiento miocárdico</b> .....	12
<b>3.3. El daño microvascular</b> .....	13
3.3.1. Interacción de PMN y complemento .....	14
3.3.2. Adhesión de PMN al endotelio vascular .....	14
3.3.3. Interrelación entre PMN, endotelio y plaquetas.....	15
<b>3.4. Arritmias de reperfusión</b> .....	16
<b>4. GMPc. Síntesis, implicación cardiovascular y papel en el miocardio reperfundido</b> 17	
<b>4.1. Síntesis. Guanilil-ciclasas</b> .....	18
4.1.1. Guanilil-ciclasa soluble .....	18
4.1.2. Guanilil-ciclasa particulada .....	20
<b>4.2. Efectos cardiovasculares predominantes del GMPc</b> .....	21
4.2.1. Efectos sobre el músculo liso vascular .....	21
4.2.2. Efectos sobre el endotelio. Permeabilidad endotelial.....	22
4.2.3. Efectos del GMPc sobre el miocardio .....	23
<b>4.3. Elevación de la concentración de GMPc durante la isquemia y reperfusión</b>	
<b><i>miocárdica mediante estimulación farmacológica</i></b> .....	24
4.3.1. Estimulación de la guanilil-ciclasa soluble .....	24
4.3.1.1. <i>Evidencia experimental</i> .....	24
4.3.1.2. <i>Posibles efectos perniciosos del óxido nítrico</i> .....	26
4.3.1.3. <i>Estudios clínicos</i> .....	27
4.3.2. Estimulación de la guanilil-ciclasa particulada .....	28
4.3.3. Administración en humanos de L-arginina y péptidos natriuréticos .....	29
<b>Hipótesis y objetivos</b> .....	31
<b>Métodos y resultados</b> .....	34
<b>Métodos</b> .....	35

<b>1. Animales</b> .....	35
<b>2. Instrumentación y monitorización</b> .....	35
2.1. <b>Modelo de corazón aislado de rata</b> .....	35
2.2. <b>Modelo de corazón porcino in situ</b> .....	36
2.2.1. Cateterización del seno coronario .....	38
2.2.2. Cateterización de la coronaria izquierda. Daño intimal coronario.....	39
2.2.3. Monitorización durante el estudio en el modelo de corazón porcino.....	40
2.2.4. Estudio de la motilidad regional segmentaria.....	40
2.2.5. Oclusión coronaria y reperusión.....	41
<b>3. Estudios postmortem</b> .....	42
3.1. <b>Determinación del área en riesgo y tamaño de infarto</b> .....	42
3.2. <b>Análisis histológico</b> .....	43
3.3. <b>Determinación de mieloperoxidasa en tejido miocárdico</b> .....	44
3.4. <b>Determinación de GMPc</b> .....	45
3.4.1. Determinaciones en plasma .....	45
3.4.2. Determinaciones en tejido miocárdico .....	45
3.5. <b>Determinaciones de lactato deshidrogenasa</b> .....	46
<b>4. Administración de L-arginina. Protocolos</b> .....	46
4.1. <b>Protocolo de administración de L-arginina</b> .....	46
4.2. <b>Determinaciones de L-arginina en plasma</b> .....	47
4.3. <b>Determinaciones de GMPc</b> .....	47
4.3.1. Determinaciones de GMPc en plasma .....	47
4.3.2. Determinaciones de GMPc en seno coronario.....	47
4.3.3. Determinaciones de GMPc en miocardio.....	48
<b>5. Administración de urodilatina. Protocolos</b> .....	48
5.1. <b>Estudios en el corazón aislado de rata. Protocolos</b> .....	49
5.1.1. Efectos sobre la recuperación funcional .....	49
5.1.2. Efectos sobre el contenido miocárdico de GMPc.....	49
5.1.3. Efectos sobre la muerte celular.....	49
5.2. <b>Estudios en el modelo de corazón porcino in situ. Protocolos</b> .....	50
5.2.1. Serie para determinar el contenido miocárdico de GMPc.....	50
5.2.2. Serie para determinar el tamaño del infarto.....	51
5.3. <b>Determinaciones de urodilatina y GMPc en plasma</b> .....	51
<b>6. Administración de nitratos. Protocolos</b> .....	52
6.1. <b>Búsqueda de dosis</b> .....	52
6.1.1. Determinaciones de 5-MNI en plasma .....	52
6.2. <b>Experimentos dirigidos a determinar el tamaño del infarto</b> .....	52
6.2.1. Determinaciones de 5-MNI en plasma .....	53
<b>7. Adquisición y preparación de las drogas</b> .....	53

7.1. <i>L-arginina</i> .....	53
7.2. <i>Urodilatina</i> .....	53
7.3. <i>5-mononitrato de isosorbide</i> .....	54
8. <b>Análisis estadístico</b> .....	54
8.1. <i>Análisis específicos</i> .....	54

<b>Resultados</b> .....	56
-------------------------	----

<b>Resultados. Administración de L-arginina</b> .....	57
---	----

1. <b>Efectos agudos de la administración de L-arginina</b> .....	57
1.1. <i>Concentraciones plasmáticas de L-arginina</i> .....	57
1.2. <i>Hemodinámica</i> .....	58
1.3. <i>Concentraciones plasmáticas de GMPc</i> .....	59
2. <b>Oclusión coronaria y reperfusión</b> .....	59
2.1. <i>Hemodinámica</i> .....	59
2.2. <i>Flujo coronario</i> .....	60
2.3. <i>Motilidad regional segmentaria</i> .....	60
2.4. <i>Arritmias</i> .....	62
2.5. <i>Concentraciones plasmáticas de GMPc</i> .....	62
2.6. <i>Diferencia arteriovenosa en los niveles de GMPc</i> .....	63
2.7. <i>Concentraciones miocárdicas de GMPc</i> .....	64
2.8. <i>Área de miocardio en riesgo y tamaño de infarto</i> .....	65
2.9. <i>Actividad de mieloperoxidasa en tejido miocárdico</i> .....	65
2.10. <i>Histología cuantitativa</i> .....	66
2.11. <i>Bioquímica y hematología</i> .....	67
3. <b>Resumen de resultados</b> .....	68

<b>Resultados. Administración de urodilatina</b> .....	70
--	----

1. <b>Estudios en el modelo de corazón aislado de rata</b> .....	70
1.1. <i>Efectos de la administración de urodilatina en la función ventricular</i> .....	70
1.2. <i>Cuantificación de la necrosis. Liberación de LDH</i> .....	71
1.3. <i>Contenido miocárdico de GMPc</i> .....	71
2. <b>Estudios en el corazón porcino in situ</b> .....	72
2.1. <i>Contenido miocárdico de GMPc</i> .....	72
2.2. <i>Estudios para determinación del tamaño de infarto</i> .....	73
2.2.1. <i>Hematología y bioquímica</i> .....	73
2.2.2. <i>Niveles plasmáticos de urodilatina</i> .....	74
2.2.3. <i>Hemodinámica y flujo coronario</i> .....	75



2.2.4. Motilidad regional segmentaria .....	75
2.2.5. Arritmias .....	77
2.2.6. Concentraciones plasmáticas de GMPc .....	77
2.2.7. Área de miocardio en riesgo y tamaño de infarto .....	77
<b>3. Resumen de resultados .....</b>	<b>79</b>

## **Resultados. Administración de nitratos .....**

<b>1. Animales .....</b>	<b>81</b>
<b>2. Experimentos preliminares. Búsqueda de dosis .....</b>	<b>81</b>
2.1. <i>Concentraciones plasmáticas de 5-MNI</i> .....	81
2.2. <i>Hemodinámica</i> .....	81
<b>3. Experimentos de cuantificación del tamaño del infarto .....</b>	<b>82</b>
3.1. <i>Concentraciones plasmáticas de 5-MNI</i> .....	82
3.2. <i>Hemodinámica</i> .....	83
3.3. <i>Flujo coronario</i> .....	83
3.3.1. Reducciones cíclicas del flujo durante la reperfusión .....	85
3.4. <i>Motilidad regional segmentaria</i> .....	85
3.5. <i>Arritmias</i> .....	87
3.6. <i>Área de miocardio en riesgo y tamaño de infarto</i> .....	87
3.7. <i>Hematología y bioquímica</i> .....	88
<b>4. Resumen de resultados .....</b>	<b>89</b>

## **Discusión .....**

<b>1. Hallazgos fundamentales .....</b>	<b>91</b>
<b>2. Consideraciones metodológicas .....</b>	<b>92</b>
2.1. <i>Protocolos de administración de los fármacos</i> .....	93
2.1.1. Administración de L-arginina .....	93
2.1.2. Administración de urodilatina .....	93
2.1.3. Administración de 5-MNI .....	94
<b>3. Bioquímica y determinaciones hemodinámicas tras la administración de las drogas .....</b>	<b>95</b>
3.1. <i>Bioquímica</i> .....	95
3.2. <i>Efecto de la L-arginina sobre parámetros hemodinámicos</i> .....	95
3.3. <i>Efecto de la L-arginina sobre el flujo coronario regional</i> .....	96
3.4. <i>Efecto de la L-arginina sobre la contractilidad regional segmentaria</i> .....	96
3.5. <i>Efecto de la urodilatina sobre parámetros hemodinámicos</i> .....	97
3.6. <i>Efecto de la urodilatina sobre el flujo coronario regional</i> .....	97
3.7. <i>Efecto de la urodilatina sobre la contractilidad regional segmentaria</i> .....	97

3.8. Efecto del 5-MNI sobre parámetros hemodinámicos .....	98
3.9. Efecto del 5-MNI sobre el flujo coronario regional .....	98
3.10. Efecto del 5-MNI sobre la motilidad regional segmentaria .....	99
<b>4. Efecto de la administración de las drogas sobre la presencia de arritmias .....</b>	<b>99</b>
<b>5. El contenido de GMPc en el miocardio reperfundido .....</b>	<b>100</b>
5.1. Efectos de la L-arginina y urodilatina sobre los niveles plasmáticos de GMPc .....	100
5.2. Determinación de los niveles de GMPc en seno coronario .....	101
5.3. Efectos de la L-arginina sobre el contenido miocárdico de GMPc .....	101
5.4. Efectos de la urodilatina sobre el contenido miocárdico de GMPc .....	102
<b>6. Mecanismos implicados en la protección frente a la necrosis .....</b>	<b>102</b>
6.1. <b>Papel del NO en la isquemia y reperfusión miocárdica. Estudios previos .....</b>	<b>102</b>
6.2. <b>Sobre la administración de L-arginina .....</b>	<b>104</b>
6.3. <b>Sobre la administración de urodilatina .....</b>	<b>105</b>
6.4. <b>Sobre la administración de nitratos .....</b>	<b>107</b>
<b>7. Implicaciones terapéuticas .....</b>	<b>110</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>114</b>
<b>Bibliografía .....</b>	<b>117</b>

## Glosario

AMPc.....	adenosín monofosfato cíclico
ATP.....	adenosín trifosfato
BDM.....	2,3-butanedionemonoxima
DA.....	arteria coronaria descendente anterior
DTD.....	distancia telediastólica
DTS.....	distancia telesistólica
ECA.....	enzima convertidora de la angiotensina
ECG.....	electrocardiograma
EDTA.....	ácido etilendiaminotetracético
GC.....	guanilil-ciclase
GMPc.....	guanosín monofosfato cíclico
GTP.....	guanosín trifosfato
LDH.....	lactato deshidrogenasa
5-MNI.....	5-mononitrato de isosorbide
MPO.....	mieloperoxidasa
NO.....	óxido nítrico
NOS.....	sintasa de óxido nítrico (NO sintasa)
NOSn o NOS1.....	NO sintasa neuronal
NOSi o NOS2.....	NO sintasa inducible
NOSe o NOS3.....	NO sintasa endotelial
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	dióxido de nitrógeno
NYHA.....	<i>New York Heart Association</i> (sobre su clasificación)
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> .....	ión superóxido
OONO <sup>-</sup> .....	peroxinitrito
OH <sup>·</sup> .....	radical hidroxil
PDE.....	fosfodiesterasas
pH.....	- logaritmo decimal de la concentración de H <sup>+</sup>
PMN.....	leucocito polimorfonuclear
PN.....	péptido natriurético (PNA, PNB, PNC)
pO <sub>2</sub> .....	presión parcial de oxígeno
pCO <sub>2</sub> .....	presión parcial de dióxido de carbono
RLO.....	radicales libres de oxígeno
RPN.....	receptor de péptidos natriuréticos
TIMI.....	<i>Thrombolysis In Myocardial Infarction trial</i> (clasificación)
URO 10.....	urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min
URO 50.....	urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min

***Introducción.***

## Introducción.

En un ser humano, se generan millones de nuevas células cada segundo en un proceso necesario para sobrevivir. Sin embargo, la especialización de los tejidos hace que este proceso sea extraordinariamente desigual. Así, mientras células precursoras sanguíneas e intestinales son capaces de dividirse varias veces al día, otros tejidos como el cerebral o los musculares ven limitada al máximo esta capacidad(1). En estos tejidos, la muerte de algunas de estas células tiene consecuencias catastróficas para la función del órgano o para la vida del individuo, dependiendo de las tareas propias ejercidas por la célula que desaparece, o por la cantidad de células perdidas. La muerte de tejido miocárdico en el curso de un infarto agudo de miocardio representa un daño irreversible cuyas consecuencias no sólo son evidentes en la fase aguda sino que se prolongan en el tiempo para los supervivientes del mismo. La limitación de la necrosis miocárdica mediante la instauración de una reperusión pronta y de calidad, son el objetivo primero en el tratamiento de una de las enfermedades con mayor prevalencia e incidencia en los países desarrollados.

### 1. Impacto socio-sanitario de la cardiopatía isquémica.

Las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de muerte en nuestro entorno, además de constituir la primera causa de ingreso hospitalario a partir de la sexta década de la vida (2). En los países desarrollados, y a pesar de la progresiva reducción de la mortalidad cardiovascular desde los años 60 del siglo XX, ésta suponía un 44.6% de todas las muertes en la década de los noventa, siendo superior al 50% en países con economías emergentes (Europa del Este). En los Estados Unidos, al igual que en nuestro medio, las enfermedades cardiovasculares son la primera causa de ingreso hospitalario (más de 6.1 millones de ingresos/año), sin incluir los debidos a accidentes cerebro-vasculares. En el mismo país, la tasa de mortalidad atribuible a cardiopatía isquémica al año es de 174 muertes por cada 100.000 habitantes(3). Más aún, en los países desarrollados, se espera que en el año 2020 las enfermedades cardiovasculares doblarán su incidencia como causa de pérdida de años de calidad de vida, pasando del 10 al 20%(3). El impacto socio-económico es, por consiguiente, importantísimo. En cuanto a la mortalidad asociada a enfermedad coronaria, la gran mayoría de las muertes son consecuencia de un infarto agudo de miocardio (causado por

una oclusión trombótica aguda en una arteria coronaria) o a las consecuencias agudas o tardías del mismo.

No puede saberse la proporción real de pacientes que mueren en la fase aguda de un infarto agudo de miocardio, ya que se estima que como mínimo un tercio de los individuos muere antes de poder ser atendidos(4). Por ejemplo, en el registro MONICA, dos tercios de las muertes atribuidas a infarto de miocardio o catalogadas como muerte coronaria acontecían antes de llegar al hospital (5), hecho que se repite en países muy diferentes en cuanto a incidencia y prevalencia de enfermedad coronaria. Desde el advenimiento de los tratamientos trombolíticos para su administración en la fase aguda del infarto de miocardio, los diferentes ensayos clínicos han mostrado cifras de mortalidad a 30 días que oscilan del 4 al 12% (6-8) . A pesar de todo, y dependiendo de las series, sólo de un 35 a 53% de los pacientes que ingresan en la fase aguda de un infarto agudo de miocardio, se benefician de estrategias de reperfusión (6;9). De forma general, los diversos estudios multicéntricos internacionales han mostrado de forma consistente que los tratamientos trombolíticos reducen la mortalidad del infarto de miocardio, y que esta reducción es tiempo-dependiente, siendo más efectiva en la primera y segunda hora (10), con una pérdida de eficacia de 1.6 vidas salvadas por cada 1000 pacientes con cada hora que se retrasa el tratamiento(8). El beneficio del tratamiento probablemente se extiende a todos los grupos de edad, a pesar de que no es claro en pacientes mayores de 75 años (población que no supera 10% en estos estudios (8;10-12)), no habiéndose planteado ningún ensayo clínico randomizado que compare trombolítico y placebo en la población de más edad, que es la que presenta una mortalidad mayor y, por tanto, representa el grupo en el que la intervención supondría un mayor número de vidas salvadas por paciente tratado (6).

Diferentes estudios observacionales han permitido recoger cifras de mortalidad hospitalaria secundaria a infarto agudo de miocardio que oscilan del 10 al 17 % (12). En nuestro país, la mortalidad hospitalaria global oscila igualmente del 10 al 20% según los registros y series recogidas (4;5;9;13-16), reduciéndose más de un 40% con el tratamiento trombolítico (9).

## 2. Interrogantes abiertos sobre los tratamientos de reperfusión.

A pesar de la reducción en la mortalidad en fase aguda del infarto agudo de miocardio, consecuencia primero de la instauración de las Unidades Coronarias, y más tarde de las estrategias de reperfusión coronaria (farmacológicas en un primer momento –trombolíticos- y percutáneas después), no se ha constatado del mismo modo una reducción de la incidencia y prevalencia de insuficiencia cardíaca, aunque sí un desplazamiento a grupos poblacionales de más edad (3). De hecho, estudios en los que se constataba una elevada utilización de trombolíticos en la fase aguda del infarto agudo de miocardio (17) todavía documentaban tasas de insuficiencia cardíaca (secundarias a depresión de la función contráctil) superiores al 20%, con cifras de mortalidad a 6 meses que doblaban las del primer mes. Así pues, a pesar de las estrategias de reperfusión coronaria, un buen número de pacientes que sobreviven al infarto agudo de miocardio acaba presentando una afectación de la función ventricular izquierda que condicionará su pronóstico en el futuro. En esta dirección, la magnitud de la disfunción ventricular izquierda es el segundo factor, después de una edad superior a 65 años, que más se correlaciona con la mortalidad en el seguimiento (12;18). Existe una relación logarítmica inversa entre la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y la mortalidad cardíaca postinfarto de miocardio, que se hace más marcada a partir de fracciones de eyección inferiores al 40% (18). En definitiva, en el infarto agudo de miocardio, las estrategias de reperfusión (farmacológicas o, más recientemente, angioplastia primaria), se dirigen a la preservación de la función ventricular, es decir: a la salvación de todo el miocardio posible, no sólo en términos de viabilidad, sino de funcionalidad. Como se ha introducido en el inicio, el beneficio está íntimamente ligado a la “calidad de la reperfusión”, asociándose una preservación de la función ventricular izquierda y, por tanto, mejor supervivencia con flujos normalizados (TIMI 3) respecto a aquellos flujos más pobres (TIMI 1-2), o frente a aquellos que presentan reoclusión en las horas siguientes, como se demostró en el estudio GUSTO-I (6;19). Así, en los últimos años las estrategias de reperfusión se han acompañado de un ingente número de tratamientos antitrombóticos coadyuvantes a los tratamientos trombolíticos o percutáneos con el fin de mejorar el flujo coronario en la arteria responsable del infarto (20).

Sin embargo, estas intervenciones se acompañan de algunos problemas o interrogantes:

- 1) El beneficio de la reperfusión se obtiene en la fase aguda o fase hospitalaria, sin incrementos extras del beneficio después de la fase hospitalaria, fenómenos atribuidos a una reperfusión con flujo pobre, a reoclusiones o reinfarto, o a la mortalidad derivada de una depresión de la función ventricular a pesar de sobrevivir a la fase hospitalaria(6).
- 2) Existe un riesgo adicional por el tratamiento recanalizador en las primeras 24 horas (8). Este aumento de la mortalidad en el primer día se ha atribuido a un posible incremento del número de arritmias, o a la presencia de áreas hemorrágicas en el infarto(21;22). Durante un tiempo se ha postulado si el tratamiento recanalizador se asociaba a un aumento del riesgo de rotura miocárdica, pero la pobre incidencia de defectos septales encontrada en el ensayo GUSTO-I, así como la pobre incidencia de complicaciones mecánicas que siguen a la angioplastia primaria sugiere que la reperfusión no aumenta el riesgo de rotura(22).
- 3) Desde un primer momento se sabía, a partir de modelos experimentales de mediados de los años 70, de la presencia de un daño miocárdico adicional al reoxigenar el miocardio previamente isquémico (23). A este daño se le llamó “daño por reperfusión”, y aunque la controversia sobre su relevancia clínica sigue viva, la cohesión de las observaciones en modelos experimentales durante los últimos 20 años, se ha visto reflejada en la búsqueda de estrategias que disminuyan el daño por reperfusión en dichos modelos, y en continuados intentos por probar algunas de estas maniobras en contextos clínicos, ya sea a nivel de protección cardíaca (24) en el ámbito de la cirugía cardíaca, o en el contexto de síndromes coronarios agudos en los que se plantean estrategias de reperfusión coronaria (25).

### **3. El daño por isquemia y reperfusión miocárdica.**

Como se ha introducido anteriormente, el prerrequisito para salvar miocardio que está amenazado por una oclusión coronaria es el restablecimiento del flujo sanguíneo. En el infarto



agudo de miocardio, este objetivo se puede conseguir ya sea mediante administración de tratamiento trombolítico o mediante una intervención coronaria percutánea. Sin embargo, la reperfusión se acompaña de un precio en términos de amenaza directa al miocardio (25-28). El **daño por reperfusión miocárdico** puede definirse como la muerte de aquellos miocitos que llegan vivos al momento de la reperfusión como consecuencia de fenómenos directamente relacionados con el mismo proceso de la reperfusión. De otra manera: es el daño que puede prevenirse con tratamientos administrados en el momento de la reperfusión(29). Otros, como Kloner(27), han incluido en la definición no sólo aquellos fenómenos que afectan la viabilidad de los miocitos, sino también el funcionalismo de la macro y microcirculación coronaria; la pérdida transitoria de función contráctil aún en ausencia de muerte celular y la presencia de arritmias. De esta forma, se podrían describir cuatro tipos básicos de daño por reperfusión (27;29):

- a) la muerte celular inmediata por reperfusión o daño celular letal por reperfusión;
- b) el aturdimiento miocárdico;
- c) las arritmias de reperfusión;
- d) y, probablemente como consecuencia del fenómeno inflamatorio que acontece, el daño microvascular.

### **3.1. Daño celular letal por reperfusión.**

De los cuatro fenómenos descritos anteriormente, éste probablemente constituya el más importante. La existencia del daño letal por reperfusión ha sido debatida largamente y todavía es un tema controvertido (27-30). Uno de los problemas que para su cuantificación se tienen es que el desarrollo de la necrosis no se puede seguir en el tiempo (29) y que las evidencias que del mismo se han obtenido en modelos experimentales provienen de la modificación de la propia reperfusión, asumiendo, por consiguiente, que la reducción de la necrosis así obtenida se debe a una atenuación del “daño por reperfusión” (27-30).

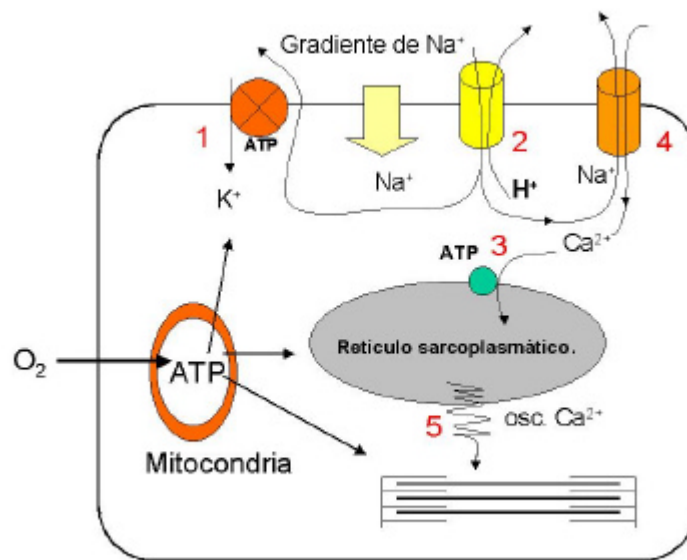
#### **3.1.1. Mecanismos implicados en el daño celular letal por reperfusión.**

Los principales mecanismos implicados en el daño letal por reperfusión son la recuperación de la síntesis energética y la normalización del pH y de la osmolaridad

intracelular, en presencia de concentraciones citosólicas anormalmente altas de  $\text{Ca}^{2+}$ . En el tejido miocárdico *in situ* también parece desempeñar un papel la extensión de la necrosis de célula a célula(26;29;31).

**3.1.1.1. La recuperación de la energía.** Durante la depleción energética existe una acumulación de cationes en el citosol ( $\text{Na}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$ ), debido a varios factores. De una parte, debido a un inadecuado funcionamiento de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa de membrana y de la bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa del retículo sarcoplasmático (encargados respectivamente de extraer  $\text{Na}^+$  del citosol y de acumular  $\text{Ca}^{2+}$  en el retículo sarcoplasmático en diástole, contra gradiente de concentración). Por otra parte, y de manera preponderante, el  $\text{Na}^+$  citosólico aumenta durante la isquemia como consecuencia de la caída del pH intracelular, que favorece la entrada de este ión en la célula a través del intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{H}^+$  y del cotransportador  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ . Esta elevada concentración de  $\text{Na}^+$  es la principal causa del acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular durante la isquemia, al intercambiarse por  $\text{Na}^+$  mediante el intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  del sarcolema (que funcionará en modo reverso, extruyendo sodio e internalizando calcio). Durante la reperfusión, cuando se recupera la carga energética celular a través de la síntesis de ATP mitocondrial, se ponen en marcha los diferentes transportadores iónicos que intentarán eliminar el exceso de calcio del citoplasma. La bomba de  $\text{Ca}^{2+}$  del retículo sarcomplasmático acumula  $\text{Ca}^{2+}$  en el interior de esta organela contra gradiente de concentración, en un fenómeno que consume ATP. Concomitantemente, la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa del sarcolema intenta eliminar el exceso de ion  $\text{Na}^+$  del citoplasma y recuperar por tanto el gradiente de  $\text{Na}^+$  transmembrana (en condiciones normales con un gradiente extracelular/intracelular  $\gg 1$ ). El  $\text{Na}^+$  puede continuar entrando en la célula en los primeros instantes de reperfusión mientras no se normalice el pH intracelular. Así, hasta que no se normalice el gradiente de  $\text{Na}^+$  transmembrana, este ión se intercambiará con  $\text{Ca}^{2+}$  extracelular a través del intercambiador  $\text{Na}^+ - \text{Ca}^{2+}$  (**figura 1**). Así pues, el resultado final será la presencia de elevadas concentraciones de calcio citoplasmático. En los primeros minutos de la reperfusión, la capacidad del retículo plasmático para acumular calcio en su interior puede verse superada, ocasionando la entrada y salida de forma cíclica de este ión de la organela al citoplasma y viceversa, en lo que se conoce como variaciones cíclicas del calcio. Estas variaciones finalizarán cuando la célula haya podido extruir suficiente

calcio al exterior celular, en un fenómeno en el que colabora el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-Ca}^+$ , funcionando en modo anterógrado(32). Pero si la célula no ha podido eliminar el exceso de calcio citosólico y en cambio ha podido recuperar la síntesis energética, puede disponer de suficiente ATP y un exceso de calcio que acaben ocasionando una activación de las miofibrillas incontrolada. El exceso de fuerza contráctil, de forma sostenida, causa un acortamiento celular que daña las estructuras del citoesqueleto, y que puede llegar a un punto de irreversibilidad. El estado resultante de acortamiento celular irreversible se define como **hipercontractura** (26).



**Figura 1.** (1) Bomba  $\text{Na}^+\text{-K}^+$  ATPasa de la membrana celular. (2) Intercambiador sodio-protón. (3) Bomba de calcio del retículo sarcoplásmico. (4) Intercambiador sodio-calcio funcionando en modo reverso debido al exceso de  $\text{Na}^+$  citoplasmático.(5) Representación de las entradas y salidas de calcio del retículo sarcoplásmico al sobrepasarse la capacidad del mismo para acumular calcio en su interior.

Esta contracción celular que sobrepasa los límites de la reversibilidad se ha estudiado y reproducido ampliamente en modelos de cardiomiocitos aislados sometidos a anoxia y posterior reoxigenación. En el tejido in situ, la hipercontractura de cardiomiocitos adyacentes puede dar lugar a la rotura del sarcolema y, por tanto, a la muerte celular (26;29;31).

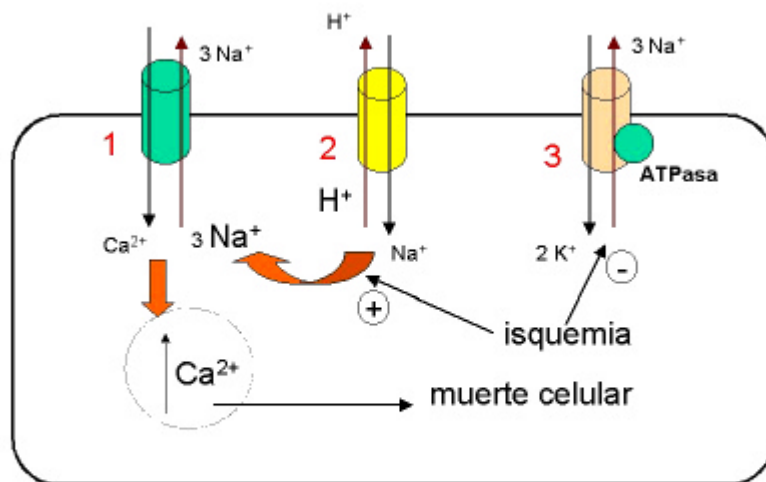
La muerte por hipercontractura ha podido inhibirse mediante el bloqueo directo de las miofibrillas en la reperfusión inicial. Así, la administración de 2,3-butanedionemonoxima (BDM) se ha utilizado en modelos experimentales, desde los cardiomiocitos aislados(33) hasta el corazón porcino in situ(34), consiguiendo con ello la reducción del tamaño de infarto.

Desgraciadamente, la toxicidad de esta molécula no permite su administración con fines terapéuticos.

Como se ha comentado previamente, los picos en la concentración de calcio citosólico junto con la recuperación energética pueden condicionar el desarrollo de hipercontractura celular. Además, la propia isquemia que precede a la reperfusión del miocardio aumenta la susceptibilidad de las miofibrillas al exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  citosólico, provocando que esta respuesta hipercontráctil pueda acontecer con niveles de calcio que no serían nocivos para una célula normal(35).

**3.1.1.2. La normalización del pH intracelular.** El metabolismo anaeróbico celular durante la isquemia provoca una acumulación de protones ( $\text{H}^+$ ) en el citoplasma, con un descenso del pH intracelular y del espacio intersticial. La acidosis intracelular tiene un efecto inhibitor de las miofibrillas similar al de la BDM (36), siendo por tanto un elemento protector de la hipercontractura.

El aumento del gradiente intracelular de  $\text{H}^+$  durante la isquemia provoca un intercambio de protones con sodio a través de la membrana celular gracias al intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$ . Posteriormente, y favorecido por la pobre capacidad funcional de la bomba de  $\text{Na}^+-\text{K}^+$  ATPasa para extruir sodio del citoplasma, la activación del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$  condicionará un intercambio de  $\text{Na}^+$  por  $\text{Ca}^{2+}$ , que causa el acúmulo de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. En la reperfusión inicial, se produce una rápida resolución de la acidosis extracelular, con lo que existe un importante gradiente de  $\text{H}^+$  intra-extracelular. Debido a ello, se ponen en marcha los mecanismos celulares de extrusión de  $\text{H}^+$  (intercambiador  $\text{Na}^+-\text{H}^+$  y cotransportador  $\text{Na}^+-\text{HCO}_3^-$ ), cuyo resultado final es el de favorecer el acúmulo de sodio intracelular, que se intercambiará con calcio a través del funcionamiento en modo reverso del intercambiador  $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ . El resultado final de ambos procesos es, por una parte, la pérdida del efecto inhibitorio que sobre las miofibrillas ejercía la acidosis intracelular y, por otra parte, el incremento del calcio citosólico en los primeros momentos de la reperfusión al tiempo que acontece la reenergización celular (como se describió en el apartado anterior). La **figura 2** representa la interrelación entre los diferentes transportadores de membrana durante la isquemia y reperfusión miocárdica.



**Figura 2.** Representación de la interrelación entre los diferentes transportadores de membrana. (1) Intercambiador  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$ ; (2) Intercambiador  $Na^{+}$ - $H^{+}$ ; (3) Bomba de  $Na^{+}$  ATPasa. La activación del intercambiador  $Na^{+}$ - $H^{+}$  acontece como consecuencia, sobre todo de la acidosis intracelular. El exceso de  $Na^{+}$  no puede eliminarse correctamente dada la inhibición de la bomba de  $Na^{+}$ , cosa que provoca aumento de  $Na^{+}$  intracelular y posteriormente de  $Ca^{2+}$ . (Basado en Karmazyn et al.(37)).

Cabe comentar que el aumento del pH intracelular en la reperfusión inicial puede tener otros efectos adversos potenciales, como son la activación de enzimas  $Ca^{2+}$ -dependientes (proteasas y fosfolipasas) con la consecuente inactivación de otras proteínas(38;39), así como la apertura del poro de transición mitocondrial(40). El poro de transición mitocondrial es un canal no selectivo que comunica la matriz mitocondrial con el citosol permitiendo el paso de moléculas de menos de 1KD. Su apertura masiva conlleva la despolarización de la mitocondria, con la pérdida del gradiente de protones y, por tanto, la incapacidad para sintetizar ATP, además de permitir la liberación de  $Ca^{2+}$  mitocondrial. Aunque bajas concentraciones de ATP y aumentos del  $Ca^{2+}$  intracelular, como los que ocurren durante la isquemia miocárdica, favorecen la apertura del poro de transición mitocondrial, la acidosis es capaz de inhibirla(41), pero las condiciones de la reperfusión, con recuperación del pH y presencia de radicales libres, pueden favorecer su apertura(42).

Estrategias farmacológicas encaminadas a inhibir el intercambiador  $Na^{+}$ - $H^{+}$  se han mostrado efectivas en disminuir el daño por isquemia y reperfusión, cuando se han administrado antes de la isquemia (37;43;44), cosa que ha limitado su utilización clínica. A

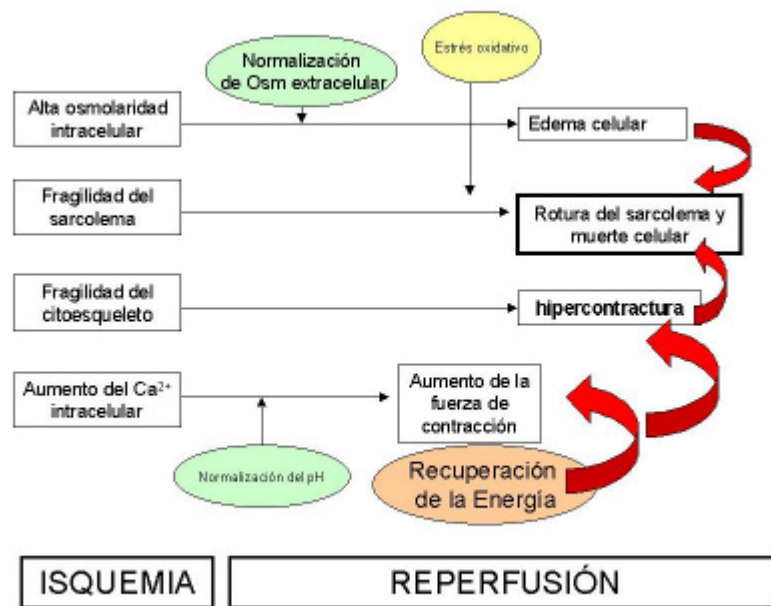
pesar de ello, se han ensayado propuestas de administración de un inhibidor del intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  (cariporide) en el contexto de síndromes coronarios agudos y/o enfermos sometidos a cirugía de revascularización coronaria o a angioplastia de riesgo (ensayo GUARDIAN (45)), con resultados beneficiosos sobre placebo en aquellos pacientes sometidos a revascularización quirúrgica (menor incidencia de infarto y muerte) y que, por tanto, recibían el fármaco antes de la situación de isquemia y reperfusión.

**3.1.1.3. Normalización de la osmolalidad tisular.** Durante el período de isquemia previo a la reperfusión, se produce una acumulación intra y extracelular de metabolitos derivados del metabolismo anaeróbico. Como se ha comentado anteriormente, el intercambiador  $\text{Na}^+\text{-H}^+$  colabora en incrementar la carga de  $\text{Na}^+$  intracelular(46). En la subsiguiente reperfusión, el lavado de metabolitos del espacio extracelular, así como el exceso de  $\text{Na}^+$  intracelular colaboran en el establecimiento de un gradiente favorable al paso de agua al interior celular, facilitando así el desarrollo de edema (47) que, aunque por él mismo no produzca necrosis, supone un estrés añadido sobre las estructuras celulares que se ven debilitadas por la isquemia precedente(48). En este sentido, se ha observado en cardiomiocitos aislados que el estrés osmótico tan sólo condiciona la disrupción del sarcolema en aquellas células que desarrollan hipercontractura y que previamente se han visto sometidas a deprivación energética prolongada(48). Estudios en los que la reperfusión se ha llevado a cabo en un ambiente hiperosmótico han conseguido limitar la muerte celular(47;49). Finalmente, la reperfusión inicial puede contribuir a aumentar la fragilidad del sarcolema mediante daño por radicales libres de oxígeno, daño que puede verse atenuado al aumentar el *pool* celular de glutatión o gracias a la administración de antioxidantes(26).

**3.1.1.4. Propagación de la necrosis célula a célula.** A diferencia de lo que ocurre en modelos de células aisladas, en el miocardio *in situ*, las células se encuentran conectadas entre sí. Las uniones por canales intercelulares (gap junctions) favorecen el paso de iones y metabolitos que juegan un papel clave en que la hipercontractura celular pueda propagarse de célula a célula. Así, la necrosis por hipercontractura afecta a grupos de células adyacentes, muy reducidas en longitud, con su arquitectura muy dañada y con rotura del sarcolema, dando lugar al patrón

histopatológico conocido como necrosis en bandas de contracción(50;51). El bloqueo selectivo de los *gap junctions* en la reperfusión inicial en modelos experimentales ha sido una maniobra efectiva para evitar la propagación de la necrosis(52). Otros tipos de unión intercelular fuerte (fascia adherente y desmosomas) hacen que cuando las fuerzas de tensión entre las células sean muy altas pueda llegar a romperse el sarcolema.

La **figura 3** muestra de forma resumida los diferentes componentes que finalmente conducen a la la muerte celular por hipercontractura en los primeros minutos de la reperfusión.



**Figura 3.** Esquema evolutivo en el tiempo de la intervención de los diversos factores que acaban provocando el daño celular letal por reperfusión. Basado en HM Piper et al, Ann Thorac Surg 1999(26).

### 3.2. Aturdimiento miocárdico.

Se define así la disfunción contractil transitoria que ocurre en el miocardio reperfundido a pesar de no existir daño irreversible. La duración de la disfunción es por definición transitoria y excede ampliamente la duración del insulto isquémico(28). La evidencia clínica de su existencia es amplia, habiéndose documentado alteraciones transitorias reversibles, en períodos que van de días a varias semanas, en los ensayos clínicos de trombolíticos en fase aguda de un infarto agudo de miocardio, así como en pacientes sometidos a cirugía de derivación aorto-coronaria. La administración de agentes inotrópicos puede atenuar su

expresión clínica. Se han implicado dos mecanismos fundamentales para su aparición asociada a la reperfusión: la sobrecarga intracelular de calcio y el daño mediado por radicales libres de oxígeno (RLO) (27;28;53-55), siendo probablemente complementarios. Tanto los RLO generados durante la reperfusión, como la sobrecarga de calcio y la activación enzimática subsiguiente de calpaínas, pueden dañar membranas celulares y alterar proteínas contráctiles(56), especialmente la troponina I, molécula que puede estar parcialmente degradada en la reperfusión inicial(39). En definitiva, el aturdimiento consiste en una enfermedad de los miofilamentos contráctiles, que ven reducida la sensibilidad al calcio. Los mismos RLO pueden alterar la capacidad del retículo sarcoplasmático para acumular calcio en su interior(30).



**Figura 4.** Esquema de la implicación del daño mediado por radicales libres de oxígeno y la sobrecarga intracelular de calcio en el desarrollo del aturdimiento miocárdico. PMN: leucocitos polimorfonucleares. Basado en Opie(54) y Bolli(55).

### 3.3. El daño microvascular.

En 1974 Kloner y colaboradores describieron que tras la oclusión durante 60-90 minutos y posterior reperfusión de una arteria coronaria, persistían defectos de perfusión subendocárdicos cuando un colorante se inyectaba en la circulación. A esta imposibilidad de reperfundir el miocardio previamente isquémico se la denominó “no reflujo” (27). Además, las zonas de “no reflujo” se incrementaban a medida que aumentaba el tiempo de reperfusión,



cosa que reflejaba un daño vascular que ocurría propiamente en la reperfusión, dejando en duda si este fenómeno contribuía a la muerte celular. Los estudios experimentales han demostrado que en el fenómeno de “no reflujo” juegan un papel fundamental los polimorfonucleares (PMN) activados y su interacción con el endotelio microvascular y las plaquetas. En este sentido, la reperfusión del miocardio se acompaña de la liberación de citoquinas proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral alfa, la interleukina 1 y 6. Estas citoquinas inducen la expresión de moléculas de adhesión en la superficie endotelial y de neutrófilos (57). Los neutrófilos participan activamente en la respuesta inflamatoria que acontece durante la reperfusión(58): existe una correlación directa entre la duración de la isquemia, el tamaño del infarto y el acúmulo de neutrófilos en el miocardio(59). Aunque esta relación puede ser una asociación no causal, para algunos autores tanto la inducción de neutropenia, como la inhibición de la adhesión de los neutrófilos, han resultado ser maniobras cardioprotectoras(60). Sin embargo, el hecho de que estos fenómenos queden circunscritos a las áreas de necrosis donde probablemente los miocitos están dañados de forma irreversible, hacen que para muchos autores estos fenómenos sean consecuencia, más que causa, de muerte inmediata celular(28).

**3.3.1. Interacción de PMN y complemento.** La participación de los neutrófilos se inicia con su atracción mediante factores quimiotácticos como son el fragmento C5a del complemento, la interleukina 8, y el factor transformador de crecimiento alfa (TGF- $\alpha$ ). El complemento se activa ya durante la isquemia (si los períodos de isquemia son superiores a 45 min(58)), favoreciendo el depósito del complejo C5b-9 sobre membranas celulares de los miocitos, fenómeno que puede alterar el balance de electrolitos y agua en las células. En el proceso de activación del complemento, se forman anafilotoxinas (C3a, C5a) que contribuyen a la quimiotaxis de PMN y al daño vascular.

**3.3.2. Adhesión de PMN al endotelio vascular.** Atraídos por factores quimiotácticos presentados por la matriz extracelular endotelial, los PMN enlentecen su flujo mediante un fenómeno de rodamiento sobre el endotelio, gracias a la interacción ligera entre moléculas de adhesión del endotelio y los PMN(61). Estas moléculas de adhesión o selectinas pertenecen a

tres familias: E-selectina (ELAM-1), L-selectina (LAM-1, LECAM-1, Mel-14) y P-selectina (GMP-140, PADGEM). La L-selectina está expresada constitutivamente en neutrófilos y monocitos. La E y P-selectinas se expresan mayoritariamente en células endoteliales activadas. La P-selectina también se encuentra en plaquetas activadas. La expresión de ambas moléculas (E y P-selectina) es inducible en respuesta a estímulos inflamatorios. Los PMN ruedan por el endotelio gracias a la interacción de la L-selectina del neutrófilo con sus ligandos en el endotelio (los sialyl Lewis X y A). La participación de la L y P-selectina ocurre relativamente pronto durante la reperfusión.

Tras la adhesión ligera al endotelio, se establece una unión *firme* de los PMN al endotelio gracias a la movilización desde sus depósitos intracelulares hacia la membrana de los PMN del complejo CD11/CD18 (integrina  $\beta_2$ )(20;58;60). Estas integrinas son complejos glicoproteicos formados por una unidad  $\alpha$  y una unidad  $\beta$  (CD18). La unidad  $\alpha$  puede ser de tres tipos: CD11a (LFA-1); CD11b (Mo1, Mac-1) o la CD11c(gp150). El complejo CD11/CD18 se une de forma estable con su ligando en el endotelio, que puede ser la partícula de opsonización del complemento iC3b, o las moléculas de adhesión intercelulares (ICAMs). Probablemente, las partículas del complemento actúan como ligando de CD11/CD18 en las primeras fases de la reperfusión, mientras que las ICAMs son responsables de la interacción con los PMN en fases más avanzadas de la respuesta inflamatoria asociada a la reperfusión.

Una vez los PMN han quedado firmemente anclados al endotelio, se procede a la migración de los mismos a través de interacciones del CD18 con integrinas de las uniones intercelulares del endotelio. En su camino fuera de la luz vascular, los PMN liberan colagenasas, elastasas y radicales libres de oxígeno que favorecen el daño tisular, al tiempo que facilitan su camino.

**3.3.3. Interrelación entre PMN, endotelio y plaquetas.** La firme unión de los neutrófilos al endotelio capilar provoca la obstrucción mecánica del flujo(57), al tiempo que la reserva vasodilatadora de los vasos sometidos previamente a isquemia está alterada debido a la reducción en la generación de factores vasodilatadores como óxido nítrico (NO) o prostaciclina, y al aumento en la producción de endotelina. Igualmente, existe una interrelación directa entre PMN activados y plaquetas (activadas por los primeros) en su interacción con la placa

coronaria complicada, el propio trombo o el endotelio disfuncionante. Las mismas plaquetas liberan productos que reclutan más plaquetas activadas, colaborando en el daño tisular y favoreciendo la vasoconstricción que, en último término, acaba limitando el flujo en la microcirculación. Aunque sin duda las plaquetas colaboran en el daño microvascular, en un modelo experimental de corazón porcino *in situ*, el tratamiento con anti IIb/IIIa no redujo la acumulación de plaquetas ni PMN en el miocardio reperfundido, así como tampoco se redujo el tamaño del infarto, a pesar de evitar las variaciones cíclicas del flujo a nivel del punto de oclusión de la arteria (efecto antitrombótico puro)(62). Igualmente, intentos primariamente dirigidos a bloquear el receptor IIb/IIIa de las plaquetas como tratamiento coadyuvante al tratamiento trombolítico no se han mostrado superiores al tratamiento trombolítico estándar en el contexto de infartos agudos de miocardio con elevación del ST, en cuanto a reducción de la mortalidad(63;64), a pesar de reducir el reinfarto hospitalario y la angina recurrente. En este sentido, han cobrado fuerza estrategias dirigidas a bloquear la interacción del endotelio vascular con PMN y de PMN con plaquetas a través del bloqueo de la P-selectina mediante anticuerpos recombinantes(65).

### **3.4. Arritmias de reperfusión.**

En estudios experimentales se ha comprobado que la presencia de arritmias en el momento de reperfundir el miocardio es un hecho reproducible y predecible(30). La severidad de las arritmias va desde la presencia de extrasistolia ventricular hasta la presencia de fibrilación ventricular. En su etiopatogenia se han implicado diversos mecanismos: el estrés adrenérgico, acumulación de lisofosfatidilcolina (resultante de una alteración del metabolismo lipídico), alteraciones en la homeostasis del calcio, y la presencia de radicales libres de oxígeno(28). Con respecto a la homeostasis del calcio, se ha asociado la presencia de arritmias de reperfusión al aumento en la concentración de calcio intracelular que, dada la heterogeneidad de sus concentraciones en zonas vecinas de miocardio (influenciadas no sólo por la concentración de calcio intracelular, sino por las oscilaciones cíclicas del calcio y el grado de cierre o apertura de las gap junctions), pueden favorecer la presencia de mecanismos de reentrada(66). Maniobras dirigidas a reducir la sobrecarga de sodio y calcio en la reperfusión inicial han reducido la presencia de arritmias durante la reperfusión en un modelo de corazón

porcino *in situ*(44). Con respecto al estado de los *gap junctions* durante la reperfusión inicial, la administración de un bloqueante de los mismos como es el heptanol se asoció a un ligero aumento de la presencia de fibrilación ventricular en la reperfusión(52), a pesar de proteger de la muerte celular inmediata al evitar la extensión de los cambios iónicos entre células vecinas. En último término, y con respecto al papel del estado oxidativo durante la reperfusión miocárdica, se han ensayado diversas estrategias para la administración de antioxidantes en la reperfusión, tanto *in vivo*, como *in vitro*, que se han demostrado útiles en reducir la incidencia de estas arritmias en los primeros segundos de reperfusión(28;67).

A pesar de lo expuesto anteriormente, y de su reproducibilidad en modelos experimentales, la presencia de estas arritmias en humanos no ha tenido la magnitud que se esperaba con el advenimiento de los tratamientos trombolíticos. Probablemente se deba a que la incidencia de arritmias disminuye a medida que se aumenta el tiempo de isquemia que precede a la reperfusión, y a que la reperfusión con tratamientos trombolíticos acontece en general de forma gradual y no tan bruscamente como en los modelos experimentales(27). La mayoría de las arritmias que se describen en pacientes sometidos a trombolisis en el curso de un infarto de miocardio son extrasistolia ventricular y ritmo idioventricular acelerado, siendo poco específicas en predecir el éxito de la reperfusión.

#### **4. 3',5' guanosín monofosfato cíclico (GMPc).**

##### ***Síntesis, implicación cardiovascular y papel en el miocardio reperfundido..***

El GMPc proviene de la conversión del guanosín trifosfato (GTP) citosólico gracias a la actividad de guanilil-ciclasas (GC) específicas, que responden a diversas señales como pueden ser el óxido nítrico (NO), ligandos peptídicos o cambios en la concentración de calcio intracelular(68). Las acciones intracelulares del GMPc comprenden desde la activación de protein-quinasas, el control de ciertos canales, y la regulación de fosfodiesterasas que, a su vez, participan en la degradación de otros nucleótidos cíclicos.

#### 4.1. Síntesis. Guanilil-ciclasas.

La actividad guanilil-ciclasa puede encontrarse en forma soluble y en fracciones particuladas en la mayoría de células(68;69). Estas dos actividades se corresponden con dos tipos de proteínas. La forma soluble (GCs) está formada por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que a su vez presentan dos isoformas  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ ;  $\beta_1$  y  $\beta_2$ ). La porción C-terminal de ambas subunidades tiene una alta coincidencia con la adenilil y guanilil ciclasa particulada, cosa que es sugestiva de que se trate del dominio catalítico del complejo. La forma particulada (GCp) se encuentra en los receptores de péptidos natriuréticos de membrana. Así, las primeras descritas fueron la GC-A y la GC-B. Se encuentran formadas por un dominio extracelular que actúa de ligando de los péptidos natriuréticos; por una única porción transmembrana; y por una porción intracelular que realiza funciones reguladoras, de dimerización y las propiamente catalíticas. Como se ha comentado previamente, las porciones C-terminales del dominio catalítico mantienen un alto grado de identidad con las secuencias C-terminal de las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  de la guanilil-ciclasa soluble. Posteriormente se identificaron cinco nuevas formas de GCp: de la GC-C a la GC-G. La **tabla 1** muestra una relación de las diferentes GC particuladas conocidas y de sus ligandos extracelulares conocidos.

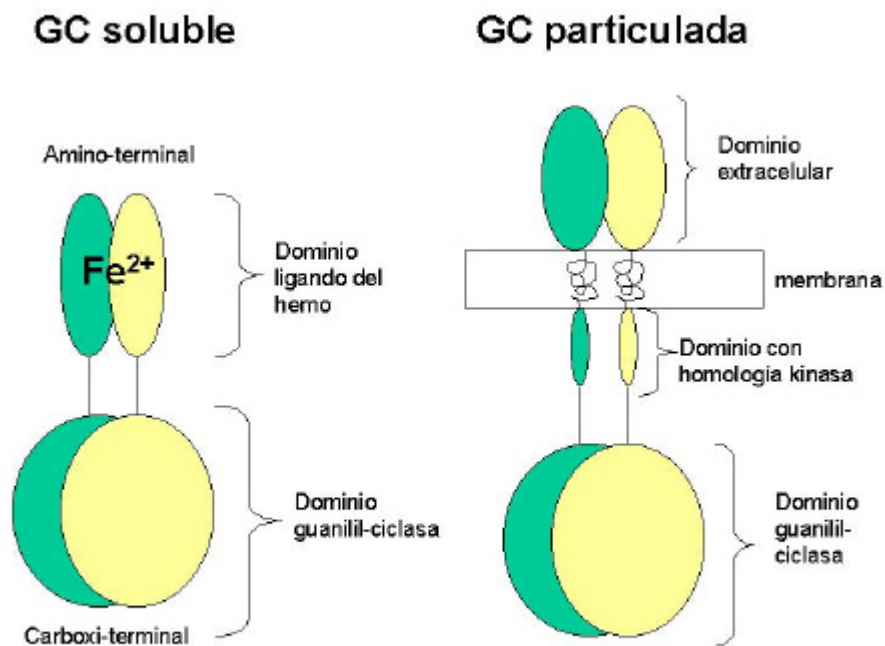
Receptor	Ligando	Distribución tisular
GC-A (RPN-A)	PNA, PNB	adipocitos, glándula adrenal, ileo, riñón, placenta, cerebelo, corazón, pituitaria, clóquea, timo, ovario
GC-B (RPN-B)	PNC	placenta, médula adrenal, cerebelo, pituitaria, aorta, aurícula, pulmón, intestino, testes, ventrículo, útero, timo, ovario
GC-C	enterotoxinas, guanilinas, uroguanilinas	mucosa intestinal, hígado en regeneración
GC-D	¿?	epitelio olfatorio
GC-E	¿?	retina, glándula pineal
GC-F	¿?	retina
GC-G	¿?	intestino, riñón, pulmón, músculo esquelético

**Tabla 1.** Isoformas de guanilil-ciclasa particuladas, sus ligandos y sus tejidos de distribución. PNA: péptido natriurético atrial; PNB: péptido natriurético cerebral. PNC: péptido natriurético C. Mientras que la forma GC-A se expresa en multitud de tejidos, la GC-C está confinada a la mucosa intestinal y a cánceres colorectales primarios o metastásicos.

##### 4.1.1. Guanilil-ciclasa soluble.

La GCs se expresa en el citoplasma de todas las células de mamíferos y media muchas e importantes acciones fisiológicas, como son: la inhibición de la agregación plaquetar,

la relajación del músculo liso, la vasodilatación (ligada a la anterior), transducción de señales neuronales e inmunomodulación(68). Esta enzima es un heterodímero que necesita de sus dos subunidades,  $\alpha$  y  $\beta$ , para mantener su función catalítica. Las isoformas más extendidas de las dos subunidades son la  $\alpha_1$  y  $\beta_1$ . Cada subunidad de la GCs se divide en 3 dominios, que son: el ligando del hemo, el de dimerización y finalmente el catalítico (**figura 5**). El dominio ligando del hemo está situado en la porción N-terminal de cada subunidad. La presencia de este grupo hemo es fundamental para ser activada por el óxido nítrico (NO). El grupo hemo contiene un átomo central de hierro que puede estar en su forma ferrosa o reducida ( $\text{Fe}^{2+}$ ), o en su forma férrica u oxidada ( $\text{Fe}^{3+}$ ). Este grupo hemo tiene gran afinidad por el NO, incluso en situaciones de alta concentración de oxígeno. La oxidación del grupo hemo a estado férrico condiciona la pérdida completa de la actividad. Así, agentes como grupos tiol, pueden mantener el hierro en su forma ferrosa y, por tanto, sensible al NO.



**Figura 5.** Esquema representativo de las dos estructuras básicas de la guanilil-ciclasa soluble y particulada. La forma soluble contiene un grupo hemo que tiene afinidad por el NO con el átomo de hierro en forma ferrosa. Este grupo forma una unión imidazólica con la His 105 de la subunidad  $\beta$ . Basado en K.A. Lucas et al., *Pharmacological Reviews* 2000(68) y D.C. Foster et al., *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999(70).

#### 4.1.2. Guanilil-ciclasa particulada.

La GCp están divididas en una porción extracelular, una porción intramembranosa y una porción intracelular (**figura 5**). Dos de las diferentes isoformas (A y B) se corresponden con los receptores de péptidos natriuréticos PNA, PNB (GC-A), y PNC (GC-B), como queda reflejado en la **tabla 1**(68;70). El dominio extracelular actúa como receptor de los péptidos natriuréticos, mientras que el dominio con homología kinasa, cuya función no es conocida del todo, podría tener efectos reguladores negativos sobre el dominio catalítico(70;71).

Los cardiomiocitos atriales producen PNA, que se sintetiza en forma de un preprolipéptido de 151 aminoácidos, cuya secuencia C-terminal contiene el péptido activo (28 aminoácidos:PNA 99-126)(68;72). Este último media funciones en el mantenimiento de la homeostasis cardiovascular, respondiendo a cambios de volumen y presión. Las funciones más conocidas del PNA son el estímulo de la natriuresis, la propia diuresis, el descenso de la presión arterial y la capacidad de inhibir la secreción de renina y aldosterona(68;72). El gen que codifica el PNA se encuentra también en el tejido renal. Allí el precursor se procesa de forma diferente, dando lugar a un péptido activo de 32 aminoácidos en el extremo aminoterminal, denominado urodilatina. Este péptido tiene funciones reguladoras sobre la excreción de agua y sodio, y no se encuentra en el plasma en condiciones normales(72;73). El PNB consiste en un péptido de 26 aminoácidos que se aisló de extractos de cerebro porcino, y más tarde pudo aislarse en plasma y en el corazón, presentando niveles elevados en pacientes afectados de hipertrofia ventricular izquierda y de insuficiencia cardíaca(72). El PNC es un péptido de 22 aminoácidos que, al igual que el PNB, se aisló inicialmente en cerebro porcino, pero cuya porción N-terminal no es homóloga con la de los PNA y PNB.

Los diferentes péptidos natriuréticos ejercen sus acciones a través de la activación de los dominios guanilil-ciclasa acoplados a la porción citoplasmática del receptor (**figura 5**). El PNA tiene máxima afinidad para su unión con la GC-A y menor para la GC-B. El PNB también se une a la GC-A, pero es 10 veces menos potente que el PNA en su capacidad de unión y estimulación de este receptor-guanilil-ciclasa. El ligando principal de la GC-B es el PNC(68;70;74;75).