

4.2. Efectos cardiovasculares predominantes del GMPc.

El GMPc media las respuestas intracelulares de hormonas, neurotransmisores, toxinas y diversos compuestos. La magnitud de esta respuesta, está medida por el grado de síntesis, por su degradación (mediada por fosfodiesterasas –PDE), y finalmente, a través de qué estructuras o moléculas media sus efectos: fundamentalmente protein-quinasas A y G, y canales de cationes dependientes de voltage(68). La actividad reguladora del GMPc sobre las fosfodiesterasas afecta no sólo a la degradación de GMPc sino también a la de AMPc. Estas acciones reguladoras se ejercen, ya sea directamente sobre la propia molécula o indirectamente a través de protein-quinasas, dependiendo del tipo de fosfodiesterasa sobre el que se actúa (10 tipos conocidos en mamíferos).

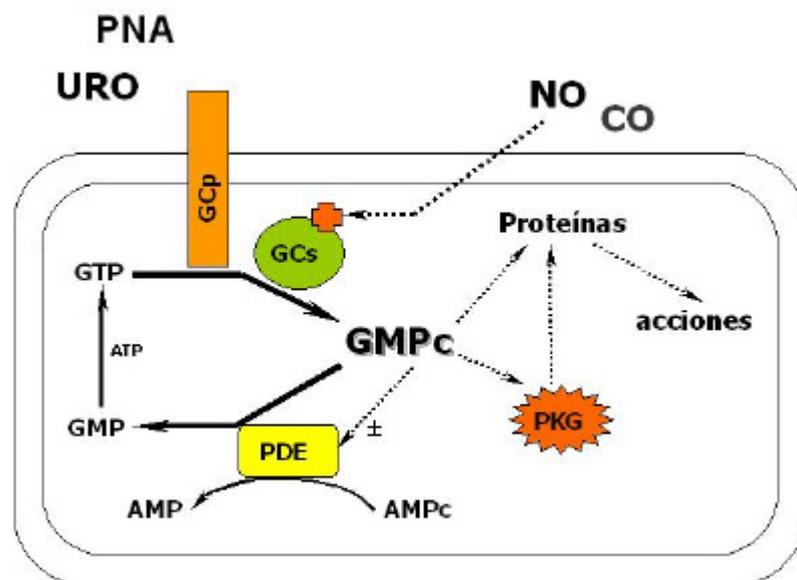


Figura 6. Representación de las vías de síntesis y degradación de GMPc, y de sus acciones directas sobre proteínas (canales), o a través de modificación de proteínas mediante protein-quinasas. GCP: Guanil-ciclase particulada o de membrana. GCs: Guanil-ciclase soluble. PDE: fosfodiesterasa. PKG: protein-quinasa G. PNA: péptido natriurético atrial. URO: péptido natriurético urodilatina. NO: óxido nítrico. CO: monóxido de carbono. Representado por gentileza de Luis Agulló.

4.2.1. Efectos sobre el músculo liso vascular.

El GMPc ejerce una acción vasodilatadora sobre las células musculares lisas vasculares a través de desensibilizar el aparato contráctil al calcio, y también disminuyendo la concentración

intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$). El mediador de la desensibilización del aparato contráctil al Ca^{2+} parece ser la protein-kinasa G-I. Con respecto a su capacidad de disminuir la $[Ca^{2+}]_i$, se han implicado cuatro mecanismos(68): [1] la reducción de la entrada de Ca^{2+} ; [2] el incremento en la salida de Ca^{2+} ; [3] el incremento en el secuestro de Ca^{2+} ; y [4] la disminución de la movilización del Ca^{2+} . Estas acciones se consiguen a través de:

- Inhibición de los canales de Calcio-L dependientes de voltage (de forma directa), y aumento de la polaridad de la membrana con apertura de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} , permitiendo así la salida de K^+ y aumentando la polaridad celular.
- Aumento en la salida de Ca^{2+} celular a través de incremento en funcionamiento de la bomba de Ca^{2+} -ATPasa de la membrana celular y del intercambiador Na^+ - Ca^{2+} . A su vez, este intercambiador funcionaría favorecido por otras acciones mediadas por el GMPc: (a) la activación de la bomba de Na^+ - K^+ (extruyendo sodio), y (b) gracias a la hiperpolaridad de la célula mediada por la apertura de los canales de K^+ .
- Secuestro de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmático activando la bomba de Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplasmático.
- Finalmente, el GMPc puede inhibir la transducción de la señal del inositol-trifosfato disminuyendo la movilización del calcio(31).

4.2.2. Efectos sobre el endotelio. Permeabilidad endotelial.

La estimulación de la síntesis de GMPc mediante la administración de péptidos natriuréticos es capaz de reducir la permeabilidad endotelial al paso de agua y macromoléculas en monocapas celulares de endotelio coronario por efectos dependientes de acciones mediadas a través de protein-kinasa G y de reducción del contenido celular de AMPc(76;77). Es interesante destacar que de estas acciones se derivan posibilidades terapéuticas como las que se han ensayado experimentalmente con éxito en la reperfusión del tejido pulmonar trasplantado, donde el aumento de las concentraciones de GMPc mediante la administración de óxido nítrico y zaprinast (un inhibidor selectivo de la fosfodiesterasa de GMPc) redujo significativamente el edema pulmonar(78).

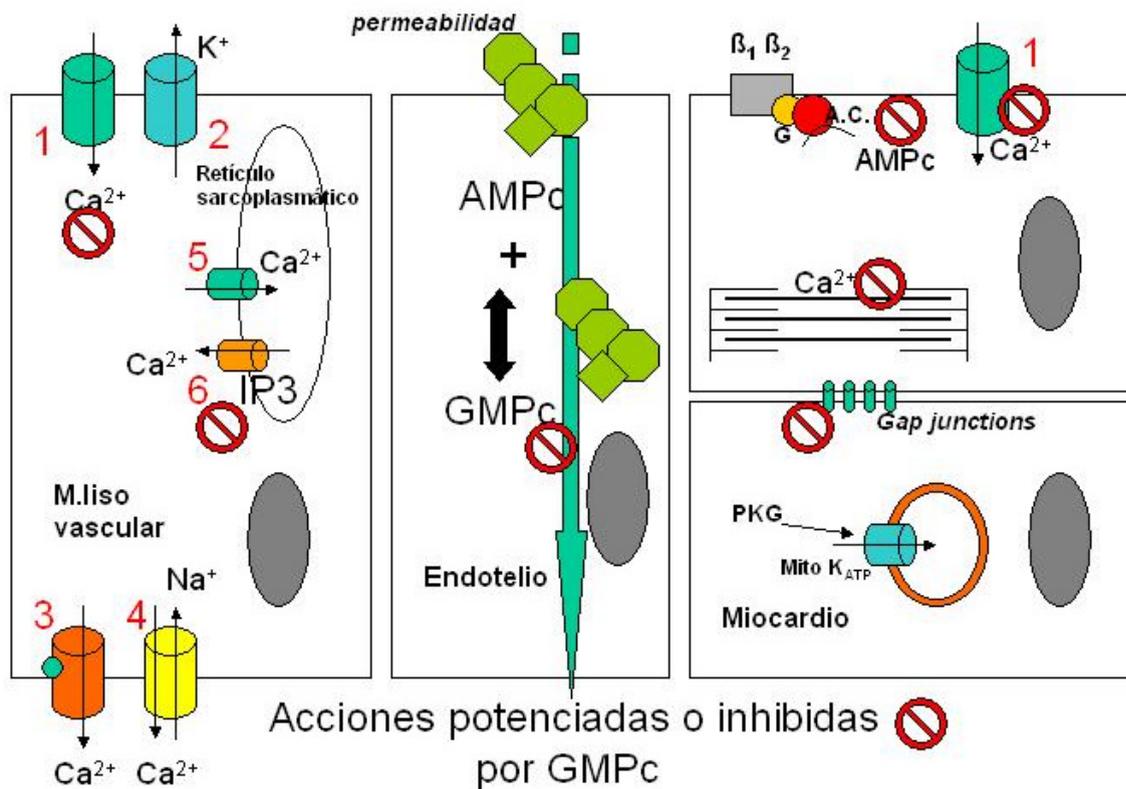


Figura 7. Representación de las principales acciones del GMPc sobre el músculo liso vascular, endotelio y miocardio. (1) Canal L de calcio, (2) Canal de K^+ dependiente de calcio, (3) Bomba de Ca^{2+} ATPasa, (4) Intercambiador Na^+-Ca^{2+} , (5) Bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplasmático, (6) Inhibición de la liberación de Ca^{2+} dependiente de IP3 (inositol trifosfato). En miocardio, $\beta_1 \beta_2$ representan la estimulación adrenérgica sobre el receptor acoplado a proteína G estimuladora; PKG: protein quinasa G.

4.2.3. Efectos del GMPc sobre el miocardio.

A nivel miocárdico, las acciones intracelulares mediadas por el GMPc son diversas:

- Puede disminuir la sensibilidad de las miofibrillas al calcio citosólico y, por tanto, tener un efecto inotrópico negativo (79-83).
- Contrarresta las acciones de la estimulación beta-adrenérgica y del AMPc (84-86). En este sentido, y a pesar de que no existe evidencia de acciones directas del GMPc sobre el intercambiador Na^+-Ca^+ , existe evidencia de la mediación de este intercambiador en los efectos inotrópicos positivos de la estimulación beta-adrenérgica mediada por AMPc(87). La reducción en los niveles intracelulares de AMPc que siguen a la estimulación de GMPc podría, por consiguiente, reducir la actividad de este intercambiador.

- Puede limitar la entrada de Ca^{2+} al citosol mediante la inhibición de los canales L de Ca^{2+} (88) (89), acciones que son dependientes de la activación o inhibición de fosfodiesterasas(90), que a su vez se activan mediante la fosforilación dependiente de protein-quinasas(91-93).
- Se han documentado efectos inhibitorios sobre la permeabilidad de los *gap junctions* por parte de péptidos natriuréticos atriales o por óxido nítrico(94;95).
- Finalmente, se ha documentado que contribuye al efecto protector del preconditionamiento isquémico al abrir los canales de K^+ dependientes de ATP, mediante la activación de la protein-kinasa G(96).

Este perfil de acciones e interrelaciones celulares del GMPc, en particular sus efectos inhibitorios de la contractilidad, su inhibición de los canales L de Ca^{2+} , y su implicación en reducir la conductancia a través de *gap junctions*, lo convierten en una diana terapéutica para la reducción del daño miocárdico por isquemia y reperfusión.

4.3. Elevación de la concentración de GMPc durante la isquemia y reperfusión miocárdica mediante estimulación farmacológica.

Como se ha comentado previamente, existen dos formas enzimáticas de guanilil-ciclasa: soluble y particulada. La primera es activada por el óxido nítrico, cuyo sustrato lo constituye la L-arginina(97), y la segunda es activada por péptidos natriuréticos. En el contexto de isquemia y reperfusión miocárdica, estudios previos han demostrado que el contenido miocárdico de GMPc está reducido durante la reperfusión que sigue a períodos de isquemia prolongados, ya sea en miocitos aislados(98) o en corazón de rata aislado(99).

4.3.1. Estimulación de la guanilil-ciclasa soluble.

4.3.1.1. Estimulación de la guanilil-ciclasa soluble. Evidencia experimental.

Los efectos que las concentraciones de óxido nítrico (NO) pueden tener sobre el miocardio sometido a isquemia y reperfusión no han sido aclarados en su totalidad. A pesar de algunos estudios han demostrado que tras varias horas de isquemia la inducción de la NO sintasa inducible (NOS_i) colabora en la producción de grandes cantidades de NO(100;101), la

mayoría de los estudios sugieren que la disponibilidad de NO está reducida en el miocardio reperfundido tras isquemia prolongada(102-106). La L-arginina es el único sustrato conocido para la síntesis de NO *in vivo* (107). Aunque en condiciones normales los niveles de L-arginina en el endotelio están por encima del rango de saturación de la NOS, el incremento de los niveles de L-arginina es capaz de aumentar la síntesis de NO (*paradoja de la L-arginina*), especialmente en condiciones en las que la NOS pueda estar parcialmente inhibida por productos endógenos como la dimetil-L-arginina(107;108), o por un transporte celular alterado de la L-arginina o de su regeneración desde la L-citrulina(109;110).

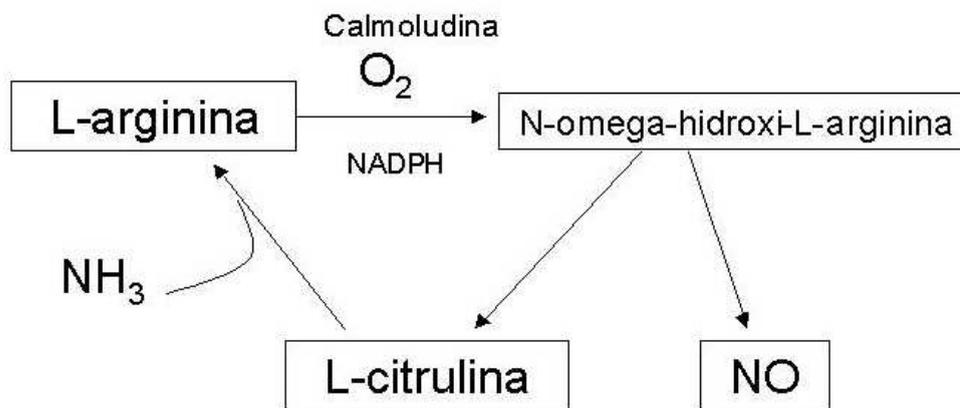


Figura 8. Vía clásica de generación de NO desde L-arginina y de su reciclaje desde L-citrulina con la incorporación de un nitrógeno. La NO sintasa (NOS), catalizadora de esta reacción, puede ser de tres tipos: NOS1(NOSn), NOS2(NOSi) o NOS3(NOSe). La NOS2 se ha identificado en macrófagos, miocardiocitos y m. liso vascular, entre otros. La NOS3 se ha identificado en endotelio, miocardiocitos y plaquetas, entre otros. Mientras que NOS1 y NOS3 requieren de altas concentraciones de Ca²⁺ para la unión de calmodulina, la NOS2 puede unirse a calmodulina a más bajas concentraciones de Ca²⁺, dada su mayor afinidad por la molécula(111;112).

Numerosos estudios dirigidos a aumentar la disponibilidad de NO en la reperfusión inicial (ya sea mediante la administración de donantes de NO o potenciando su síntesis) han conseguido mejorar la recuperación funcional del miocardio(104;113;113-119) y reducir la necrosis(102;103;105;115;116;120-122). El mecanismo de acción que se ha postulado en muchos de estos experimentos está relacionado con una preservación de la función endotelial y con una menor adhesión e infiltración de leucocitos polimorfonucleares (PMN)(**tabla 2**).

Tabla 2.

Detalle de estudios dirigidos a incrementar los niveles de NO en el contexto de isquemia y reperfusión miocárdica.

Autor	Modelo	Droga	Mecanismos *
Nakanishi et al.(120)	Perros anestesiados, corazón in situ	L-arginina intracoronaria	Menor acúmulo PMN
Weyrich et al.(103)	Gatos anestesiados, corazón in situ	L-arginina endovenosa pre-reperusión	Menor acúmulo PMN
Ma et al.(123)	Gatos anestesiados, corazón in situ	L-arginina endovenosa	Menor acúmulo PMN
Pernow et al.(121)	Cerdos anestesiados, corazón in situ	L-arginina retrógrada por seno coronario	
Engelman et al.(113)	Cerdos anestesiados, corazón in situ	L-arginina endovenosa pre-isquemia	Menor adhesión PMN
Maulik et al.(106;124)	Corazón aislado de rata	L-arginina pre-isquemia	Se constata aumento en niveles de GMPc en rep.
Li et al.(105)	Corazón aislado de rata	L-arginina y donante de NO	
Pabla et al.(114;125)	Corazón aislado de rata con infusión de PMN	L-arginina y donante de NO	Previene efecto deletéreo de la infusión de PMN
Schluter et al.(126)	Cardiomiocitos aislados	Donantes de NO	Menor fragilidad osmótica
Zhu et al.(127)	Ratas expuestas a tabaco	L-arginina	
Brunner et al.(115)	Corazón aislado de rata	L-arginina y donante NO	
Wang et al.(119)	Corazón aislado de rata	L-arginina	Se preserva actividad de NOS Ca ²⁺ dependiente
Lee et al.(128)	Cerdos anestesiados, corazón in situ	L-arginina en perfusión retrógrada antes de reperf.	
Mizuno et al.(99)	Corazón aislado de rata	L-arginina pre-isquemia	Menor actividad de inositol-trifosfato, menor [Ca ²⁺] cit.
Agulló et al.(102)	Corazón aislado de rata	L-arginina pre-isquemia	
Yoshida et al.(118)	Corazón aislado de rata	Donantes de NO	Activación protein-kinasa C
Kanno et al.(129)	Corazón aislado de ratón (deficientes en NOS)	Donantes de NO	Incremento de actividad de NOS

(*) Se detalla el mecanismo de protección sugerido por los autores.

L.Agulló et al.(102) demostró en un modelo de corazón aislado de rata y perfundido con cristaloides (exento por tanto de PMN) que la adición de L-arginina antes de la isquemia, aumentaba la producción de GMPc y reducía la liberación enzimática, protegiendo de la reoxigenación. Los efectos beneficiosos desaparecían al bloquear la GC soluble durante la reoxigenación.

4.3.1.2. Posibles efectos perniciosos del óxido nítrico.

En contraposición a los efectos beneficiosos que sobre el miocardio reperfundido reporta aumentar los niveles de NO, se han publicado observaciones en modelos de corazón aislado de rata(101;130) y conejo(131), en los que la administración de donantes de NO o L-

arginina se asocia a peor recuperación funcional del miocardio en reperfusión, favoreciendo el aturdimiento, efecto que se ha asociado a la producción de peroxinitrito. El mecanismo propuesto para la generación de peroxinitro (OONO^-) en el contexto de isquemia-reperfusión consiste en una producción inicialmente aumentada de NO durante la isquemia, pero avanzada la isquemia, la NOS (tal vez por una menor disponibilidad de L-arginina) puede reducir O_2 para formar O_2^- , que reaccionará con NO para formar OONO^- . La molécula de peroxinitro, a su vez generará radicales hidroxil y dióxido de nitrógeno ($\text{OH}\cdot$ y NO_2^-)(132), oxidantes muy nocivos(109;110;133), pero además, el peroxinitrito puede tener gran actividad inflamatoria estimulando la ciclooxigenasa e inhibiendo la protaciclín sintasa(132). Estos fenómenos pueden reducirse aumentando la disponibilidad del sustrato de la NOS (L-arginina). Sin embargo, una excesiva producción de NO, que también puede provenir de una síntesis no enzimática (para la cual también puede ser sustrato la D-arginina(134)), descrita en situaciones de estrés oxidativo(135), de bajo pH y gran capacidad reductora (como las que se dan en la isquemia)(136), puede favorecer en exceso la reacción de NO con O_2^- para la formación de peroxinitrito.

Finalmente, recientemente se han documentado efectos apoptóticos en cardiomiocitos mediados por NO con la activación secundaria de MAP-quinasas(137). Igualmente, se han constatado apoptosis en miocitos sometidos a isquemia simulada y reoxigenación, directamente relacionados con la síntesis de GMPc(138). La relevancia de estas observaciones sobre la necrosis miocárdica tras isquemia y reperfusión está por determinar.

4.3.1.3. Estimulación de la guanilil-ciclasa soluble. Estudios clínicos.

Los nitratos són ésteres polioles del ácido nítrico, siendo los más utilizados en clínica el trinitrato de glicerina o nitroglicerina, el dinitrato de isosorbide y el 5-mononitrato de isosorbide(139;140). Los nitritos, en cambio, son ésteres del ácido nitroso, siendo el más utilizado y conocido el nitrito de amilo(139). Ambos tipos de compuestos son capaces de generar NO a partir del ácido nitroso(139). La administración de nitratos en la fase aguda del infarto de miocardio es una práctica habitual aunque, por la evidencia que se desprende de los estudios controlados, su eficacia, en cuanto a la reducción de la mortalidad, es dudosa(141). En la segunda mitad de los años 80, Yusuf et al. publicaron un metaanálisis de 10 estudios en

los que se comparaba la administración de nitroglicerina o nitroprusiato endovenosos con placebo, iniciando el tratamiento en las primeras 24 horas de un infarto de miocardio(142). Los estudios publicados se fechan entre 1979 y 1985, siendo anteriores al uso generalizado de la trombolisis(143;144). Los resultados de este análisis mostraron un beneficio en cuanto a la reducción de la mortalidad en la primera semana, especialmente para la nitroglicerina endovenosa. A raíz de estos resultados, los estudios randomizados multicéntricos GISSI-3(145) e ISIS-4(146) compararon respecto a placebo el uso de una infusión endovenosa de nitroglicerina seguida de parche de nitratos cutáneo a las 48 horas, o de 5-mononitrato de isosorbide de liberación retardada, respectivamente. Ambos tratamientos se iniciaban en las primeras 24 horas de evolución de un infarto de miocardio, en una población que recibió tratamiento trombolítico en un 70% de los casos. Los resultados no mostraron beneficio significativo en cuanto a reducción de la mortalidad a 5 semanas. Estos resultados se comentarán con más detenimiento en la discusión.

4.3.2. Estimulación de la guanilil-ciclasa particulada.

Menos son los estudios que se han centrado en la estimulación de la guanilil-ciclasa particulada en el contexto de isquemia y reperfusión miocárdica. La diferencia fundamental en potenciar la síntesis de GMPc mediante la estimulación de la GCp es el hacerlo por una vía independiente del NO, evitando sus posibles efectos deletéreos, y sus acciones propias independientes del GMPc. La administración de factor natriurético atrial o de urodilatina (a concentraciones de 1µM) protege del daño por reoxigenación a cardiomiocitos aislados, con un incremento en la concentración celular de GMPc(98). En esta misma línea de investigación, experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio por Inserte et al.(147) sobre corazón aislado de rata, perfundido con solución cristaloides, y sometido a isquemia-reperfusión, mostraron que la estimulación de la GCp por la urodilatina, a concentración de 0.05µM administrada en la reperfusión, atenuaba la depleción de GMPc observada en el miocardio reperfundido, reducía la necrosis miocárdica, y mejoraba la recuperación funcional del miocardio. Los efectos se reproducían cuando se administraba un análogo del GMPc (8-Bromo-cGMP), reforzando el hecho de tratarse de efectos GMPc-dependientes.

4.3.3. Administración en humanos de L-arginina y péptidos natriuréticos.

La traducción de las posibles aportaciones que estas estrategias puedan suponer para su puesta en práctica en situaciones clínicas comparables, se ve reforzada por la administración en la clínica de L-arginina y de urodilatina con el fin de estimular la síntesis de NO en el primer caso, y de estimular la GCp en el segundo.

La administración de L-arginina endovenosa (30 g en perfusión de 30 min) a voluntarios sanos, provocó una caída de las resistencias vasculares sistémicas, con caída de la tensión arterial y con un aumento en los niveles de GMPc en plasma(148;149), documentándose igualmente una disminución de la agregación plaquetar ligera(150).

En pacientes dislipémicos y fumadores, la administración endovenosa o oral (a altas dosis) de L-arginina se ha seguido de una mejoría en la capacidad de vasodilatación dependiente del endotelio, sin efectos indeseables(151-153). Efectos similares se han observado en las arterias coronarias de pacientes con enfermedad coronaria no obstructiva(154) y en pacientes con enfermedad coronaria y angina de esfuerzo(155;156). Se ha documentado disminución de los niveles de P-selectina y de ICAM tras la administración crónica de 9g de L-arginina al día en pacientes coronarios(157).

La administración endovenosa(158) u oral(159) de L-arginina mejora el flujo sanguíneo arterial y aumenta la capacidad funcional de los pacientes afectados de arteriopatía periférica en comparación con placebo.

La L-arginina, se ha administrado asimismo a pacientes con insuficiencia cardíaca (clase II-III de la NYHA). En ellos la tensión arterial disminuyó con un aumento del gasto cardíaco (sin aumento de frecuencia cardíaca), pero con una vuelta a los valores previos al para la infusión(160).

La urodilatina se ha inyectado en bolus a voluntarios sanos consiguiendo respuestas diuréticas dobles de las conseguidas con el PNA, pero con un pobre efecto hipotensor (sólo visible a dosis elevadas)(73). La molécula se ha administrado a pacientes con insuficiencia cardíaca en infusión endovenosa, objetivando un aumento de la diuresis y natriuresis, con disminución de la precarga y ligera caída de la presión arterial. La frecuencia cardíaca permaneció inalterada y no se documentaron efectos adversos respecto a placebo(161).

Igualmente se han llevado a cabo estudios fase II para la administración de urodilatina a dosis de 30 a 60 ng/Kg/min en pacientes afectados de insuficiencia renal aguda y de asma bronquial, habiendo mostrado efectos dispares en la prevención de la insuficiencia renal, y efectos beneficiosos en las crisis asmáticas(73).