

Resultados. Administración de urodilatina.

1. Estudios en el corazón aislado de rata.

1.1. Efectos de la administración de urodilatina en la función ventricular.

Tras 40 minutos de isquemia, la presión telediastólica del ventrículo izquierdo y la frecuencia cardíaca fueron iguales en todos los grupos de tratamiento. Sin embargo, la presión desarrollada por el VI durante la reperfusión fue significativamente superior en los corazones que recibieron urodilatina a concentración de 0.05 μM durante los primeros 15 minutos de reperfusión ($p=0.01$, **figura 27**).

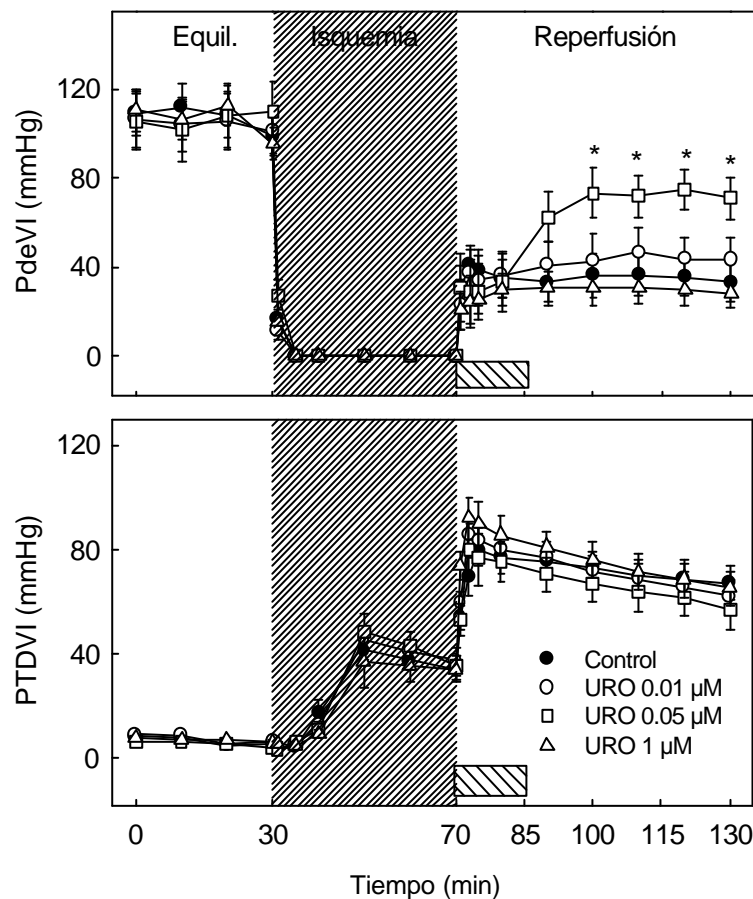


Figura 27. Evolución de la presión desarrollada del VI (PdeVI) y de la presión telediastólica del VI (PTDVI) en corazones aislados de rata sometidos a 40 min de isquemia y 60 min de reperfusión. (*= $p < 0.05$). La barra horizontal indica el tiempo de infusión de urodilatina. Se representa la media \pm error estándar.

1.2. Cuantificación de la necrosis. Liberación de LDH.

En los corazones sometidos a 60 minutos de isquemia, seguidos de perfusión, ésta se siguió de una elevada liberación de LDH, con un pico máximo a los 3 minutos. La adición de urodilatina (a concentración de 0.05 μM) durante los 15 primeros minutos de perfusión, redujo de forma importante la liberación de LDH (91.8 ± 8.2 U/g tejido seco/60min, vs 121.1 ± 7.3 U/g tejido seco/60min en el grupo placebo, $p=0.02$) (**figura 28**). Por otra parte, no se observó efecto protector en los grupos que recibieron urodilatina a concentraciones de 0.01 y 1 μM . En los experimentos diseñados para realizar oclusiones de 40 minutos no se documentó liberación enzimática.

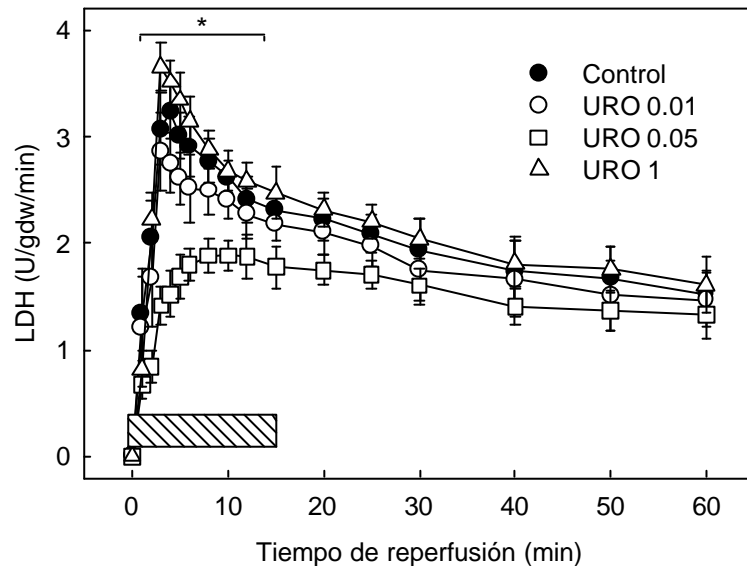


Figura 28. Representación de la liberación de LDH recogida en el efluente de seno coronario de los corazones aislados de rata sometidos a 60 min de isquemia y 60 min de perfusión. La barra horizontal indica el tiempo de infusión de urodilatina a diversas concentraciones de 0.01, 0.05 y 1 μM . (*= $p < 0.05$). Se representa la media \pm error estándar.

1.3. Contenido miocárdico de GMPc.

El contenido miocárdico de GMPc en corazones perfundidos bajo condiciones normóxicas durante 50 minutos fue de 36.3 ± 4.7 fmol/mg de proteína. En aquellos corazones sometidos a 40 minutos de isquemia y 10 minutos de perfusión, y que recibieron urodilatina durante la perfusión inicial, a concentraciones de 0 (control) o 0.01 μM , el contenido

miocárdico de GMPc se redujo significativamente en el miocardio reperfundido, comparado con el miocárdico normóxico (**figura 29**). El contenido miocárdico de GMPc en los corazones que recibieron urodilatina a concentraciones de 0.05 μM fue similar al observado en el de los corazones controles (normóxicos), mientras que los niveles fueron muy superiores a los valores control para el grupo que recibió urodilatina a concentración de 1 μM (**figura 29**).

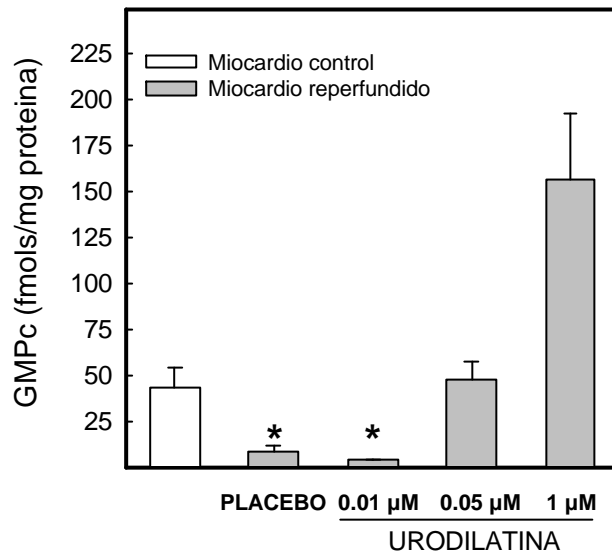
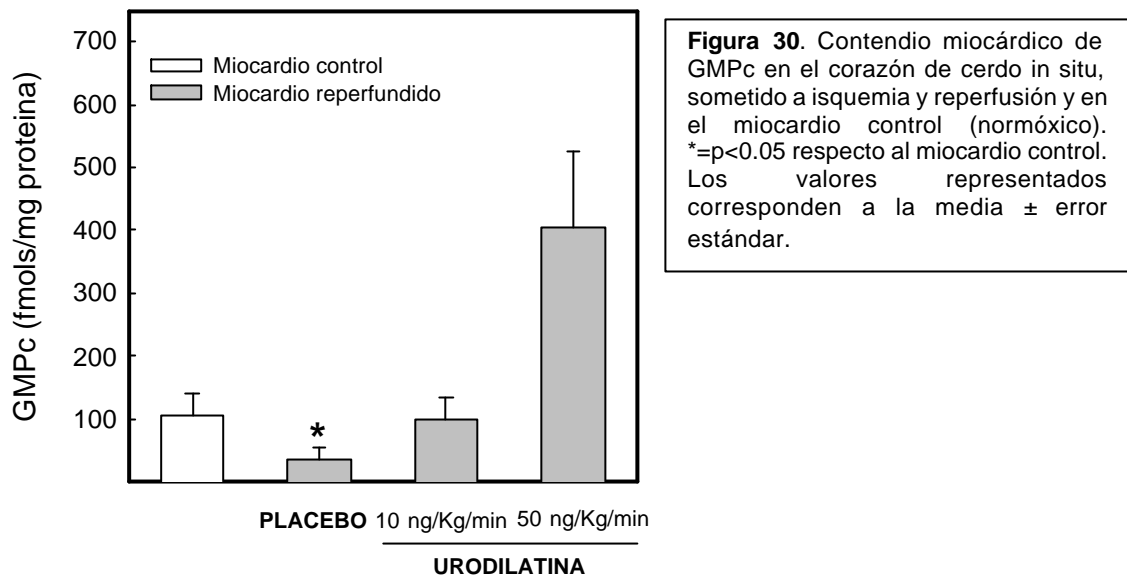


Figura 29. Representación del contenido miocárdico de GMPc en el miocardio control (normóxico) y en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión, que recibió urodilatina, a diversas concentraciones durante la reperfusión inicial o que recibió una solución placebo. [*= $p < 0.05$ respecto al miocardio control (columna no coloreada)]. Se representa la media \pm error estándar.

2. Estudios en el corazón de cerdo in situ.

2.1. Contenido miocárdico de GMPc.

Los animales del grupo diseñado para la determinación de GMPc en el miocardio de las áreas en riesgo y control (sometidas a isquemia-reperfusión o no, respectivamente), en los que se extraía el corazón a los 5 minutos de reperfusión, permitieron observar que el contenido de GMPc en el miocardio del área en riesgo estaba significativamente reducido respecto al miocardio control en los animales que recibieron placebo (**fig. 30**). En cambio, en los animales que recibieron urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min, los valores de GMPc en miocardio en riesgo fueron casi idénticos a los del miocardio control (**fig. 30**). En el grupo que recibió urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min, el contenido de GMPc miocárdico fue mucho más alto que en el grupo control de los animales placebo (372 ± 100 vs 111 ± 34 fmol/mg de proteína, $p=0.06$).



2.2. Estudios para determinación del tamaño de infarto.

Al no documentar diferencias en las variables investigadas de los dos grupos placebo (de cada una de las series de urodilatina a 10 y 50 ng/Kg/min respectivamente), estos 11 animales se agruparon en un solo grupo, y así los resultados se presentan homogenizados en 3 grupos: placebo, urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min y urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min.

2.2.1. Hematología y bioquímica.

No se apreciaron diferencias en hematocrito, contaje de plaquetas, valores de glucosa, potasio, sodio o creatinina a lo largo del experimento ni entre los diferentes grupos de tratamiento (tabla 8).

Tabla 8

	Tratamiento	Basal	Final
Hematocrito (%)	Placebo	22.2 \pm 0.6	23.3 \pm 1.0
	Urodilatina 10	21.8 \pm 0.1	21.9 \pm 1.3
	Urodilatina 50	23.4 \pm 1.0	24.2 \pm 1.0
Plaquetas (x1000/mm ³)	Placebo	411.4 \pm 31.5	355.9 \pm 30.1
	Urodilatina 10	418.2 \pm 57.6	404.0 \pm 56.6
	Urodilatina 50	424.0 \pm 31.4	399.8 \pm 35.4

-sigue-

Creatinina (mg/dL)	Placebo	1.3 ± 0.07	1.2 ± 0.05
	Urodilatina 10	1.3 ± 0.1	1.2 ± 0.1
	Urodilatina 50	1.1 ± 0.1	0.95 ± 0.1
Sodio mEq/L	Placebo	139.0 ± 3.8	141.5 ± 2.3
	Urodilatina 10	147.6 ± 2.1	146.2 ± 3.3
	Urodilatina 50	140.3 ± 0.6	140.5 ± 0.9
Potasio mEq/L	Placebo	3.4 ± 0.1	3.9 ± 0.2
	Urodilatina 10	3.2 ± 0.1	4.0 ± 0.1
	Urodilatina 50	3.4 ± 0.1	3.4 ± 0.1
Glucosa mg/dL	Placebo	105.6 ± 9.3	132.5 ± 19.0
	Urodilatina 10	117.0 ± 17.9	108.6 ± 15.4
	Urodilatina 50	111.7 ± 9.4	105.2 ± 3.1
	Tratamiento	Basal	Final

Tabla 8. Determinaciones hematológicas y bioquímicas en ambos grupos de tratamiento, antes de la oclusión y al finalizar el experimento. Los valores se expresan como media ± error estándar.

2.2.2. Niveles plasmáticos de Urodilatina.

La administración endovenosa de urodilatina se siguió de un incremento dosis-dependiente en la concentración plasmática de urodilatina en ambos grupos de tratamiento (figura 31).

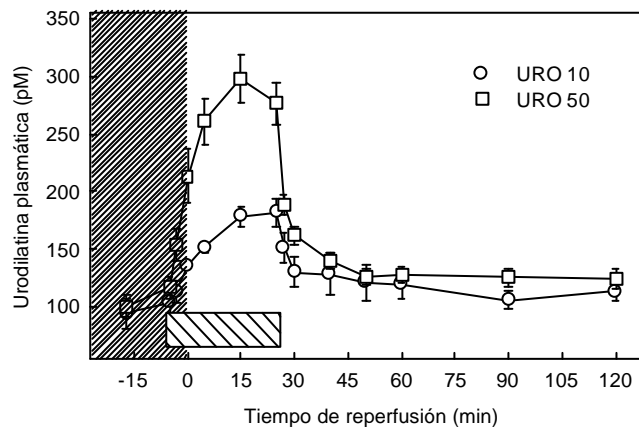


Figura 31. Evolución de los niveles plasmáticos de urodilatina en los animales que recibieron la droga a dos dosis diferentes (10 y 50 ng/Kg/min). Se expresan los valores como media y error estándar. La barra horizontal representa el tiempo de infusión del fármaco.

2.2.3. Hemodinámica y flujo coronario.

La frecuencia cardíaca del animal y la presión aórtica fueron similares en todos los grupos a lo largo del experimento, con un progresivo incremento respecto a los valores basales en el período de oclusión y primeros 15 minutos de reperfusión. A partir de ese momento la frecuencia cardíaca y presión arterial permanecieron estables (**tabla 9**). Los cambios en la presión telediastólica del ventrículo izquierdo durante la isquemia y reperfusión fueron similares entre los grupos. Se objetivó un incremento significativo durante la oclusión coronaria (16.1 ± 1 mmHg a los 30 min de isquemia) y un aumento más marcado en la reperfusión inicial (29.9 ± 3 mmHg a los 5 min de reperfusión). A partir de entonces, la presión telediastólica del VI mostró una reducción progresiva hasta el final del experimento (17.2 ± 2 mmHg a los 120 min de reperfusión). No hubo diferencias entre los grupos en el flujo coronario durante la reperfusión (**tabla 9**).

2.2.4. Motilidad regional segmentaria.

Los cambios en la distancia telediastólica (DTD) y el acortamiento sistólico durante la isquemia y reperfusión fueron similares en los 3 grupos de tratamiento (**tabla 9**). La oclusión coronaria indujo un rápido aumento en los valores de DTD y un abolimiento simultáneo del acortamiento sistólico en todos los grupos. La reperfusión coronaria indujo una reducción inmediata de la DTD a los 5 min de la reapertura de la arteria (91 ± 3 % del valor basal) que se siguió de una progresiva recuperación hasta alcanzar valores cercanos a los basales al final del experimento. En esta fase no se apreciaron diferencias entre los diferentes grupos. Del mismo modo, no se apreció recuperación de la función contráctil durante la reperfusión en ninguno de los grupos.

La motilidad regional en el territorio de la arteria circumfleja (miocardio control) no mostró diferencias entre los diferentes grupos de tratamiento, presentando valores muy estables a lo largo de todo el experimento. En la **tabla 10** se reflejan los valores de DTD y acortamiento sistólico.

		Isquemia			Reperusión	
		Basal	15 min	45 min	15 min	120 min
FC (lpm)	Control	86 ± 5	94 ± 6	103 ± 7	113 ± 7	109 ± 9
	URO 10	89 ± 4	92 ± 2	95 ± 2	104 ± 5	116 ± 5
	URO 50	79 ± 6	87 ± 7	91 ± 6	96 ± 7	106 ± 6
PAM (mmHg)	Control	104 ± 5	104 ± 6	107 ± 6	108 ± 8	113 ± 10
	URO 10	99 ± 8	99 ± 9	104 ± 8	107 ± 9	117 ± 9
	URO 50	86 ± 5	85 ± 6	86 ± 5	88 ± 7	98 ± 8
DTD (% del basal)	Control	100	111 ± 2	108 ± 3	90 ± 3	93 ± 4
	URO 10	100	114 ± 3	112 ± 2	89 ± 5	89 ± 7
	URO 50	100	113 ± 1	110 ± 3	93 ± 4	97 ± 2
Acort. Sistólico (% del basal)	Control	100	-2 ± 1	-1 ± 2	7 ± 5	5 ± 4
	URO 10	100	-1 ± 2	-3 ± 4	6 ± 5	10 ± 9
	URO 50	100	-2 ± 1	5 ± 5	10 ± 6	8 ± 9
Flujo Coronario. (% del basal)	Control	100	0	0	248 ± 57	236 ± 90
	URO 10	100	0	0	234 ± 45	193 ± 27
	URO 50	100	0	0	196 ± 28	224 ± 25

Tabla 9. FC (frecuencia cardíaca), PAM (presión arterial media), DTD (distancia telediastólica entre cristales del área en riesgo), acortamiento sistólico en el área en riesgo y flujo coronario a lo largo del experimento. Valores expresados como media ± error estándar. No hubo diferencias entre grupos.

Tratamiento		Basal	5 min isq.	48 min isq.	120 min rep.
DTD (% valor basal)	Placebo	100	101 ± 1	102 ± 1	100 ± 1
	URO 10	100	101 ± 1	101 ± 1	100 ± 1
	URO 50	100	100 ± 1	102 ± 1	99 ± 3
SS (%)	Placebo	20.7 ± 2.9	20.4 ± 2.9	20.1 ± 2.9	19.4 ± 3.6
	URO 10	17.5 ± 1.2	16.7 ± 1.2	16.2 ± 1.3	15.5 ± 1.6
	URO 50	20.4 ± 1.2	19.2 ± 0.8	19.3 ± 1.0	17.8 ± 1.1

Tabla 10. Valores de la distancia telediastólica entre cristales piezoeléctricos en el área de miocardio control (DTD) para los diferentes grupos a estudio (control, urodilatina 10 y 50 ng/kg/min), así como los valores de fracción de acortamiento sistólico en miocardio control (SS) para estos mismos grupos de tratamiento. No se documentaron diferencias entre grupos.

El cambio en la amplitud del movimiento de los cristales piezoeléctricos en el área en riesgo durante la fase de isquemia, que se utilizó como medida del desarrollo de rigor (**figura 12**, página 42), fue similar en los diferentes grupos. En todos los animales, la amplitud del

movimiento permaneció estable durante los primeros minutos de isquemia y posteriormente mostró una reducción progresiva (reflejo del desarrollo de rigor), a partir del minuto 18.8 ± 1.2 , sin diferencias entre grupos ($p=0.941$). A los 40 min de oclusión, la amplitud del movimiento era el $50.1 \pm 7.4\%$ del valor a los 5 minutos de isquemia, sin diferencias entre grupos.

2.2.5. Arritmias.

Todos los animales presentaron complejos ventriculares ectópicos durante la oclusión coronaria y salvos de ritmo idioventricular acelerado durante la reperfusión inicial. Cuatro animales (1 del grupo placebo, 1 que recibió urodilatina a 10 ng/kg/min y 2 que recibieron urodilatina a 50 ng/kg/min) presentaron fibrilación ventricular durante el período de oclusión a los 27 ± 5 min. En el primer minuto de reperfusión, 4 animales presentaron fibrilación ventricular (2 en el grupo placebo, 1 en el grupo que recibió urodilatina a 10 ng/Kg/min y, finalmente, un animal del grupo que recibió urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min).

2.2.6. Concentraciones plasmáticas de GMPc.

Las concentraciones plasmáticas de GMPc presentaron un rápido aumento tras el inicio de la infusión de urodilatina, llegando a alcanzar los máximos valores a los 30 minutos de reperfusión (**figura 32**, página 78). En el grupo que recibió urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min, los niveles plasmáticos aumentaron de 37.4 ± 11 a 76.3 ± 11 pmol/mL ($p=0.01$), mientras que en el grupo que recibió urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min, los niveles en plasma se elevaron desde un valor de 54.0 ± 14.8 hasta 123.8 ± 13.7 pmol/mL ($p=0.008$). En cambio, los niveles plasmáticos de GMPc no presentaron ningún aumento significativo en el grupo que recibió la infusión placebo (de un valor basal de 41.2 ± 10 a 35.1 ± 5.3 , $p=0.594$).

2.2.7. Área de miocardio en riesgo y tamaño de infarto.

El área de miocardio en riesgo englobó el 10.7 ± 0.6 % de la masa ventricular (peso de 14.2 ± 0.9 gramos) sin diferencias entre los grupos ($p=0.25$). El tamaño del infarto se definió como el porcentaje de miocardio en riesgo que desarrolló necrosis, y fue significativamente menor en el grupo de animales que recibió urodilatina a dosis de 10 ng/kg/min durante los

primeros 25 min de reperfusión que en aquellos que recibieron placebo. Sin embargo, en el grupo que recibió urodilatina a dosis mayores (50 ng/kg/min) se observó tan sólo una tendencia no significativa a la reducción del infarto (**figura 33**).

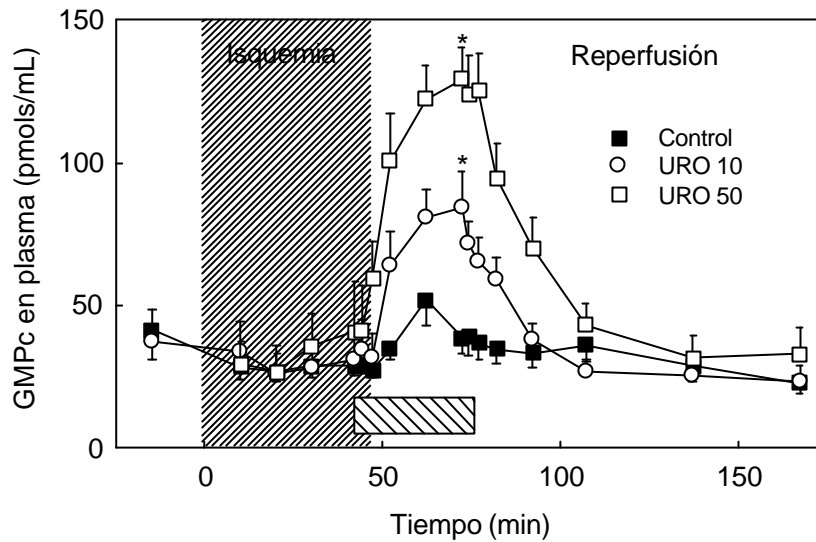


Figura 32. Concentraciones plasmáticas de GMPc para los diferentes grupos de tratamiento a lo largo del experimento. Valores expresados como media \pm error estándar. La barra horizontal indica el tiempo de infusión de urodilatina o placebo. *= $p < 0.05$ respecto a los valores basales.

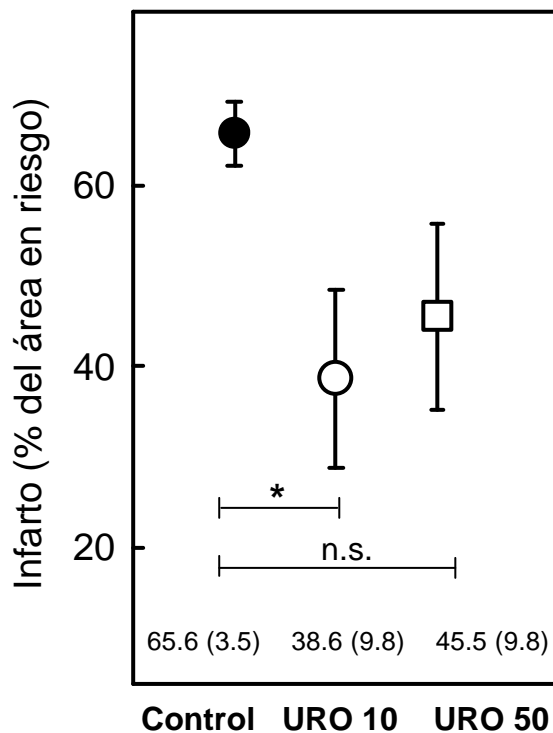


Figura 33. Representación como media \pm error estándar de los tamaños de infarto para los diversos grupos de tratamiento: control, uro 10 (urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min) y uro 50 (urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min). *= $p < 0.05$; n.s.= no significativo.

Tabla 11. Tamaños de infarto.

<i>Tratamiento</i>	<i>Area en riesgo (g)</i>	<i>Area de necrosis (g)</i>	<i>Infarto (% de area en riesgo)</i>
Placebo	9.8121	5.3175	54.19
Placebo	17.5803	15.0252	85.47
URO 10	17.8122	11.8603	66.59
URO 10	12.5004	2.4633	19.71
Placebo	12.5318	9.4438	75.36
Placebo	12.3032	6.8619	55.77
URO 10	7.4574	1.8938	25.40
URO 10	5.8878	1.3756	23.36
Placebo	13.3040	7.2217	54.28
URO 10	12.0480	6.9932	58.04
URO 50	25.9107	8.8642	34.21
URO 50	14.7711	5.0649	34.29
Placebo	18.0474	10.9747	60.81
URO 50	18.6265	12.8486	68.98
Placebo	17.3383	12.7373	73.46
URO 50	15.0266	9.5647	63.65
URO 50	10.2947	.5808	5.64
Placebo	11.2668	6.5479	58.12
Placebo	20.4391	15.7944	77.28
Placebo	14.6239	7.8978	54.01
URO 50	8.8755	5.8626	66.05
Placebo	15.6029	11.4452	73.35

Tabla 11. Se reflejan las masas de miocardio en riesgo y miocardio necrosado (reacción negativa al trifeniltetrazolium) y el tamaño de infarto para cada uno de los experimentos. URO 10: urodilatina a dosis de 10 ng/Kg/min. URO 50: urodilatina a dosis de 50 ng/Kg/min.

3. Resumen de resultados.

Los resultados fundamentales de este estudio pueden resumirse en:

- La concentración tisular de GMPc está severamente reducida en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión, en comparación con el miocardio control (normóxico).
- La estimulación de la guanilil-ciclasa de membrana (GCM) con el péptido natriurético urodilatina en el momento de la reperfusión coronaria se sigue de un rápido aumento en los niveles plasmáticos de GMPc y en el contenido miocárdico de GMPc.

- La administración endovenosa de urodilatina a las dosis utilizadas en este estudio está desprovista de efectos hemodinámicos deletéreos y es capaz de permitir que se recupere el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido, acompañándose de una reducción en el tamaño del infarto secundario a una oclusión coronaria transitoria.

- Las dosis altas de urodilatina, igualmente bien toleradas hemodinámicamente, resultan en una elevación en el contenido miocárdico de GMPc en el área reperfundida mucho mayor que los niveles normales observados en miocardio normóxico. Este hecho se acompaña de una pérdida del efecto beneficioso observado con dosis más bajas, en cuanto a la reducción del tamaño del infarto se refiere.

Resultados. Administración de nitratos.

1. Animales.

Los 3 animales destinados al protocolo inicial de búsqueda de dosis completaron sin incidencias la totalidad de los experimentos. De los 36 animales que se utilizaron en el protocolo de isquemia y reperfusión para cuantificar el tamaño del infarto, se excluyeron dos animales antes de iniciar la instrumentación al presentar pericarditis fibrinosa; dos por presentar reoclusión en el período de reperfusión; dos al lesionar el ostium de la coronaria izquierda en las maniobras de cateterización de la misma; tres por presentar fibrilación ventricular intratable durante el período de oclusión; y finalmente dos animales en los que no se podía delimitar correctamente el área de miocardio en riesgo. La serie final, cuyos resultados se presentan estaba compuesta por 10 animales que recibieron la solución con 5-MNI antes de la isquemia; y por 15 animales que recibieron una solución placebo.

2. Experimentos preliminares. Búsqueda de dosis.

2.1. Concentraciones plasmáticas de 5-MNI.

Los 3 animales que se utilizaron en esta serie recibieron 4 dosis de 5-MNI por sonda nasogástrica, de 0.3, 0.6, 0.9 y 1.2 mg/Kg de peso, espaciadas entre sí 1 hora. Se obtuvieron niveles cuantificables del fármaco a partir de la primera dosis, donde los niveles presentaban una fase de meseta a partir de los 30 minutos de su administración. La **figura 34** (página 82) muestra la evolución de las concentraciones plasmáticas a lo largo de los experimentos. A partir de estos resultados, y dada la buena absorción del fármaco en estas condiciones experimentales, se decidió administrar la dosis de 0.3 mg/Kg en el protocolo de isquemia y reperfusión.

2.2. Hemodinámica.

La frecuencia cardíaca se mantuvo estable a lo largo de los experimentos, pasando de unos valores de 67 ± 4 lpm basalmente, a 65 ± 5 lpm a la hora de la primera dosis, y a 77 ± 7 lpm los 60 minutos de administrar la cuarta dosis, respectivamente. Con respecto a la presión arterial media, los animales partieron de presiones de 73 ± 7 mmHg, que aumentaron

ligeramente a los 60 min de la primera dosis, hasta 85 ± 6 mmHg, para mantenerse estables con posterioridad (92 ± 7 mmHg, 95 ± 6 mmHg y 95 ± 6 mmHg a las 2, 3, y 4 horas respectivamente). El flujo coronario presentó una evolución similar a la de la presión arterial media, presentando un ligero aumento en la primera hora (de 16 ± 3 mL/min, a 23 ± 3 mL/min), quedando con posterioridad estabilizado a pesar de las dosis crecientes de 5-MNI (23 ± 5 mL/min, 24 ± 5 mL/min y 24 ± 5 mL/min a las 2, 3 y 4 horas respectivamente).

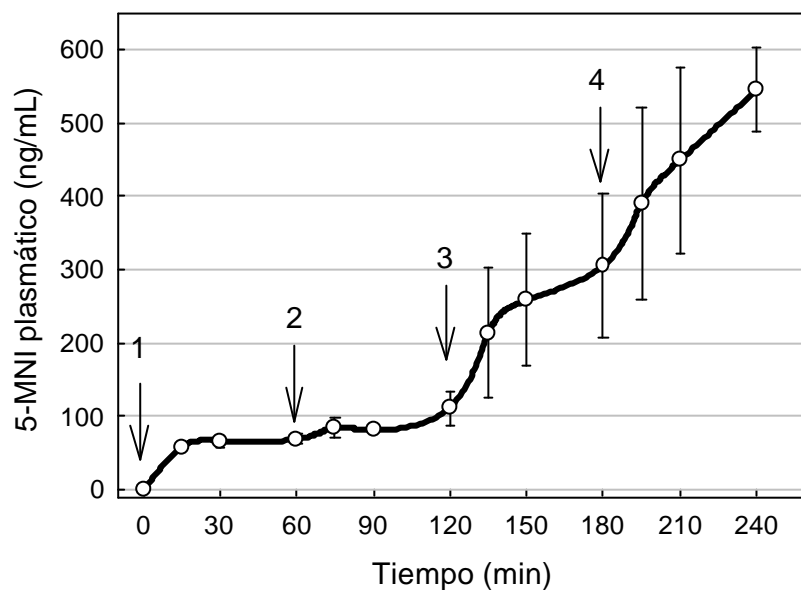


Figura 34. Representación de las concentraciones plasmáticas de 5-MNI tras las administraciones repetidas (marcadas con flechas) de 4 dosis de 5-MNI por sonda nasogástrica. (1) 0.3 mg/Kg; (2) 0.6 mg/Kg; (3) 0.9 mg/Kg; (4) 1.2 mg/Kg. Se representan los valores como media \pm error estándar.

3. Experimentos de cuantificación del tamaño del infarto.

3.1. Concentraciones plasmáticas de 5-MNI.

En los animales en los que se obtuvieron muestras para la determinación de niveles plasmáticos de 5-MNI, se documentó un patrón de ascenso relativamente rápido de los niveles del fármaco en sangre en los primeros 45 minutos tras la administración, presentando posteriormente una fase estable (entre 150-200 ng/mL) durante el resto del experimento (**figura 35**, página 83).

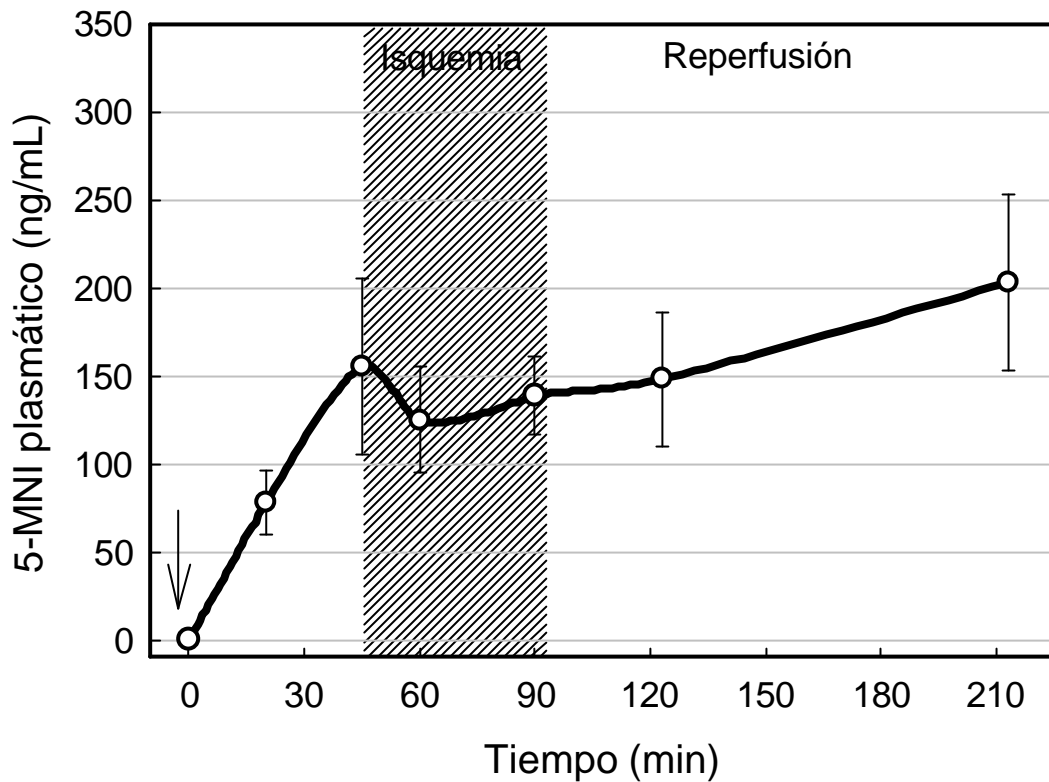


Figura 35. Representación de los niveles plasmáticos de 5-MNI tras su administración por sonda nasogástrica (flecha). Se representan los valores como media \pm error estándar.

3.2. Hemodinámica.

No se documentaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento en la evolución de la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial media (**figura 36**, página 84). Tampoco se documentaron diferencias relevantes en la evolución de las presiones del ventrículo izquierdo (**figura 36**).

3.3. Flujo coronario.

El registro de flujo coronario medio, corregido por el área de miocardio que dependía de la arteria en el punto de disección, fue muy similar en los dos grupos de tratamiento, sin cambios tras la administración del fármaco, así como tampoco durante el período de reperfusión (**figura 37**, página 85).

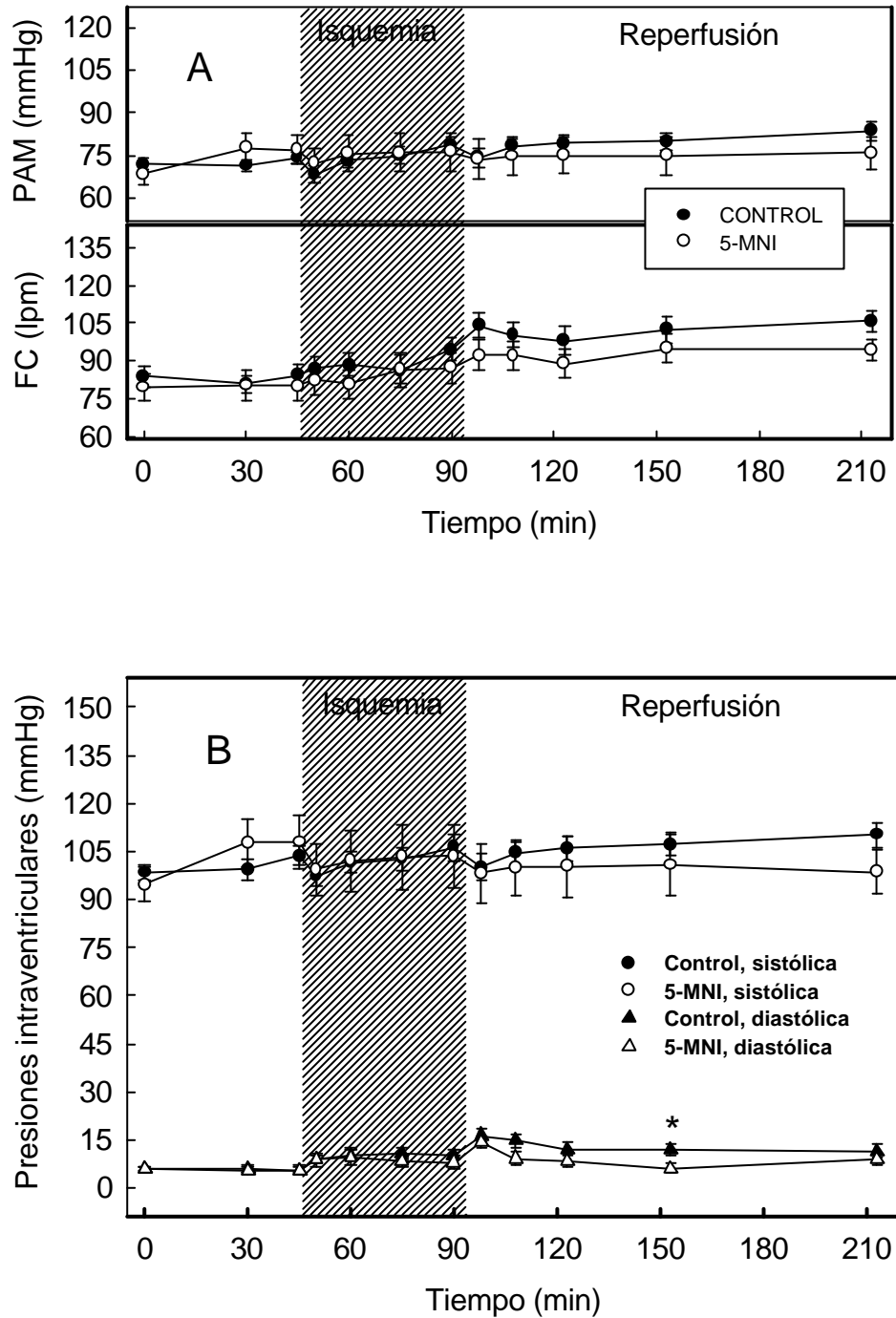


Figura 36. A) Representación de la evolución de la frecuencia cardíaca y presión arterial media. **B)** Representación de los valores de presión sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo a lo largo del experimento para ambos grupos de tratamiento. (*) $p < 0.05$ entre las presiones telediastólicas del ventrículo izquierdo a los 60 min de reperfusion, de dudosa significación fisiológica. Se representan los valores como media \pm error estándar.

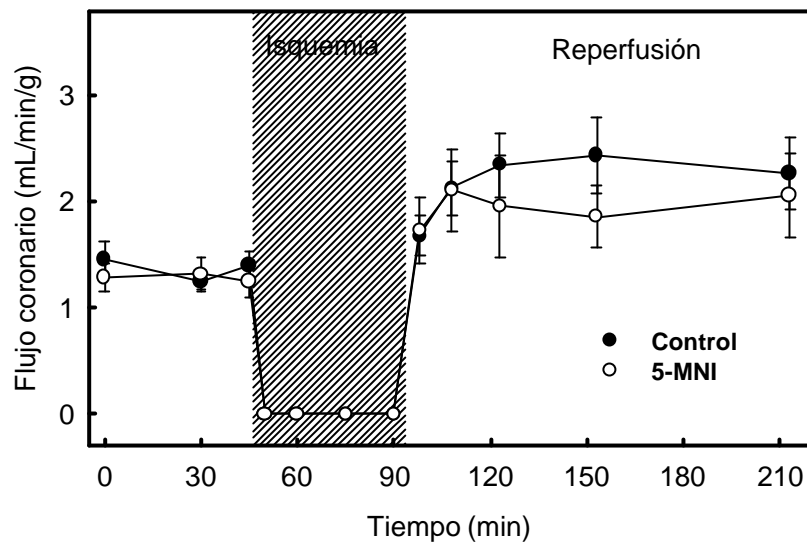


Figura 37. Flujo coronario. Se representa el flujo medio relativo al área de miocardio (en gramos) que depende de la arteria en el punto de disección. Los valores que se representan corresponden a la media \pm error estándar.

3.3.1. Reducciones cíclicas del flujo durante la reperusión.

La práctica de daño intimal coronario en estos experimentos provocó la aparición de reducciones del flujo coronario secundarias a la formación de trombo en el lugar de la lesión, que se acompañaban de recuperaciones espontáneas del flujo (por la disgregación del trombo), dando lugar a un patrón de reducciones cíclicas. Se obtuvieron registros válidos del flujo en 24 de los 25 animales de la serie. Un 71.4% de los animales del grupo control presentaron reducciones cíclicas del flujo durante la reperusión, en comparación con un 70% de los animales del grupo que recibió 5-MNI ($p=n.s$).

En cuanto al número de reducciones cíclicas del flujo, los animales del grupo control presentaron una media de 14.3 ± 2.4 variaciones durante el período de reperusión, en comparación con el grupo que recibió 5-MNI, que presentó un total de 9.6 ± 1.9 , no siendo esta diferencia significativa ($p=0.17$).

3.4. Motilidad regional segmentaria.

La oclusión coronaria, como se observó en los resultados de las series previas, se acompañó de un rápido aumento en la distancia telediastólica (DTD) entre los cristales

piezoeléctricos del área en riesgo. Durante este período de isquemia, el acortamiento sistólico quedó abolido. En el período de reperfusión, los valores de DTD presentaron una caída inicial brusca hasta valores inferiores al 90% de los basales, presentando posteriormente una ligera tendencia a recuperar los valores iniciales. El acortamiento sistólico en el área en riesgo, apenas se recuperó (figura 38). No se observaron diferencias significativas entre los dos grupos de tratamiento. La amplitud en el desplazamiento de los cristales al final del período de oclusión (utilizado como expresión del grado de rigor) fue de 52.4 ± 3.6 % del valor a los 5 minutos de oclusión, sin diferencias entre grupos.

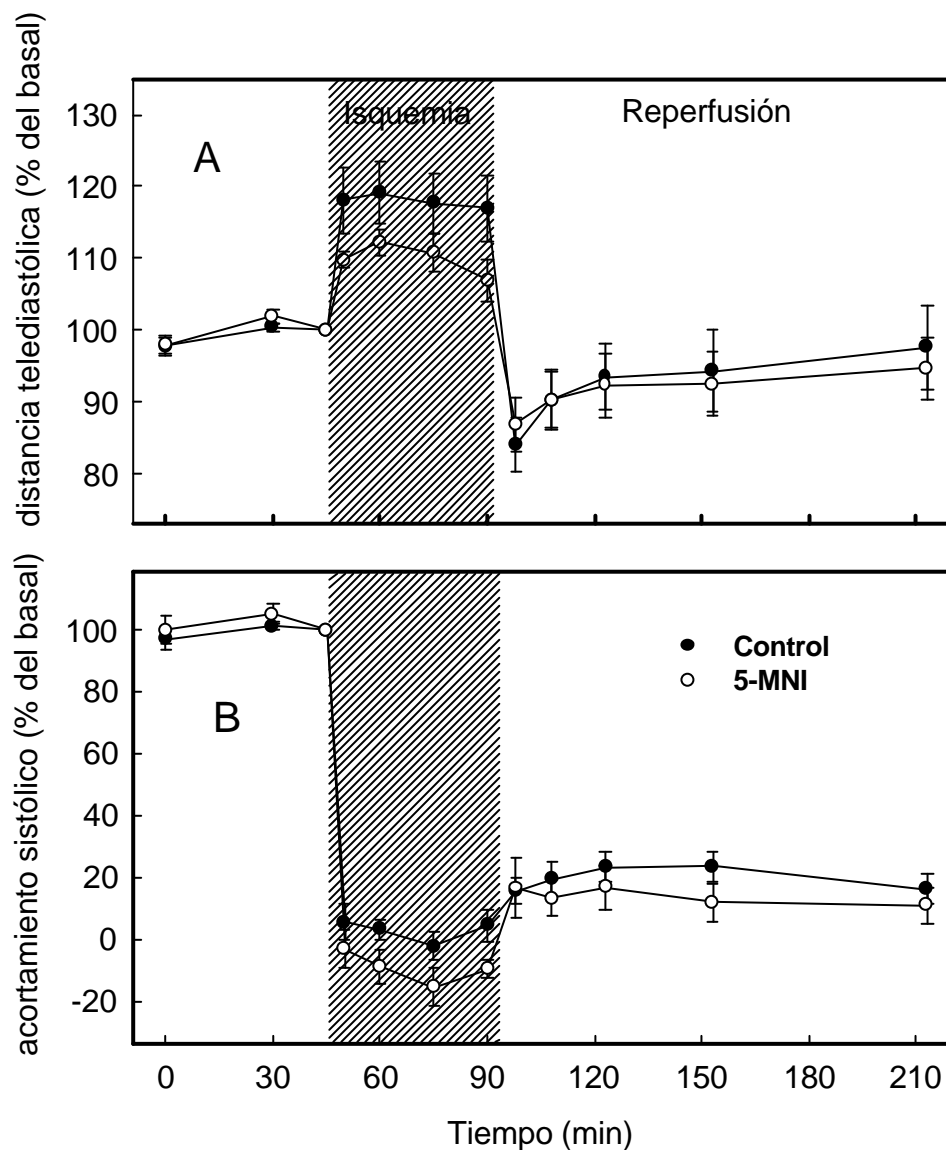


Figura 38. Representación de la evolución de la distancia telediastólica entre los cristales del área en riesgo (A) y del acortamiento sistólico ((DTD-DTS)/DTD) (B) durante los experimentos. Los valores se representan referidos al valor basal. Los datos se corresponden con la media \pm error estándar.

La evolución de los valores de DTD y acortamiento sistólico en el miocardio control no mostró diferencias a lo largo del experimento entre ambos grupos de tratamiento.

3.5. Arritmias.

Un 53.3% (n=8) de los animales del grupo control presentó fibrilación ventricular durante el período de oclusión, comparado con un 50% (n=5) de los que recibieron 5-MNI. La arritmia se presentó a los 25.1 ± 2.2 min, sin diferencias entre grupos. Tampoco se observaron diferencias entre ambos grupos en cuanto a la presencia de fibrilación ventricular en la reperusión inicial (26.7% y 40% de los grupos control y tratamiento respectivamente, p=n.s.).

3.6. Área de miocardio en riesgo y tamaño de infarto.

La tabla 12 muestra los datos de las áreas de miocardio dependientes de la arteria coronaria descendente anterior desde su punto de oclusión (área en riesgo) y las áreas de necrosis para cada uno de los experimentos de la serie.

<i>Tratamiento</i>	<i>Area en riesgo (g)</i>	<i>Area de necrosis (g)</i>	<i>Infarto (% de area en riesgo)</i>
Placebo	11.1972	5.8383	52.14
Placebo	16.0108	2.6733	16.70
5-MNI	19.6211	6.3183	32.20
Placebo	17.5488	.5236	2.98
5-MNI	22.7864	6.3891	28.04
5-MNI	15.8145	4.3132	27.27
5-MNI	16.4488	8.3528	50.78
Placebo	10.8432	2.5844	23.83
5-MNI	9.0505	2.7940	30.87
Placebo	16.7812	10.0810	60.07
Placebo	14.5929	5.6679	38.84
Placebo	9.3396	1.8254	19.54
5-MNI	20.4392	3.2904	16.10
Placebo	16.2815	10.0939	62.00
Placebo	20.9635	15.9316	76.00
Placebo	18.1116	14.0767	77.72
Placebo	16.6690	10.6825	64.09
5-MNI	16.3311	2.2886	14.01
Placebo	16.4480	12.7327	77.41
Placebo	15.8151	12.3081	77.83
Placebo	16.0516	9.2545	57.65
5-MNI	14.4345	7.4212	51.41
Placebo	18.0307	8.9738	49.77
5-MNI	15.5263	7.2562	46.73
5-MNI	13.0786	.2784	2.13

Tabla 12. Se reflejan las masas de miocardio en riesgo y miocardio necrosado (reacción negativa al trifeníltetrazolium), así como el tamaño del infarto cada experimento. Se representan los experimentos consecutivamente en el tiempo.

El área de miocardio en riesgo estaba constituida por el $11.8 \pm 0.6 \%$ y $12.2 \pm 0.8 \%$ de la masa ventricular para los grupos control y tratamiento con 5-MNI, respectivamente. No existían diferencias entre los grupos. El tamaño del infarto, definido como el porcentaje del miocardio en riesgo que desarrolló necrosis, fue significativamente inferior en el grupo que recibió 5-MNI ($29.9 \pm 5.2\%$) que en el grupo control (50.4 ± 6.4 , $p=0.03$). La **figura 39** representa comparativamente estos valores.

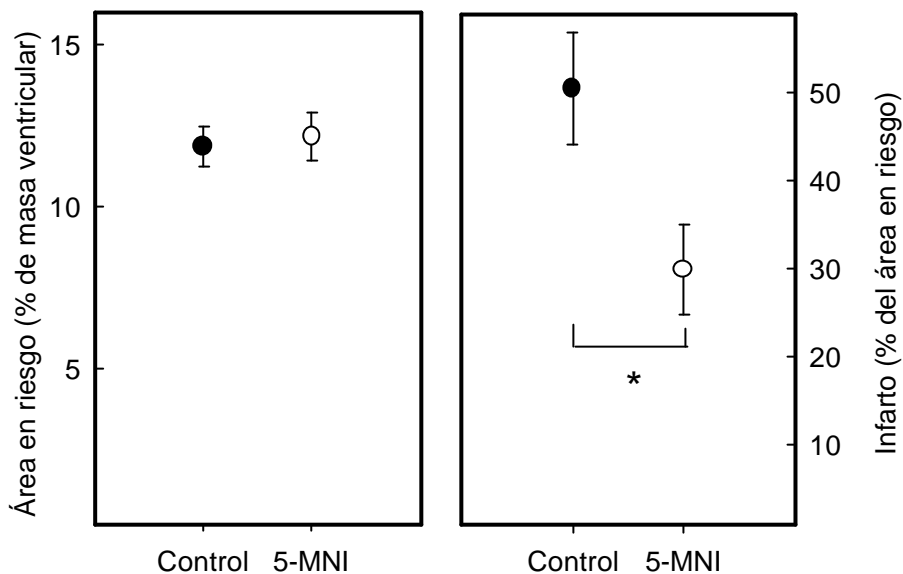


Figura 39. Representación de las áreas en riesgo (panel de la izquierda) y del tamaño del infarto (panel derecho) para los grupos control y tratamiento. Se representan los valores como media \pm error estándar. *= $p<0.05$.

3.7. Hematología y bioquímica.

No se documentaron diferencias en los valores de hematocrito, conteo plaquetar, glucosa, creatinina, sodio y potasio a lo largo del experimento entre los dos grupos de tratamiento (**tabla 13**).

Tabla 13

	Tratamiento	Basal	Final
Hematocrito (%)	Placebo	23.7 ± 0.7	24.9 ± 1.0
	5-MNI	24.1 ± 0.1	23.7 ± 1.0
Plaquetas (x1000/mm3)	Placebo	424.7 ± 35.5	397.0 ± 34.9
	5-MNI	389.2 ± 22.1	344.2 ± 12.5
Creatinina (mg/dL)	Placebo	1.4 ± 0.07	1.3 ± 0.05
	5-MNI	1.5 ± 0.1	1.6 ± 0.2
Sodio mEq/L	Placebo	145.8 ± 0.9	146.5 ± 2.5
	5-MNI	146.5 ± 1.8	145.5 ± 1.3
Potasio mEq/L	Placebo	3.2 ± 0.1	3.7 ± 0.1
	5-MNI	3.3 ± 0.1	3.7 ± 0.2
Glucosa mg/dL	Placebo	125.9 ± 7.9	133.4 ± 10.6
	5-MNI	119.1 ± 11.4	117.2 ± 9.5

Tabla 13. Representación de los valores de hematología y bioquímica más representativos obtenidos en las analíticas inicial y final de los experimentos.

4. Resumen de resultados.

La administración de 0.3mg/Kg de 5-MNI por vía enteral, a cerdos anestesiados, antes de someterlos a un protocolo de isquemia y reperfusión miocárdica, se acompaña de la documentación de concentraciones detectables del fármaco en plasma durante el tiempo de duración de los experimentos (más de 3 horas). La administración del fármaco, a estas dosis, es bien tolerada hemodinámicamente, no induce cambio en los parámetros hematológicos ni bioquímicos, y se acompaña de una reducción del tamaño del infarto secundario a una oclusión coronaria transitoria, en comparación con la administración de una dosis equivalente de placebo.

Discusión.

DISCUSIÓN.

1. Hallazgos fundamentales.

En estos estudios se investigó la repercusión que, sobre el tamaño del infarto, tenían diferentes métodos de estimular la producción de GMPc. Se correlacionó, además, el efecto observado con el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido tras isquemia transitoria. Durante los experimentos se monitorizaron diversas variables hemodinámicas, la contractilidad regional segmentaria del miocardio, y el flujo coronario.

De forma resumida, pudimos comprobar que:

- El contenido de GMPc se encuentra reducido en el miocardio sometido a isquemia-reperusión, respecto al miocardio control (en condiciones normóxicas).
- Tanto la administración de L-arginina como de urodilatina a concentraciones toleradas en humanos, se asocian a una recuperación del contenido miocárdico de GMPc, y a una reducción en el tamaño del infarto. Las dosis más elevadas de urodilatina, se acompañaron de una elevación del contenido miocárdico de GMPc en el miocardio reperfundido muy por encima de los niveles observados en el miocardio normóxico, y a una pérdida del beneficio en cuanto a la reducción del tamaño del infarto se refiere. La administración del nitrato 5-MNI, a concentraciones igualmente probadas en humanos, y administrado antes de un período de isquemia miocárdica transitoria, reproduce los efectos de las estrategias previas, reduciendo el tamaño el infarto.
- La tolerancia hemodinámica a las drogas fue buena, sin diferencia respecto al control en presión arterial, frecuencia cardíaca, flujo coronario y presiones de llenado del ventrículo izquierdo.
- En los tres protocolos de estimulación de la producción de GMPc, no se observaron diferencias respecto a los animales control en los índices de progresión del daño isquémico, como son la aparición de rigor y el tiempo en el que se documentó la máxima incidencia de arritmias ventriculares isquémicas, encontrando en cambio, una atenuación en el desarrollo de hipercontractura en los primeros minutos de reperusión

para los animales que recibieron L-arginina antes de la isquemia. Igualmente, no se encontró relación entre la estimulación de la síntesis de NO, su efecto beneficioso en cuanto a la reducción del tamaño del infarto y el depósito de PMN en el miocardio reperfundido.

2. Consideraciones metodológicas.

El modelo fundamental sobre el que se han estudiado las maniobras de potenciación de la síntesis de GMPc ha sido el miocardio porcino *in situ* sometido a isquemia regional y posterior reperfusión. Se escogió este modelo al tratarse de animales carentes de circulación colateral(163;168) en los que la salvación de miocardio no pudiera verse influenciada por una heterogeneidad manifiesta en el riego sanguíneo.

Los tiempos de oclusión utilizados se corresponden con la zona media de la curva de crecimiento exponencial de la necrosis en este modelo(169) y permiten observar tanto la reducción de la misma como su potencial incremento. Respecto a la duración del período de reperfusión, las 2 horas utilizadas permiten estudiar el daño celular inmediato por reperfusión. La extensión de la reperfusión en este mismo modelo a 5(52), 6(59) o 24 horas(34) no se han acompañado de diferencias sustanciales en cuanto al tamaño de la necrosis. La única duda que se plantea es si la extensión del período de reperfusión pudiera haber afectado la cuantificación de la mieloperoxidasa en tejido como índice del depósito de PMN.

La cuantificación del tamaño de la necrosis se basó fundamentalmente en la reacción a la incubación, en un baño de cloruro de trifeníl-tetrazolium, de las lonchas de miocardio obtenidas tras la finalización de los protocolos de isquemia y reperfusión. Esta técnica está validada como un método eficaz de cuantificar precozmente la necrosis miocárdica, con una buena correlación histológica(164). En nuestro estudio un grupo de seis corazones pertenecientes al protocolo de administración de L-arginina fue estudiado histológicamente para la cuantificación de la extensión de la necrosis en bandas de contracción, encontrando una buena correlación con la cuantificación por la reacción al trifeníl-tetrazolium ($r=0.82$, $p<0.05$), aunque presentaba una tendencia a valores menores. Por otra parte, la monitorización de las señales de los cristales piezoeléctricos en el área en riesgo, especialmente la importante reducción que se produce en

la distancia que los separa en telediástole en la reperfusión inicial ha sido validada en este mismo modelo con una muy alta correlación con el desarrollo de bandas de contracción(165).

La utilización de la determinación de actividad de mieloperoxidasa en tejido como índice del depósito de PMN en el miocardio ha sido utilizada previamente por nuestro grupo(62), y por otros grupos que han dirigido sus observaciones hacia el acúmulo de PMN en el miocardio reperfundido(103;120;170).

2.1. Protocolos de administración de los fármacos.

2.1.1. Administración de L-arginina. El modelo de administración de L-arginina en el cerdo consistía en la administración de la droga antes de la isquemia. Experimentos previos realizados en nuestro laboratorio(102) en corazones aislados de rata mostraron que la administración de L-arginina durante todo el experimento de isquemia y reperfusión, o sólo durante el período de equilibrado (antes de la isquemia) eran capaces de reducir la magnitud de la liberación enzimática y mejorar la recuperación funcional de los corazones durante la reperfusión. El efecto beneficioso, sin embargo, debía llevarse a cabo fundamentalmente en el período de reperfusión, ya que la adición en este momento de un inhibidor selectivo de la guanilil-ciclasa soluble revertía los efectos beneficiosos conseguidos con la adición de L-arginina. Estos resultados sugerían que se necesitaba un mínimo tiempo para que la L-arginina se incorporara a las células miocárdicas. Así, en el modelo de corazón porcino *in situ*, se planificó la administración de L-arginina antes de la isquemia.

2.1.2. Administración de urodilatina. El estudio previamente comentado, junto con observaciones de Hempel et al.(98) sobre cardiomiocitos aislados en los que el incremento de la concentración de GMPc o la administración de análogos del mismo durante la reoxigenación prevenía la hipercontractura, sugería que el incremento de la concentración de GMPc en los primeros minutos de la reoxigenación podía prevenir la muerte celular por hipercontractura. A raíz de estas observaciones, Inserte et al.(147) llevó a cabo una serie de experimentos en corazón aislado de rata, sometido a isquemia y reperfusión, en las que se administraba urodilatina a concentración de 0.05 μ M durante los primeros 15 minutos de reperfusión, comparándola con un grupo control. Los corazones que recibieron urodilatina durante la

reperusión presentaron menor liberación enzimática y mejor recuperación funcional. Estos efectos se asociaban a un incremento en los niveles de GMPc recogidos en el efluente coronario, medida que se correlacionaba muy bien con la determinación en tejido de GMPc ($r^2=0.96$). Los efectos beneficiosos de la urodilatina fueron reproducidos en corazones que recibieron un análogo de GMPc (8-Bromo-GMPc) durante la reperusión inicial. Ante estas evidencias, y como se comenta en el apartado correspondiente (*Administración de urodilatina. Métodos*) se diseñó un protocolo de administración de urodilatina en un modelo de corazón porcino in situ sometido a isquemia y reperusión, con intención de administrar la droga durante la reperusión.

Con el objetivo de correlacionar los posibles efectos que sobre la muerte celular podían tener niveles diferentes de GMPc durante la reperusión inicial, se llevaron a cabo experimentos preliminares en corazón aislado de rata que recibiría concentraciones crecientes de urodilatina. Los resultados obtenidos con esta primera serie mostraban que niveles de GMPc en el miocardio reperfundido, muy por encima de las concentraciones encontradas en miocardio normóxico, se asociaban a una pérdida del efecto protector de concentraciones más bajas. Esta observación hizo que los experimentos en el modelo porcino, se diseñaran con la misma premisa de mantener dos protocolos de administración de urodilatina, a dosis baja y alta, y correlacionar sus efectos hemodinámicos y la posible protección frente al daño por reperusión, con su capacidad para aumentar el contenido de GMPc miocárdico. Cabe decir, que en el momento de la realización de este segundo protocolo, se había concluido y publicado los resultados con la administración de L-arginina(171), donde la estimulación de la síntesis de NO con L-arginina se había traducido en una normalización del contenido de GMPc en el miocardio reperfundido respecto al control (**tabla 5**, página 64).

2.1.3. Administración de 5-MNI. El 5-MNI fue el nitrato de elección utilizado en los ensayos multicéntricos GISSI-3 e ISIS-4. Es un fármaco de administración oral, con muy buena biodisponibilidad, y que alcanza en humanos un efecto máximo (que se correlaciona con un pico en las concentraciones plasmáticas) hacia los 60 minutos de su administración(139;140;167). Es un fármaco muy soluble en agua, y tras su absorción no sufre metabolismo de primer paso hepático ni intestinal, ni tiene otros metabolitos activos(167). De

acuerdo con la hipótesis de aumentar la disponibilidad de GMPc en el momento de la reperfusión, y a diferencia de los protocolos utilizados en los ensayos GISSI-3 e ISIS-4, se administró el fármaco previamente a la oclusión coronaria, para asegurar niveles del fármaco en el momento de la reperfusión. Las dosis que se utilizaron en los experimentos dirigidos a cuantificar el tamaño del infarto (0.3 mg/Kg) fueron aquellas que se asociaban con una determinación positiva y estable de niveles en plasma en los 60 minutos que seguían a su administración. Estudios experimentales en perros han detectado caídas en las resistencias vasculares periféricas con dosis de 0.1 a 0.3 mg/Kg de 5-MNI(167).

3. Bioquímica y determinaciones hemodinámicas tras la administración de las drogas.

3.1. Bioquímica. Ni en los experimentos destinados a determinar el efecto de la administración de L-arginina, 5-MNI, ni en aquellos en los que se administró urodilatina a diferentes dosis en el modelo porcino se objetivaron diferencias significativas en los valores hematológicos o bioquímicos entre las extracciones sanguíneas practicadas al inicio y al final de los experimentos, a pesar de documentar elevaciones sustanciales en plasma de las drogas testadas tras su administración.

3.2. Efecto de la administración de L-arginina sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca y presiones ventriculares. La L-arginina se administró a dosis de 100 mg/Kg por vía sistémica y durante 20 minutos. Dosis superiores al doble de las citadas se han administrado de forma endovenosa en humanos, ya sea en voluntarios sanos o pacientes afectados de arteriopatía periférica(148-150;159), observando caídas de la presión arterial y de las resistencias vasculares sistémicas, con ligeros aumentos de la frecuencia cardíaca de forma compensadora. A pesar de que el modelo no es comparable, al tratarse de una situación de estrés (provocación de un infarto agudo de miocardio añadido al propio estrés quirúrgico), en nuestros experimentos no se documentaron diferencias respecto a los animales que recibieron la infusión placebo en cuanto al comportamiento de la frecuencia cardíaca y de la presión sistémica durante los períodos de isquemia y reperfusión. Tan sólo se observó tras la infusión

de la droga un pequeño aumento de la frecuencia cardíaca (en los animales que recibieron L-arginina) y de las presiones sistémicas (en ambos grupos de tratamiento). Estos cambios tan precoces en el tiempo parecen más relacionados con el propio estrés quirúrgico. No podemos inferir si estas dosis administradas de forma sistémica en el contexto de un síndrome coronario agudo, exentos de la toracotomía y sedoanalgesia, presentarían semejante comportamiento. Respecto a las presiones de llenado del ventrículo izquierdo, se observó un comportamiento paralelo al observado en la frecuencia cardíaca y presión arterial, con ligeros aumentos tras la infusión de la droga, pero presentando un comportamiento paralelo al de los animales control durante el protocolo de isquemia y reperfusión.

3.3. Efecto de la administración de L-arginina sobre el flujo coronario regional. De forma similar a lo observado en la frecuencia cardíaca, presión arterial y presiones ventriculares en los animales que recibieron L-arginina, el flujo coronario presentó un muy ligero aumento antes de proceder a la oclusión arterial. Estos aumentos fueron de poca magnitud (de 13.9 ± 1.5 a 15.9 ± 2.1 ml/min), aunque significativos. Sin embargo, pueden estar más en relación al aumento de presión de perfusión secundario al ligero aumento en la presión sistémica, que a un efecto vasodilatador propio sobre el lecho arterial coronario. De hecho, en los estudios que sobre capacidad vasodilatadora arterial sistémica(152) o coronaria(154) se han llevado a cabo con L-arginina en pacientes con disfunción endotelial, en la mayoría de los casos se ha utilizado un estímulo vasodilatador dependiente de endotelio para valorar la respuesta.

3.4. Efecto de la administración de L-arginina sobre la contractilidad regional segmentaria. La administración de L-arginina no tuvo ningún efecto en la contractilidad regional del miocardio antes de la isquemia (**tabla 3**, página 58), así como tampoco existieron diferencias en la expansión que experimentó el miocardio isquémico respecto a los animales que recibieron placebo. Igualmente, la progresiva reducción en la amplitud del movimiento de los cristales en el área en riesgo, utilizada como marcadora del desarrollo de rigor isquémico, no mostró diferencias entre los dos grupos de tratamiento. Estas observaciones son sugestivas de que los índices de progresión del daño isquémico fueron similares en ambos grupos, sin verse afectados por el tratamiento. Sin embargo, la marcada atenuación en el desarrollo de

hipercontractura durante la reperfusión (**figura 21A**, página 61), está en conjunción con la hipótesis de una inhibición contráctil mediada por GMPc(79-81) que es capaz de prevenir el desarrollo de hipercontractura y atenuar así la necrosis(98).

3.5. Efecto de la administración de urodilatina sobre la presión arterial, frecuencia cardíaca. De forma similar a lo observado en el protocolo de administración de L-arginina en el modelo porcino, no se observaron diferencias significativas en la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial en entre los diferentes grupos de tratamiento antes de la infusión de los fármacos. La infusión de las drogas se iniciaba 5 minutos antes de proceder a la reperfusión coronaria, para asegurar niveles del fármaco en sangre en el momento de la reperfusión. La infusión de las drogas (ya fuera a la dosis de 10 ng/Kg/min o de 50 ng/Kg/min) no se acompañó de una caída en la presión arterial significativa respecto a los valores previos a la infusión. Esta observación concuerda con los efectos observados en voluntarios sanos, en los que la infusión de urodilatina se acompañaba de excelentes respuestas diuréticas pero con muy poco efecto hipotensor acompañante(73).

3.6. Efecto de la administración de urodilatina sobre el flujo coronario regional. En concordancia con la falta de diferencias significativas en el comportamiento de la presión arterial sistémica durante la infusión de la urodilatina (a las dos dosis probadas) o de placebo, el flujo coronario en el punto de disección de la arteria coronaria descendente anterior, no mostró diferencias valorables, presentando valores ligeramente inferiores en el grupo que recibió urodilatina a 50 ng/Kg/min. Sin embargo, este grupo era el que presentaba valores de presión arterial media más bajos, ya desde el inicio del experimento y, por tanto, no puede asociarse a un efecto propio de la infusión del compuesto.

3.7. Efecto de la administración de urodilatina sobre la contractilidad regional segmentaria. El aumento que experimentó la distancia en telediástole de los cristales implantados en el área en riesgo (DTD) respecto a la distancia previa a la oclusión, fue similar en los 3 grupos de animales, así como tampoco se objetivaron diferencias en el desarrollo de rigor isquémico. Una vez administrado el tratamiento, y ya en el período de reperfusión, la

evolución que experimentaron los valores de DTD respecto a los previos a la oclusión tampoco mostró diferencias entre los grupos, mostrando una caída por debajo del valor preisquémico que se siguió de una tendencia a la recuperación durante la reperfusión. La falta de diferencias observada en este índice utilizado como reflejo del desarrollo de hipercontractura(165) puede ser cierta, o puede reflejar una falta de potencia para desenmascarar diferencias, debido a un número de observaciones válidas muy bajo en los grupos estudiados: 3 en cada uno de los dos grupos de tratamiento y 7 en el de placebo. La pérdida de observaciones obedece a la alteración de los registros con las maniobras de desfibrilación de los corazones, fundamentalmente. Estos números fueron claramente superiores en el protocolo de administración de L-arginina (7 en el grupo tratamiento y 9 en el grupo control).

3.8. Efecto de la administración de 5-MNI sobre la presión arterial y la frecuencia cardíaca. Las diferentes dosis administradas a los animales en el protocolo preliminar de búsqueda de dosis, no se siguieron de caídas en la presión arterial media ni de cambios significativos en la frecuencia cardíaca, a diferencia de lo observado con dosis inferiores (0.1 mg/Kg) en otros modelos(167). El 5-MNI como la mayoría de fármacos de su familia son vasodilatadores predominantemente venosos a dosis bajas y sólo muestran efectos sobre el territorio arterial a dosis altas, motivo por el que puede especularse que no presente cambios apreciables en la presión arterial media ni en la frecuencia cardíaca tras su administración oral, más aún tratándose de un modelo con cirugía a tórax abierto, donde los propios cambios fisiológicos inducidos por la cirugía pueden enmascarar el posible efecto sobre el territorio arteriolar.

3.9 Efecto de la administración de 5-MNI sobre el flujo coronario. El flujo coronario, en concordancia con el comportamiento de la presión arterial media, fue similar en ambos grupos de tratamiento. A pesar de los efectos descritos como vasodilatador coronario de los nitratos, este efecto se produce sobre todo en las arterias epicárdicas, con poco o nulo efecto sobre el flujo coronario(167).

3.10. Efecto de la administración de 5-MNI sobre la contractilidad regional segmentaria.

De manera similar a lo observado tras la administración de urodilatina, no se documentaron diferencias entre grupos en los parámetros de contractilidad segmentaria del miocardio, ni en cuanto al acortamiento sistólico, ni tampoco en la evolución de la DTD durante la reperfusión (**figura 38**, página 86). La tendencia no significativa en el grupo tratado, de presentar una menor expansión del miocardio isquémico durante la oclusión coronaria, podría deberse a una disminución de la precarga tras la administración de nitratos.

4. Efecto de la administración de las drogas sobre la presencia de arritmias.

En el conjunto de los animales se observó, como mínimo, un episodio de fibrilación ventricular isquémica en el 30% de casos en el protocolo de administración de L-arginina, en un 20% de casos en el protocolo de administración de urodilatina, y en un 52% de casos en el protocolo de administración de nitratos, sin diferencias significativas entre los respectivos grupos de tratamiento. Estos valores son equiparables a los de otros estudios realizados en el mismo modelo(34;44;59). La reperfusión indujo en todos los experimentos la aparición de arritmias ventriculares en forma de extrasistolia ventricular y rachas de ritmo idioventricular acelerado, fenómenos propios del modelo. La presencia de fibrilación ventricular en los primeros minutos de reperfusión se dio en una proporción muy baja de casos en los protocolos de administración de L-arginina y urodilatina (2 y 4 casos, respectivamente) cosa que no permitía establecer diferencias entre tratamientos. En el último protocolo, con una muestra mayor, estas arritmias se presentaron en un 32% de casos, sin diferencias entre grupos.

La potenciación de los niveles de NO durante la reperfusión se ha estudiado con el objetivo de reducir la presencia de fibrilación ventricular, con resultados positivos tras administración de L-arginina, fundamentalmente en modelos de corazón aislado de rata(172;173). Los radicales libres de oxígeno se proponen como facilitadores de los cambios electrofisiológicos que se dan en el miocardio reperfundido y conducen a la aparición de arritmias de reperfusión, además de los cambios en la homeostasis del calcio y alteraciones en el metabolismo lipídico. A pesar de

que estrategias dirigidas a mitigar la carga oxidante en la reperfusión en modelos porcinos han sido efectivas en reducir las arritmias ventriculares(67), el hecho de que se trate de un modelo carente de xantina-oxidasa en el tejido cardíaco(174) reduce la magnitud del beneficio de estas medidas, a diferencia de lo observado en otros modelos.

5. El contenido de GMPc en el miocardio reperfundido.

La información sobre el contenido de GMPc en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión es escasa. La mayoría de los estudios se han centrado en la capacidad de síntesis y disponibilidad de NO en el miocardio reperfundido(104;115;117;124), documentando en la mayoría de casos una reducción en los niveles de NO, que han promovido la administración de donantes de NO o de precursores de su síntesis (**tabla 2**, página 26). Sobre el contenido de GMPc existen observaciones previas en las que se documentan niveles disminuidos de GMPc tras períodos de isquemia de 30 minutos(175), mientras que otras observaciones han documentado la presencia de cantidades no disminuidas de GMPc en el momento de la reperfusión(124), a pesar de niveles reducidos de NO, y de obtener incrementos en la concentración de GMPc tras la administración de L-arginina que se han asociado a mejor recuperación funcional y reducción de la necrosis.

Experimentos previos de nuestro grupo en corazones aislados de rata mostraron que la liberación de GMPc(102) o el contenido miocárdico de la molécula(147) se encontraban reducidos de forma importante en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión. Igualmente, se documentó(147) que la respuesta del miocardio reperfundido a la estimulación con el péptido natriurético urodilatina era muy reducida con respecto al miocardio control (no sometido a isquemia-reperfusión), haciendo sugestiva la hipótesis de una alteración en los mecanismos de síntesis y degradación de GMPc en el miocardio reperfundido.

5.1. Efectos de la administración de L-arginina y urodilatina sobre los niveles plasmáticos de GMPc. Tanto la administración de L-arginina como de urodilatina se siguió de un aumento en las concentraciones plasmáticas de GMPc en comparación con los animales que recibieron placebo. Este aumento fue inmediato en los animales que recibieron urodilatina (**figura 32**, página 78) a diferencia de lo observado tras la administración de L-arginina, donde

la elevación en los niveles de GMPc se documentó avanzado el experimento, desde el final del período de oclusión coronaria, obteniendo el valor pico a los 15 minutos de reperfusión(**figura 22**, página 63). Esta cinética más retrasada puede expresar el tiempo necesario para la incorporación de L-arginina a los depósitos intracelulares.

5.2. Determinación de los niveles de GMPc en seno coronario tras isquemia y reperfusión coronaria. La recogida de muestras en seno coronario pretendía objetivar si se producía un aumento en las concentraciones de GMPc en seno coronario tras la administración de L-arginina. Respecto a los animales que recibieron la infusión de placebo, aquellos que recibieron L-arginina presentaban unos niveles más altos de GMPc en seno coronario, fenómeno que se correlacionaba con observaciones previas en corazón aislado de rata(102). El cálculo de la determinación arteriovenosa de GMPc dirigida a dilucidar si el origen del GMPc recogido en sangre periférica pudiera provenir fundamentalmente de tejido cardíaco, no mostró diferencias significativas. Probablemente, todo el sistema vascular contribuya a la síntesis de GMPc que se produce tras la infusión de L-arginina.

5.3. Efectos de la administración de L-arginina sobre el contenido de GMPc miocárdico. El interés fundamental, sin embargo, era documentar el papel que la estimulación de la NOS podía representar en la preservación de los niveles de GMPc miocárdicos. Para ello se realizaron una serie de experimentos en los que no se concluyó el período de reperfusión de 2 horas, para obtener muestras de miocardio correspondientes al área en riesgo (dependiente de la arteria coronaria descendente anterior por debajo del punto de ligadura) y del miocardio control. En estos experimentos se procedió a la extracción de las porciones apicales de ambos ventrículos a los 5 minutos de reperfusión. Cuatro animales recibieron una infusión de L-arginina previa a la oclusión coronaria de 48 minutos, a la misma dosis y durante el mismo tiempo que los animales que se utilizaron para la medición del infarto a las 2 horas de reperfusión. Los resultados de la determinación de GMPc en el miocardio de ambas zonas (**tabla 5**, página 64), permitieron documentar la existencia de una reducción en el contenido miocárdico de GMPc en el miocardio en riesgo respecto al control y, sobre todo, comprobar que la administración de L-arginina a dosis de 100µg/Kg/min durante 20 minutos antes

proceder a la oclusión coronaria preservaba el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido.

5.4. Efectos de la administración de urodilatina sobre el contenido miocárdico de GMPc.

La determinación del contenido de GMPc en miocardio tras estimulación con dosis crecientes de urodilatina muestra una evolución similar en los modelos del corazón aislado de rata y corazón porcino *in situ* (figuras 29 y 30, páginas 72-73). De forma reproducible a lo observado en los experimentos previos con L-arginina, el miocardio sometido a isquemia y reperfusión no estimulado, presenta una reducción en el contenido de GMPc, que se recupera en aquellos corazones que se perfunden con concentraciones de 0.05 μ M de urodilatina durante la reperfusión o en aquellos animales que reciben una infusión de urodilatina de 10 ng/Kg/min. Sin embargo, en aquellos estimulados con dosis más altas, las determinaciones de GMPc en tejido miocárdico sometido a isquemia y reperfusión superan ampliamente los niveles que se podrían considerar de "normalidad" en ambos modelos. A estas dosis, el efecto beneficioso en cuanto a la limitación de la necrosis se perdía, fenómeno que se comentará a continuación.

6. Mecanismos de acción implicados en la protección frente a la necrosis.

6.1. Papel del NO en la isquemia y reperfusión miocárdica. Estudios previos: Como se comentó en el capítulo introductorio, la mayoría de los grupos que han estudiado la disponibilidad de NO en el miocardio reperfundido, han documentado una reducción del mismo tras períodos de isquemia prolongados(102-106). En este sentido, numerosos estudios se han dirigido a valorar el efecto que tendría el incremento en las concentraciones de NO en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión, sobre la recuperación funcional del mismo, o sobre la muerte celular. Algunos estudios, sin embargo, realizados predominantemente en modelos de corazón aislado de rata o conejo(101;130;131;176), han mostrado posibles efectos deletéreos del NO con respecto a la recuperación funcional del miocardio por efectos ligados a la producción de peroxinitrito(101;130). Igualmente, en modelos de corazón *in situ*, sometidos a breves períodos de isquemia, la producción de NO y superóxido también se ha correlacionado

con una limitación de la recuperación funcional(100;177), fenómenos intrincados con los mecanismos de aturdimiento. Otros, en cambio, han mostrado mejoría en la recuperación funcional del miocardio reperfundido al estimular el incremento en las concentraciones de NO, tanto en corazón aislado de rata(104;114;116;117;161) como en corazón porcino *in situ*(113). En cuanto a la limitación de la necrosis se refiere, los estudios se muestran consistentes en demostrar una limitación del tamaño del infarto del miocardio sometido a isquemia y reperfusión cuando se estimula la síntesis de NO, o se administran donantes de NO(102;103;115;116;120-122;127). A pesar de la consistencia en señalar este fenómeno, la discusión se abrió en cuanto a los mecanismos implicados, habiéndose postulado mayoritariamente una menor adhesión e infiltración de PMN en el miocardio reperfundido, así como una preservación de la actividad de NOS constitutiva (NOS3) y de la inducible (NOS2) (**tabla 2**, página 26). En buena medida, en muchos de estos trabajos no se discernía si los efectos se debían propiamente al NO, o eran mediados por GMPc, así como tampoco se explicaba cómo se mantiene el efecto beneficioso de las drogas en modelos de corazón aislado reperfundidos con soluciones cristaloides, exentas de PMN, o si podría atenuarse el efecto en modelos de corazón *in situ*, donde la hemoglobina y otras moléculas portadoras de hierro podrían actuar como potentes tamponadores del NO(112). Igualmente, los tiempos y vías de administración de las drogas eran muy dispares: pre-isquemia o durante la reperfusión, vía intracoronaria, endovenosa, o retrógrada por seno coronario (**tabla 2**). La experiencia previa de nuestro grupo en el corazón aislado de rata, reperfundido con cristaloides, señalaba, de forma coincidente con otros grupos(99), la capacidad de la L-arginina administrada antes de la isquemia para atenuar el daño por reperfusión. El efecto beneficioso observado en estos modelos difería del propuesto por otros grupos en modelos de corazón *in situ*(103;120;121;123) en los que se señalaba a la menor acumulación de PMN en el miocardio como la principal vía de protección de la muerte celular.

La base que sustentaba la hipótesis de nuestros experimentos se basaba en las observaciones de Agulló et al., derivadas de la administración de L-arginina antes de isquemia transitoria en un modelo de corazón aislado de rata, con efectos que eran reproducidos con análogos de GMPc, y abolidos con un inhibidor específico de la guanilil-ciclasa soluble(102).

6.2. Sobre los efectos beneficiosos de la administración de L-arginina en el modelo de corazón porcino *in situ*. De nuestros experimentos en el modelo porcino, puede concluirse que la administración de L-arginina antes de la deprivación energética es capaz de normalizar el contenido de GMPc del miocardio reperfundido y limitar la necrosis miocárdica, reduciendo el desarrollo de hipercontractura durante la reperfusión. Como se comentó previamente, la ausencia de cambios en el desarrollo de rigor, en el grado de expansión del miocardio isquémico o en el tiempo de aparición de las arritmias ventriculares isquémicas hace sugestivo que el efecto protector quede limitado a la reperfusión. Estos resultados son consistentes con nuestras observaciones previas en corazón de rata(102). Sobre cómo el GMPc ejerce su acción limitante de la hipercontractura, la hipótesis más plausible es que sea debido a un efecto de desensibilización de las miofibrillas al calcio(79;80), que puede estar mediado, en parte, por una perpetuación de la acidosis intracelular al inhibir el intercambiador Na^+/H^+ (81). El efecto desensibilizante de las miofibrillas al calcio puede ser más manifiesto en miocardio patológico, como el obtenido de humanos en insuficiencia cardíaca(178). Sobre la capacidad inotropa negativa del GMPc y, por tanto, capaz de reducir la hipercontractura, no puede descartarse que los efectos se deban a una menor disponibilidad de calcio, ya sea mediante inhibición del intercambiador Na^+/H^+ , o debido a inhibición de los canales L de calcio(88;89). Finalmente, cabe recordar que la estimulación del GMPc puede tener efectos inhibitorios sobre la activación de la síntesis de AMPc que sigue a la estimulación beta-adrenérgica(85;86).

La limitación de la comunicación célula a célula mediante cierre de los *gap junctions* en la reperfusión inicial, ha demostrado tener un efecto beneficioso, limitando la extensión de la necrosis por hipercontractura(52) en el miocardio reperfundido. En este sentido, se han descrito efectos inhibitorios de la permeabilidad de los *gap junctions* por GMPc(94;179), que podrían contribuir a la reducción del tamaño del infarto.

A diferencia del modelo de corazón aislado de rata (perfundido con una solución cristalóide) utilizado por Agulló et al.(102), en este modelo de corazón *in situ* podría jugar un papel el depósito de PMN en el miocardio reperfundido, como habían sugerido otros grupos(103;113;120;123). Para dilucidar esta posible implicación se estudió la actividad de mieloperoxidasa en tejido miocárdico sometido a isquemia-reperfusión y en miocardio control, y

aunque la actividad de mieloperoxidasa era superior en el miocardio reperfundido respecto al control, no se documentaron diferencias entre los dos grupos de tratamiento.

Finalmente, aunque en los experimentos en modelo porcino no se realizó ninguna serie adicional con análogos de GMPc con intención de verificar que los efectos son mediados por esta molécula, las observaciones en el modelo aislado de rata, con análogos de GMPc o inhibidores de la guanilil-ciclasa soluble(102;147), permiten inferir esta relación causal.

6.3. Sobre la administración de urodilatina: La relación de causalidad entre los efectos mostrados en cuanto a la reducción de la necrosis y el GMPc, se ve apoyada en nuestra serie de experimentos observando la falta de efectividad de concentraciones muy bajas de urodilatina (0.01 μ M), que se correlacionaron con una falta de capacidad para normalizar el contenido miocárdico de GMPc. La capacidad de la administración de urodilatina durante la reperfusión miocárdica para reducir la liberación de LDH y mejorar la recuperación funcional en el modelo de corazón aislado de rata, se puede reproducir, además, mediante la administración de 8-Br-GMPc(147). La estimulación de la guanilil-ciclasa de membrana mediante péptidos natriuréticos obvia, además, los efectos propios que puede tener el incremento en las concentraciones de NO. En este sentido, y sobre el momento en el que se ejerce el mecanismo de acción, el incremento en los niveles plasmáticos de GMPc fue muy rápido tras la administración de urodilatina (a diferencia del incremento más progresivo observado tras la administración de L-arginina), cosa que permitía su administración limitada al período de reperfusión inicial, eliminando por tanto la posibilidad de que el beneficio se debiera a una atenuación del daño isquémico.

De forma similar a lo observado con la administración de L-arginina, es difícil establecer que los efectos observados se deban a una mejoría de la función microvascular que condicione un menor depósito de PMN, dado lo reproducible de los efectos en un modelo de corazón aislado de rata perfundido con una solución cristalóide.

Aunque en los experimentos que se detallan en este trabajo no se observó una reducción en el grado de acortamiento de la distancia entre los cristales en telediástole en el miocardio reperfundido (utilizada con índice del desarrollo de hipercontractura), las observaciones en los experimentos del protocolo de L-arginina, así como la observación en miocitos aislados de que

el GMPc puede prevenir la hipercontractura(98), nos llevan a considerar que al menos en parte, los efectos beneficiosos se deben a un efecto directo sobre el aparato contráctil derivado de la normalización del contenido de GMPc. Experimentos previos de nuestro grupo en corazón aislado de rata, documentaron un efecto inotrope negativo de la urodilatina administrada tras isquemia transitoria(147), situación en la que de por sí ya existe una disminución de la sensibilidad de las miofibrillas al calcio (aturdimiento). Como se ha comentado previamente, no podemos descartar encontrarnos ante una falta de potencia para descubrir diferencias en el grado de desarrollo de hipercontractura derivadas del bajo número de observaciones válidas contabilizadas en el análisis estadístico. Los mecanismos de muerte tras isquemia y reperfusión que se observan en otros tejidos permiten inferir otras posibilidades de prevención de la muerte celular por mecanismos independientes de la hipercontractura. En este sentido, la administración de péptido natriurético atrial ha demostrado disminuir el daño por reperfusión hepático aumentando la resistencia celular al daño oxidativo que sigue a la activación de las células de Kupffer, disminuyendo el incremento de Ca^{2+} citosólico y la activación enzimática consecuente, efectos que son dependientes de GMPc(180-182). Aunque el papel que sobre la muerte celular en el miocardio reperfundido pueden jugar los radicales libres no es de orden principal, el GMPc podría colaborar, mediante la modulación de proteínas a través de kinasas, en la resistencia al estrés oxidativo.

Una de las observaciones más interesantes es la constatación tanto en el modelo de corazón aislado de rata como en el modelo *in situ* de que una estimulación muy por encima de lo normal en el contenido miocárdico de GMPc se sigue de una pérdida del efecto protector. La estimulación de la guanilil-ciclasa de membrana permite excluir los efectos de altas concentraciones de NO y peroxinitrito, que hubieran podido considerarse en caso de administración de L-arginina o nitratos, como mecanismo causante de este efecto bifásico. El hecho de que dosis muy altas de urodilatina (del orden de $1\mu M$), que no han demostrado efecto protector en nuestros experimentos, hayan sido capaces de reducir el desarrollo de hipercontractura en cardiomiocitos aislados(98), podrían hacer pensar que la pérdida de efecto protector de altas concentraciones de GMPc se deben a un mecanismo independiente de la activación-inactivación del aparato contráctil. Otras posibilidades no exploradas incluirían: 1) la posibilidad de que altas concentraciones de GMPc pudieran tener un efecto inhibitorio sobre

fosfodiesterasas de AMPc(183), ya sea de forma competitiva sobre el locus catalítico o por unión a otros locus específicos(68), perdiéndose así, de forma paradójica, el posible efecto inotrope negativo de la estimulación de GMPc; y 2) la posibilidad de que los efectos de la estimulación del GMPc en el miocardio reperfundido, tanto beneficiosos como neutros, esten mediados por la actividad de protein-kinasas G. Esta última posibilidad deja abierta una línea a explorar ya que es posible inhibir específicamente esta actividad enzimática mediante compuestos como el 8-4-clorofeniltioguanosin 3'-5' monofosfato (CPT-GMPc). Finalmente, aunque existen observaciones que evidencian la inducción de apoptosis en cardiomiocitos expuestos a altas dosis de PNA (1µM), y de forma dependiente de GMPc(184), o en cardiomiocitos que se han sometido a isquemia simulada y posteriormente han recibido una alta exposición a GMPc(138), es muy poco probable que la ausencia de protección frente a la necrosis observada en nuestros modelos se deba a fenómenos apoptóticos. Las dos horas de reperfusión utilizadas en nuestro modelo estaban dirigidas a cuantificar los efectos sobre la muerte celular inmediata y, aunque los fenómenos que pongan en marcha procesos apoptóticos hubieran podido iniciarse, los métodos de determinación de la necrosis miocárdica utilizados no pueden reflejar estos procesos. Una posibilidad pudiera implicar al endotelio como coadyuvante en el incremento del daño celular en presencia de una estimulación muy importante de la guanilil-ciclasa A (receptor de péptidos natriuréticos tipo A). Así, recientemente se ha descrito la reducción del daño por isquemia y reperfusión en un modelo de ratón genéticamente modificado, carente de guanilil-ciclasa A, por un mecanismo dependiente de la menor expresión de P-selectina en el endotelio reperfundido y, por tanto, con un menor depósito de PMN(170), aunque como ya hemos comentado previamente, la ausencia en la reducción de la muerte celular inmediata también se observaba en el modelo de corazón aislado de rata y perfundido con cristalóide (carente por tanto de PMN).

6.4. Sobre la administración de nitratos. Hasta la fecha, en la era de la trombolisis, los únicos ensayos clínicos controlados sobre la administración de nitratos en la fase aguda de un infarto agudo de miocardio, como coadyuvantes al tratamiento trombolítico, han sido los ensayos GISSI-3(145) e ISIS-4(146). En el primero se valoraban los efectos del trinitrato de glicerina transdérmico después de 24 horas de administración endovenosa, sobre la mejora de

la supervivencia y sobre la función ventricular. En el segundo se estudió el efecto de la administración de mononitrato de isosorbide hasta 60 mg/día, durante 30 días, sobre la mortalidad a 5 semanas. El estudio ISIS-4 mostró una reducción discreta de la mortalidad a 48 horas, sin beneficio a las 5 semanas. Este efecto, sin embargo no se observó en el primer ensayo. En el conjunto de los dos ensayos, el 70% de los pacientes recibió tratamiento trombolítico, aunque muchos pacientes acabarían recibiendo nitratos fuera de protocolo, ya fuese por presentar angina, como tratamiento antihipertensivo, o para tratamiento de insuficiencia cardíaca. En ningún caso la administración de los fármacos se asoció a una reducción de la mortalidad precoz, aunque no es posible tomar estos estudios como modelo del efecto de la administración de donantes de NO en la prevención del daño por reperfusión debido a que la administración de los compuestos podía iniciarse hasta 24 horas después del inicio de los síntomas, y el diseño factorial de los estudios permitía que recibieran concomitantemente inhibidores de la ECA. El estudio ESPRIM(185) evaluó el efecto del tratamiento endovenoso en fase aguda de un infarto de miocardio del donante de NO molsidomina. El estudio se comparó con placebo, y entre 1990 y 1992 se incluyeron 4017 pacientes de los que la mitad recibieron tratamiento trombolítico. La mortalidad a 30 días no mostró diferencias entre los grupos (8.4 vs 8.8%). A la vista de estos resultados, y sobre todo tras la publicación del ISIS-4, las perspectivas de los nitratos como tratamiento dirigido a reducir el tamaño del infarto quedó en entredicho(146).

Sin embargo, los modelos experimentales de isquemia y reperfusión miocárdica que han evaluado la capacidad de los donantes de NO(105;114;115;122;186) han mostrado, como ya se ha comentado previamente, una mejoría en la recuperación funcional, una reducción en el tamaño del infarto y/o una menor adhesión de PMN al endotelio (por menor expresión selectinas(186)), así como una menor agregación plaquetar. A diferencia de los estudios clínicos, en el laboratorio tanto los períodos de isquemia como de reperfusión son controlados, y la reperfusión es rápida, completa y controlada, asegurando que las drogas o intervenciones realizadas se realicen en el momento de la reperfusión inicial. En este sentido, los ensayos multicéntricos comentados (GISSI-3, ISIS-4, ESPRIM) distan mucho de la situación óptima investigada en el laboratorio. La reperfusión se llevaba a cabo mediante trombolisis, que sólo se administraba en el 70% de los casos, con unos índices de efectividad evidentemente

inferiores. La reperfusión arterial es en estas circunstancias, a diferencia de lo que acontece en el laboratorio o en el curso de una angioplastia primaria, lenta. Finalmente, los tratamientos se podían iniciar en el curso de las primeras 24 horas, bastantes horas más tardes del momento crítico de la reperfusión inicial, con una utilización libre de nitratos en ambos grupos de tratamiento (a criterio del clínico) hasta el momento de la randomización. Por todo ello, si bien es cierto que a raíz de estos ensayos no existe evidencia de un beneficio de la administración de nitratos en el infarto agudo de miocardio tratado con trombolíticos, cuando se inicia su administración hasta 24 horas después del inicio del dolor, tampoco puede concluirse que la administración de estos fármacos, asegurando niveles de los mismos en el momento de la reperfusión inicial, no pueda ser beneficiosa. Hay que considerar aquí el hecho de que una parte de la población que sufre un infarto de miocardio lo hace estando bajo tratamiento con nitratos, ya sea por ser pacientes crónicos o por haber presentado angina preinfarto (siendo un factor de confusión con los mecanismos de preconditionamiento), y su uso, como el de la aspirina, se ha asociado a la presencia de síndromes coronarios agudos de menor severidad (más angina inestable que infarto, y más infarto sin onda Q que infarto con onda Q)(187;188).

Los resultados de la experiencia previa con la potenciación de la síntesis de NO mediante la administración de L-arginina, así como la estimulación de la síntesis de GMPc por mecanismos independientes de NO como es la administración de péptidos natriuréticos, permitía hipotetizar efectos similares mediante la administración de nitratos. Los resultados de nuestros experimentos en el modelo porcino son concordantes con esta hipótesis, a pesar de que los resultados no permiten dirigir hipótesis hacia el mecanismo de acción, sino suponer acciones comunes con las observadas en los otros protocolos. En el protocolo de administración de nitratos, la realización de daño intimal coronario facilitaba la presencia de trombosis en el lugar de oclusión durante la reperfusión, que podía condicionar reducciones cíclicas del flujo coronario. No se observaron diferencias significativas entre los grupos, suponiendo poca potencia en los efectos antiplaquetarios del 5-MNI para prevenir este fenómeno, en comparación con la administración de bloqueantes de los receptores IIb/IIIa plaquetarios en este mismo modelo(62). La administración de 5-MNI a dosis utilizadas habitualmente en clínica, consigue en el modelo porcino niveles en sangre con un pico a los 45 minutos de su administración, para mantenerse posteriormente estables hasta el momento de

finalización de los experimentos, sin observar efectos deletéreos (hipotensión) en el grupo tratado respecto al placebo. Creemos que estos resultados pueden colaborar en mantener viva la discusión sobre la capacidad de estos fármacos de colaborar en reducir el tamaño de la necrosis cuando se administran como tratamiento coadyuvante a la reperfusión del miocardio(141).

7. Implicaciones terapéuticas.

Las estrategias dirigidas a la reducción del daño celular letal por reperfusión necesitan que las condiciones que se dan en la reperfusión inicial sean modificadas desde el mismo instante en que ésta se da. Así, los protocolos del conjunto de estos trabajos, se han dirigido a evitar la reducción en el contenido miocárdico de GMPc en el momento de la reperfusión, asociándose a una reducción del tamaño del infarto, fenómeno que traducido a gran escala y en la clínica tendría que asociarse a una reducción de la mortalidad en el seguimiento.

A pesar de que la extrapolación directa de los resultados del modelo porcino a humanos no es posible, por diferencias interespecie y porque los mecanismos de oclusión coronaria trombótica que se dan en la clínica no han sido reproducidos, las tres estrategias estudiadas (administración del precursor de NO –L-arginina-, administración del péptido natriurético urodilatina y administración de 5-MNI) han mostrado un perfil de tolerancia hemodinámica muy bueno, sin alterar los parámetros bioquímicos en el período de tiempo estudiado. Además, como se ha comentado, las drogas estudiadas ya han sido probadas en otros contextos clínicos (o similares en el caso del 5-MNI) en pacientes, incluso a dosis superiores.

Sobre los diferentes modelos utilizados para estimular la producción de GMPc, ya sea mediante la guanilil-ciclasa soluble o la particulada, cabe comentar que estas moléculas se encuentran en todas las células de los mamíferos. Evidentemente, las particularidades propias del modelo de corazón aislado de rata difieren de los modelos porcino y humano, en cuanto a la mayor frecuencia cardíaca y corta duración del potencial de acción transmembrana, cosa que pudiera incluso atenuar en este modelo los posibles efectos del GMPc sobre los canales de calcio sarcoplasmiales, reforzando la hipótesis de una acción común en las diferentes especies sobre el aparato contráctil.

Situaciones clínicas que pueden beneficiarse de la adición de tratamientos coadyuvantes de la reperfusión incluyen el infarto agudo de miocardio (especialmente el tratado mediante angioplastia primaria, donde el flujo se recupera bruscamente, de forma más rápida y completa), las intervenciones coronarias percutáneas complicadas con oclusiones transitorias de la arteria y, aunque es más propio de la protección miocárdica, la isquemia y reperfusión que sigue al paro circulatorio de la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea, y el trasplante cardíaco. La urodilatina, por su capacidad para estimular de forma rápida la síntesis de GMPc y evitar en nuestro modelo la depleción de GMPc miocárdico se muestra como la droga más atractiva para su rápida administración en el contexto del infarto agudo de miocardio o del intervencionismo coronario complicado con oclusión arterial. Los posibles estudios que se derivan de estas observaciones deberían estar dirigidos a dilucidar en humanos qué concentraciones de urodilatina plasmática consiguen normalizar el contenido de GMPc miocárdico, para determinar el margen terapéutico beneficioso de la droga, e igualmente deberían dirigirse a demostrar su capacidad en la reducción de la necrosis y/o la mortalidad en situaciones coadyuvantes a la reperfusión del miocardio. La determinación *in vivo* del GMPc miocárdico no es posible mediante técnicas de imagen no invasivas, cosa que limitaría el estudio a la determinación del contenido plasmático de GMPc en sangre periférica, seno coronario, o en células fácilmente asequibles (como las sanguíneas) que hubieran demostrado (a nivel experimental) una correlación con las concentraciones miocárdicas del mismo. A pesar de estas limitaciones, la urodilatina ya ha sido administrada en humanos con buena tolerancia a dosis más altas(73;161) de las que en nuestro modelo porcino han demostrado limitar la necrosis en el momento de la reperfusión, cosa que no impediría la realización de estudios piloto en humanos.

Por el contrario, la L-arginina se ha mostrado como una estrategia beneficiosa cuando se administra antes de la fase de isquemia, cosa que limita su posible utilidad a situaciones de angina inestable de alto riesgo, a la cirugía cardíaca con paro circulatorio o a las intervenciones percutáneas de riesgo, pudiéndose administrar con seguridad en estos casos, dado su casi nulo perfil tóxico. Un ejemplo de administración de una droga antes de la isquemia, siguiendo las observaciones previamente observadas en los laboratorios de cardiología experimental, lo

constituyó el estudio multicéntrico GUARDIAN, donde el cariporide (inhibidor del intercambiador Na^+/H^+) se administró en situaciones de alto riesgo isquémico(45).

Finalmente, y como se ha comentado en el apartado inmediatamente anterior, los nitratos son fármacos ampliamente utilizados en la fase aguda de un infarto agudo de miocardio, a pesar de que su utilidad como fármaco eficaz en reducir el tamaño del infarto y, por tanto, en mejorar la supervivencia está en discusión(141). Nuestros resultados, además de ser consistentes con los efectos observados en un modelo similar tras la administración de L-arginina y urodilatina, permiten reabrir la posibilidad de volver a estudiar de forma controlada su efecto en pacientes con infarto agudo de miocardio, siempre y cuando se aseguren niveles terapéuticos de los mismos desde el momento de la reperfusión.

CONCLUSIONES.

De este trabajo puede concluirse finalmente que:

1. La administración del precursor de la síntesis de óxido nítrico -L-arginina- a dosis de 100 mg/Kg/min durante 20 minutos en cerdos anestesiados con tiopental, a los que se practica una toracotomía quirúrgica, es bien tolerada hemodinámicamente y no altera las determinaciones bioquímicas ni hematológicas a las 3 horas de su administración.
2. La administración de L-arginina, a las dosis comentadas, antes de una oclusión coronaria transitoria se asocia a una elevación de los niveles plasmáticos de GMPc durante el período de reperfusión inicial, y a una preservación del contenido miocárdico de GMPc.
3. Los animales tratados con L-arginina presentaron, en comparación con los que recibieron una solución placebo, una reducción del tamaño del infarto independiente del depósito de PMN en el miocardio reperfundido y que, en cambio, se asocia a una reducción en los índices que reflejan hipercontractura en el territorio sometido a isquemia-reperfusión.
4. Tras períodos de isquemia transitorios, el miocardio reperfundido presenta una depleción en la concentración de GMPc en comparación con el miocardio normóxico, efecto observado tanto en el corazón aislado de rata como en el corazón porcino *in situ*.
5. La administración del péptido natriurético urodilatina en la reperfusión miocárdica inicial, a baja concentración (suficiente para normalizar el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido), se asocia a una reducción en el tamaño de la necrosis, en comparación con la administración de placebo. Estos efectos son similares tanto en un modelo de corazón aislado de rata como en un modelo de corazón porcino *in situ*, sometidos a isquemia y reperfusión.

6. La administración de urodilatina en la reperfusión miocárdica inicial, a concentraciones de 5 a 10 veces superiores a las que consiguen normalizar el contenido de GMPc en el miocardio reperfundido, se siguen de una elevación en el contenido de GMPc en el miocardio sometido a isquemia y reperfusión muy por encima de la observada en el miocardio normóxico. A estas concentraciones se pierde el efecto beneficioso en cuanto a reducción de la necrosis se refiere, observado con concentraciones las más bajas.
7. Tanto la administración de dosis bajas (10 ng/Kg/min) como altas (50 ng/Kg/min) de urodilatina en el modelo de corazón porcino *in situ*, se siguieron de rápidos aumentos en las concentraciones plasmáticas de GMPc, sin efecto deletéreo en los parámetros hemodinámicos ni bioquímicos de los animales.
8. La administración de 5-MNI a dosis de 0.3 mg/Kg de peso, por sonda nasogástrica, consigue en un modelo porcino a tórax abierto, niveles detectables del fármaco, alcanzando una fase de meseta a los 45 minutos de su administración y sin efectos deletéreos en las variables hemodinámicas de los animales.
9. La administración de 5-MNI a estas dosis, antes de someter a los animales a un protocolo de isquemia y reperfusión miocárdica, se asocia a una reducción del tamaño del infarto en comparación con la administración de una solución placebo.
10. Finalmente, puede concluirse que tres estrategias dirigidas a estimular la producción de GMPc en el contexto de isquemia y reperfusión miocárdica en modelos de corazón aislado de rata y/o corazón porcino *in situ*, se han mostrado efectivas para reducir el tamaño de la necrosis en comparación con placebo, y seguras en cuanto a su tolerancia hemodinámica, dejando la puerta abierta a su posible uso en estudios piloto controlados en humanos.

1. Divisi3n celular. In: Alberts B, Bray D, Johnson A, Lewis J, eds. Introducci3n a la biologa celular. Gardland Publishing Inc, OMEGA, 1998:549-71.
2. Generalitat de Catalunya-Servei Catala de la Salut. Registre del CMBDAH. Pla de Salut de Catalunya 1999-2000. 1999. Publicacions de la Generalitat de Catalunya.
3. Gaziano JM. Global burden of cardiovascular disease. In: Braunwald E, ed. Heart Disease 6th edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 2001:1-18.
4. Marrugat J, Elosua R, Marti H. [Epidemiology of ischaemic heart disease in Spain: estimation of the number of cases and trends from 1997 to 2005]. Rev Esp Cardiol 2002;55:337-46.
5. Chambless L, Keil U, Dobson A et al. Population versus clinical view of case fatality from acute coronary heart disease: results from the WHO MONICA Project 1985-1990. Multinational MONitoring of Trends and Determinants in Cardiovascular Disease. Circulation 1997;96:3849-59.
6. White HD, Van de Werf FJ. Thrombolysis for acute myocardial infarction. Circulation 1998;97:1632-46.
7. Holmes DR, Jr., Califf RM, Topol EJ. Lessons we have learned from the GUSTO trial. Global Utilization of Streptokinase and Tissue Plasminogen Activator for Occluded Arteries. J Am Coll Cardiol 1995;25:10S-7S.
8. Indications for fibrinolytic therapy in suspected acute myocardial infarction: collaborative overview of early mortality and major morbidity results from all randomised trials of more than 1000 patients. Fibrinolytic Therapy Trialists' (FTT) Collaborative Group. Lancet 1994;343:311-22.
9. Bosch X, Sambola A, Aros F et al. [Use of thrombolytic treatment in patients with acute myocardial infarction in Spain. Observations from the PRIAMHO study]. Rev Esp Cardiol 2000;53:490-501.
10. Franzosi MG, Santoro E, De Vita C et al. Ten-year follow-up of the first megatrial testing thrombolytic therapy in patients with acute myocardial infarction: results of the Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'Infarto-1 study. The GISSI Investigators. Circulation 1998;98:2659-65.
11. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction. The GUSTO investigators. N Engl J Med 1993;329:673-82.
12. Weaver WD, Litwin PE, Martin JS et al. Effect of age on use of thrombolytic therapy and mortality in acute myocardial infarction. The MITI Project Group. J Am Coll Cardiol 1991;18:657-62.
13. Garcia J, Fiol M, Cabades A et al. [Variability in the In-Hospital Management of Acute Myocardial Infarction in Spain. IBERICA Study]. Rev Esp Cardiol 2001;54:443-52.
14. Peraire M, Martin-Baranera M, Pallares C. [Impact of thrombolytic therapy on short and long-term survival of a cohort of patients with acute myocardial infarction consecutively admitted to all the hospitals of a health care area. GESIR-5 study]. Rev Esp Cardiol 2001;54:150-8.

15. Echanove E, I, Velasco Rami JA, Ridocci SF et al. [Changes in hospital mortality from acute myocardial infarction during the last 15 years. The impact of reperfusion treatments]. *Rev Esp Cardiol* 1999;52:547-55.
16. Gil M, Marrugat J, Sala J et al. Relationship of therapeutic improvements and 28-day case fatality in patients hospitalized with acute myocardial infarction between 1978 and 1993 in the REGICOR study, Gerona, Spain. The REGICOR Investigators. *Circulation* 1999;99:1767-73.
17. Swedberg K, Held P, Kjekshus J, Rasmussen K, Ryden L, Wedel H. Effects of the early administration of enalapril on mortality in patients with acute myocardial infarction. Results of the Cooperative New Scandinavian Enalapril Survival Study II (CONSENSUS II). *N Engl J Med* 1992;327:678-84.
18. Gottlieb S, Moss AJ, McDermott M, Eberly S. Interrelation of left ventricular ejection fraction, pulmonary congestion and outcome in acute myocardial infarction. *Am J Cardiol* 1992;69:977-84.
19. The effects of tissue plasminogen activator, streptokinase, or both on coronary-artery patency, ventricular function, and survival after acute myocardial infarction. The GUSTO Angiographic Investigators. *N Engl J Med* 1993;329:1615-22.
20. Van de Werf FJ. New aspects of pharmacological reperfusion: from macro- to microlysis. *Cardiovasc Res* 2001;3 (suppl C):C62-C68.
21. Cerra FB, Lajos TZ, Montes M, Siegel JH. Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia. *Surgery* 1975;78:95-104.
22. Becker RC, Pezzella AT. Myocardial Rupture. In: Topol EJ, ed. *Acute Coronary Syndromes* 2nd ed. New York: Marcel Dekker, Inc., 2001:639-87.
23. Ryden L, Sjoquist PO, Wang QD. Pharmacological tools for the limitation of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2001;3 (suppl C):C28-C35.
24. Hearse DJ. Ischaemia, reperfusion and cardioprotection: successes and failures in the journey from molecule to man. *Eur Heart J Supplements* 2001;3(Suppl C):C11-C21.
25. Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality? *Heart* 2000;83:381-7.
26. Piper HM, Garcia-Dorado D. Prime causes of rapid cardiomyocyte death during reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1913-9.
27. Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993;21:537-45.
28. Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992;26:101-8.
29. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998;38:291-300.

30. Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989;80:1049-62.
31. Murad F. Cellular signaling with nitric oxide and cyclic GMP. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:1317-27.
32. Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM. Importance of sodium for recovery of calcium control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1994;267:H506-H513.
33. Siegmund B, Klietz T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1991;260:H426-H435.
34. Garcia-Dorado D, Theroux P, Duran JM et al. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 1992;85:1160-74.
35. Ladilov YV, Siegmund B, Balser C, Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 1997;80:69-75.
36. Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1995;268:H1531-H1539.
37. Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. The myocardial Na⁽⁺⁾-H⁽⁺⁾ exchange: structure, regulation, and its role in heart disease. *Circ Res* 1999;85:777-86.
38. Yoshida K, Inui M, Harada K et al. Reperfusion of rat heart after brief ischemia induces proteolysis of caldesmon (nonerythroid spectrin or fodrin) by calpain. *Circ Res* 1995; 77:603-10.
39. Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997;80:393-9.
40. Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7. Implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 1991;278 (Pt 3):715-9.
41. Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem* 1997;174:159-65.
42. Griffiths EJ, Halestrap AP. Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J* 1995;307 (Pt 1):93-8.
43. Piper HM, Balser C, Ladilov YV et al. The role of Na⁺/H⁺ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996;91:191-202.
44. Garcia-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabes JA et al. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Cardiovasc Res* 1997;35:80-9.
45. Theroux P, Chaitman BR, Danchin N et al. Inhibition of the sodium-hydrogen exchanger with cariporide to prevent myocardial infarction in high-risk ischemic situations. Main results of the

- GUARDIAN trial. Guard during ischemia against necrosis (GUARDIAN) Investigators. *Circulation* 2000;102:3032-8.
46. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Solares J, Soler J. The role of Na⁺-H⁺ exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation-induced myocardial oedema. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1167-75.
 47. Garcia-Dorado D, Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993;27:1555-63.
 48. Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Gonzalez MA, Barrabes JA, Soler-Soler J. Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition. *Cardiovasc Res* 1995;30:64-9.
 49. Garcia-Dorado D, Theroux P, Munoz R et al. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* 1992;262:H17-H22.
 50. Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983;15:67-73.
 51. Solares J, Garcia-Dorado D, Oliveras J et al. Contraction band necrosis at the lateral borders of the area at risk in reperfused infarcts. Observations in a pig model of in situ coronary occlusion. *Virchows Arch* 1995;426:393-9.
 52. Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M et al. Gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* 1997;96:3579-86.
 53. Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989;80:1115-27.
 54. Opie L. Mechanisms of cardiac contraction and relaxation. In: Braunwald E, ed. *Heart Disease* 6th edition. W.B. Saunders Company, 2001:443-78.
 55. Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-34.
 56. Gao WD, Atar D, Backx PH, Marban E. Relationship between intracellular calcium and contractile force in stunned myocardium. Direct evidence for decreased myofilament Ca²⁺ responsiveness and altered diastolic function in intact ventricular muscle. *Circ Res* 1995;76:1036-48.
 57. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999;138:S69-S75.
 58. Park JL, Lucchesi BR. Mechanisms of myocardial reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1999;68:1905-12.
 59. Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Oliveras J et al. Intimal injury in a transiently occluded coronary artery increases myocardial necrosis. Effect of aspirin. *Pflugers Arch* 1996;432:663-70.

60. Lucchesi BR. Myocardial ischemia, reperfusion and free radical injury. *Am J Cardiol* 1990;65:141-231.
61. Lefer AM. Role of selectins in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg* 1995;60:773-7.
62. Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Mirabet M et al. Lack of effect of glycoprotein IIb/IIIa blockade on myocardial platelet or polymorphonuclear leukocyte accumulation and on infarct size after transient coronary occlusion in pigs. *J Am Coll Cardiol* 2001;in press.
63. Topol EJ. Reperfusion therapy for acute myocardial infarction with fibrinolytic therapy or combination reduced fibrinolytic therapy and platelet glycoprotein IIb/IIIa inhibition: the GUSTO V randomised trial. *Lancet* 2001;357:1905-14.
64. Efficacy and safety of tenecteplase in combination with enoxaparin, abciximab, or unfractionated heparin: the ASSENT-3 randomised trial in acute myocardial infarction. *Lancet* 2001;358:605-13.
65. Kumar A, Villani MP, Patel UK, Keith JC, Jr., Schaub RG. Recombinant soluble form of PSGL-1 accelerates thrombolysis and prevents reocclusion in a porcine model. *Circulation* 1999;99:1363-9.
66. Di Diego JM, Antzelevitch C. High $[Ca^{2+}]_o$ -induced electrical heterogeneity and extrasystolic activity in isolated canine ventricular epicardium. Phase 2 reentry. *Circulation* 1994;89:1839-50.
67. Garcia-Dorado D, Theroux P, Alonso J et al. Intracoronary infusion of superoxide dismutase and reperfusion injury in the pig heart. *Basic Res Cardiol* 1990;85:619-29.
68. Lucas KA, Pitari GM, Kazerounian S et al. Guanylyl cyclases and signaling by cyclic GMP. *Pharmacol Rev* 2000;52:375-414.
69. Chinkers M, Garbers DL, Chang MS et al. A membrane form of guanylate cyclase is an atrial natriuretic peptide receptor. *Nature* 1989;338:78-83.
70. Foster DC, Wedel BJ, Robinson SW, Garbers DL. Mechanisms of regulation and functions of guanylyl cyclases. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 1999;135:1-39.
71. Chinkers M, Garbers DL. The protein kinase domain of the ANP receptor is required for signaling. *Science* 1989;245:1392-4.
72. Levin ER, Gardner DG, Samson WK. Natriuretic peptides. *N Engl J Med* 1998;339:321-8.
73. Forssmann W, Meyer M, Forssmann K. The renal urodilatin system: clinical implications. *Cardiovasc Res* 2001;51:450-62.
74. Koller KJ, Lowe DG, Bennett GL et al. Selective activation of the B natriuretic peptide receptor by C-type natriuretic peptide (CNP). *Science* 1991;252:120-3.
75. Garbers DL. The guanylyl cyclase receptor family. *New Biol* 1990;2:499-504.

76. Hempel A, Noll T, Bach C et al. Atrial natriuretic peptide clearance receptor participates in modulating endothelial permeability. *Am J Physiol* 1998;275:H1818-H1825.
77. Hempel A, Noll T, Muhs A, Piper HM. Functional antagonism between cAMP and cGMP on permeability of coronary endothelial monolayers. *Am J Physiol* 1996;270:H1264-H1271.
78. Schutte H, Witzernath M, Mayer K et al. The PDE inhibitor zaprinast enhances NO-mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2000;279:L496-L502.
79. Pfitzer G, Ruegg JC, Flockerzi V, Hofmann F. cGMP-dependent protein kinase decreases calcium sensitivity of skinned cardiac fibers. *FEBS Lett* 1982;149:171-5.
80. Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH. Effects of 8-bromo-cyclic GMP on contraction and on inotropic response of ferret cardiac muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:55-64.
81. Ito N, Bartunek J, Spitzer KW, Lorell BH. Effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes. *Circulation* 1997;95:2303-11.
82. Shah AM, Spurgeon HA, Sollott SJ, Talo A, Lakatta EG. 8-bromo-cGMP reduces the myofilament response to Ca²⁺ in intact cardiac myocytes. *Circ Res* 1994;74:970-8.
83. Drexler H. Nitric oxide synthases in the failing human heart: a doubled-edged sword? *Circulation* 1999;99:2972-5.
84. Kelly RA, Balligand JL, Smith TW. Nitric oxide and cardiac function. *Circ Res* 1996;79 :363-80.
85. Watanabe AM, Besch HR, Jr. Interaction between cyclic adenosine monophosphate and cyclic guanosine monophosphate in guinea pig ventricular myocardium. *Circ Res* 1975;37:309-17.
86. Keane JF, Jr., Hare JM, Balligand JL, Loscalzo J, Smith TW, Colucci WS. Inhibition of nitric oxide synthase augments myocardial contractile responses to beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol* 1996;271:H2646-H2652.
87. Shigekawa M, Iwamoto T. Cardiac Na(+)-Ca(2+) exchange: molecular and pharmacological aspects. *Circ Res* 2001;88:864-76.
88. Hartzell HC, Fischmeister R. Opposite effects of cyclic GMP and cyclic AMP on Ca²⁺ current in single heart cells. *Nature* 1986;323:273-5.
89. Levi RC, Alloatti G, Fischmeister R. Cyclic GMP regulates the Ca-channel current in guinea pig ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1989;413:685-7.
90. Mery PF, Lohmann SM, Walter U, Fischmeister R. Ca²⁺ current is regulated by cyclic GMP-dependent protein kinase in mammalian cardiac myocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991;88:1197-201.

91. Mery PF, Pavoine C, Belhassen L, Pecker F, Fischmeister R. Nitric oxide regulates cardiac Ca²⁺ current. Involvement of cGMP-inhibited and cGMP-stimulated phosphodiesterases through guanylyl cyclase activation. *J Biol Chem* 1993;268:26286-95.
92. Lohmann SM, Fischmeister R, Walter U. Signal transduction by cGMP in heart. *Basic Res Cardiol* 1991;86:503-14.
93. Sumii K, Sperelakis N. cGMP-dependent protein kinase regulation of the L-type Ca²⁺ current in rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1995;77:803-12.
94. De Mello WC. Atrial natriuretic factor reduces cell coupling in the failing heart, an effect mediated by cyclic GMP. *J Cardiovasc Pharmacol* 1998;32:75-9.
95. Kwak BR, Jongsma HJ. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* 1996;157:93-9.
96. Han J, Kim N, Kim E, Ho WK, Earm YE. Modulation of ATP-sensitive potassium channels by cGMP-dependent protein kinase in rabbit ventricular myocytes. *J Biol Chem* 2001;276:22140-7.
97. Moncada S. The first Robert Furchgott lecture: from endothelium-dependent relaxation to the L-arginine:NO pathway. *Blood Vessels* 1990;27:208-17.
98. Hempel A, Friedrich M, Schluter KD, Forssmann WG, Kuhn M, Piper HM. ANP protects against reoxygenation-induced hypercontracture in adult cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1997;273:H244-H249.
99. Mizuno T, Watanabe M, Sakamoto T, Sunamori M. L-arginine, a nitric oxide precursor, attenuates ischemia-reperfusion injury by inhibiting inositol-1,4,5-triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998;115:931-6.
100. Liu P, Hock CE, Nagele R, Wong PY. Formation of nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol* 1997;272:H2327-H2336.
101. 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;271:29223-30.
102. Agullo L, Garcia-Dorado D, Inseste J et al. L-arginine limits myocardial cell death secondary to hypoxia-reoxygenation by a cGMP-dependent mechanism. *Am J Physiol* 1999;276:H1574-H1580.
103. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992;86:279-88.
104. Engelman DT, Watanabe M, Engelman RM et al. Constitutive nitric oxide release is impaired after ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1995;110:1047-53.
105. Li XS, Uriuda Y, Wang QD, Norlander R, Sjoquist PO, Pernow J. Role of L-arginine in preventing myocardial and endothelial injury following ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart. *Acta Physiol Scand* 1996;156:37-44.

106. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M et al. Nitric oxide/carbon monoxide. A molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation* 1996;94:II398-II406.
107. Tenenbaum A, Fisman EZ, Motro M. L-Arginine: rediscovery in progress. *Cardiology* 1998;90:153-159.
108. Luscher TF, Haefeli WE. L-arginine in the clinical arena: tool or remedy? *Circulation* 1993;87:1746-1748.
109. Huk I, Nanobashvili J, Neumayer C et al. L-arginine treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *Circulation* 1997;96:667-75.
110. Cooke JP, Dzau VJ. Derangements of the nitric oxide synthase pathway, L-arginine, and cardiovascular diseases. *Circulation* 1997;96:379-82.
111. Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* 1997;100:2146-52.
112. Moncada S, Higgs A. The L-arginine-nitric oxide pathway. *N Engl J Med* 1993;329:2002-12.
113. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N et al. L-arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/reperfusion. *Ann Thorac Surg* 1995;60:1275-81.
114. Pabla R, Buda AJ, Flynn DM et al. Nitric oxide attenuates neutrophil-mediated myocardial contractile dysfunction after ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1996;78:65-72.
115. Brunner F, Leonhard B, Kukovetz WR, Mayer B. Role of endothelin, nitric oxide and L-arginine release in ischaemia/reperfusion injury of rat heart. *Cardiovasc Res* 1997;36:60-6.
116. Engelman DT, Watanabe M, Maulik N et al. Critical timing of nitric oxide supplementation in cardioplegic arrest and reperfusion. *Circulation* 1996;94:II407-II411.
117. Amrani M, Gray CC, Smolenski RT, Goodwin AT, London A, Yacoub MH. The effect of L-arginine on myocardial recovery after cardioplegic arrest and ischemia under moderate and deep hypothermia. *Circulation* 1997;96:II-274-9.
118. Yoshida K, Mizukami Y, Kitakaze M. Nitric oxide mediates protein kinase C isoform translocation in rat heart during postischemic reperfusion. *Biochim Biophys Acta* 1999;1453:230-8.
119. Wang QD, Morcos E, Wiklund P, Pernow J. L-arginine enhances functional recovery and Ca(2+)-dependent nitric oxide synthase activity after ischemia and reperfusion in the rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1997;29:291-6.
120. Nakanishi K, Vinten-Johansen J, Lefer DJ et al. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* 1992;263:H1650-H1658.

121. Pernow J, Uriuda Y, Wang QD, Li XS, Nordlander R, Rydeen L. The protective effect of L-arginine on myocardial injury and endothelial function following ischaemia and reperfusion in the pig. *Eur Heart J* 1994;15:1712-9.
122. Hoshida S, Nishida M, Yamashita N et al. Amelioration of severity of myocardial injury by a nitric oxide donor in rabbits fed a cholesterol-rich diet. *J Am Coll Cardiol* 1996;27:902-9.
123. Ma XL, Weyrich AS, Lefer DJ, Lefer AM. Diminished basal nitric oxide release after myocardial ischemia and reperfusion promotes neutrophil adherence to coronary endothelium. *Circ Res* 1993;72:403-12.
124. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M et al. Nitric oxide signaling in ischemic heart. *Cardiovasc Res* 1995;30:593-601.
125. Pabla R, Curtis MJ. Effect of endogenous nitric oxide on cardiac systolic and diastolic function during ischemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:2111-21.
126. Schluter KD, Jakob G, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors. *Am J Physiol* 1996;271:H428-H434.
127. Zhu B, Sun Y, Sievers RE et al. L-arginine decreases infarct size in rats exposed to environmental tobacco smoke. *Am Heart J* 1996;132:91-100.
128. Lee R, Nitta T, Schmid RA, Schuessler RB, Harris KM, Gay WA. Retrograde infusion of lidocaine or L-arginine before reperfusion reduces myocardial infarct size. *Ann Thorac Surg* 1998;65:1353-9.
129. Kanno S, Lee PC, Zhang Y et al. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury by superinduction of inducible nitric oxide synthase. *Circulation* 2000;101:2742-8.
130. Yasmin W, Strynadka KD, Schulz R. Generation of peroxynitrite contributes to ischemia-reperfusion injury in isolated rat hearts. *Cardiovasc Res* 1997;33:422-32.
131. Schulz R, Wambolt R. Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1995;30:432-9.
132. Beckman JS. -OONO: rebounding from nitric oxide. *Circ Res* 2001;89:295-7.
133. Lipton SA. Distinctive chemistries of no-related species. *Neurochem Int* 1996;29:111-4.
134. Casino PR, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Hoeg JM, Panza JA. Investigation of decreased availability of nitric oxide precursor as the mechanism responsible for impaired endothelium-dependent vasodilation in hypercholesterolemic patients. *J Am Coll Cardiol* 1994;23:844-50.
135. Chowienzyk P, Ritter J. Arginine: NO more than a simple aminoacid? *Lancet* 1997;350:901-2.

136. Zweier JL, Samouilov A, Kuppusamy P. Non-enzymatic nitric oxide synthesis in biological systems. *Biochim Biophys Acta* 1999;1411:250-62.
137. Taimor G, Rakow A, Piper HM. Transcription activator protein 1 (AP-1) mediates NO-induced apoptosis of adult cardiomyocytes. *FASEB J* 2001;15:2518-20.
138. Taimor G, Hofstaetter B, Piper HM. Apoptosis induction by nitric oxide in adult cardiomyocytes via cGMP-signaling and its impairment after simulated ischemia. *Cardiovasc Res* 2000;45:588-94.
139. Fármacos antianginosos. In: Florez J, Armijo JA, Mediavilla A, eds. *Farmacología Humana*. Pamplona: EUNSA, 1989:545-55.
140. Mueller RL, Scheidt S. Long-acting nitrates. In: Messerli FH, ed. *Cardiovascular drug therapy*. 2nd edition. Philadelphia: WB.Saunders Company, 1996:876-81.
141. Sleight P. Treatment Strategies after Myocardial Infarction. In: Messerli FH, ed. *Cardiovascular Drug Therapy*. 2nd Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996:298-303.
142. Yusuf S, Collins R, MacMahon S, Peto R. Effect of intravenous nitrates on mortality in acute myocardial infarction: an overview of the randomised trials. *Lancet* 1988;1:1088-92.
143. Long-term effects of intravenous thrombolysis in acute myocardial infarction: final report of the GISSI study. Gruppo Italiano per lo Studio della Streptochi-nasi nell'Infarto Miocardico (GISSI). *Lancet* 1987;2:871-4.
144. Intravenous streptokinase given within 0-4 hours of onset of myocardial infarction reduced mortality in ISIS-2. *Lancet* 1987;1:502.
145. GISSI-3: effects of lisinopril and transdermal glyceryl trinitrate singly and together on 6-week mortality and ventricular function after acute myocardial infarction. Gruppo Italiano per lo Studio della Sopravvivenza nell'infarto Miocardico. *Lancet* 1994;343:1115-22.
146. ISIS-4: a randomised factorial trial assessing early oral captopril, oral mononitrate, and intravenous magnesium sulphate in 58,050 patients with suspected acute myocardial infarction. ISIS-4 (Fourth International Study of Infarct Survival) Collaborative Group. *Lancet* 1995;345:669-85.
147. Insite J, Garcia-Dorado D, Agullo L, Paniagua A, Soler-Soler J. Urodilatin limits acute reperfusion injury in the isolated rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:351-9.
148. Hishikawa K, Nakaki T, Tsuda M et al. Effect of systemic L-arginine administration on hemodynamics and nitric oxide release in man. *Jpn Heart J* 1992;33:41-8.
149. Kanno K, Hirata Y, Emori T et al. L-arginine infusion induces hypotension and diuresis/natriuresis with concomitant increased urinary excretion of nitrite/nitrate and cyclic GMP in humans. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1992;19:619-25.
150. Bode-Boger SM, Boger RH, Creutzig A et al. L-arginine infusion decreases peripheral arterial resistance and inhibits platelet aggregation in healthy subjects. *Clin Sci (Colch)* 1994;87:303-10.

151. Bellamy MF, Goodfellow J, Tweddel AC, Dunstan FD, Lewis MJ, Henderson AH. Syndrome X and endothelial dysfunction. *Cardiovasc Res* 1998;40:410-7.
152. Thorne S, Mullen MJ, Clarkson P, Donald AE, Deanfield JE. Early endothelial dysfunction in adults at risk from atherosclerosis: different responses to L-arginine. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:110-6.
153. Campisi R, Czernin J, Schoder H, Sayre JW, Schelbert HR. L-Arginine normalizes coronary vasomotion in long-term smokers. *Circulation* 1999;99:491-7.
154. Lerman A, Burnett JC, Higano ST, McKinley LJ, Holmes DR. Long-term L-arginine supplementation improves small-vessel coronary endothelial function in humans. *Circulation* 1998;97:2123-8.
155. Tousoulis D, Davies GJ, Tentolouris C et al. Effects of changing the availability of the substrate for nitric oxide synthase by L-arginine administration on coronary vasomotor tone in angina patients with angiographically narrowed and in patients with normal coronary arteries. *Am J Cardiol* 1998;82:1110-3, A6.
156. Tousoulis D, Tentolouris C, Crake T et al. Effects of L- and D-arginine on the basal tone of human diseased coronary arteries and their responses to substance P. *Heart* 1999;81:505-11.
157. Blum A, Porat R, Rosenschein U et al. Clinical and inflammatory effects of dietary L-arginine in patients with intractable angina pectoris. *Am J Cardiol* 1999;83:1488-90, A8.
158. Bode-Boger SM, Boger RH, Alfke H et al. L-arginine induces nitric oxide-dependent vasodilation in patients with critical limb ischemia. A randomized, controlled study. *Circulation* 1996;93:85-90.
159. Boger RH, Bode-Boger SM, Thiele W, Creutzig A, Alexander K, Frolich JC. Restoring vascular nitric oxide formation by L-arginine improves the symptoms of intermittent claudication in patients with peripheral arterial occlusive disease. *J Am Coll Cardiol* 1998;32:1336-44.
160. Koifman B, Wollman Y, Bogomolny N et al. Improvement of cardiac performance by intravenous infusion of L-arginine in patients with moderate congestive heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1995;26:1251-6.
161. Elsner D, Muders F, Muntze A, Kromer EP, Forssmann WG, Riegger GA. Efficacy of prolonged infusion of urodilatin [ANP-(95-126)] in patients with congestive heart failure. *Am Heart J* 1995;129:766-73.
162. Thurmon JC, Tranquilli WJ. Anesthesia for cardiovascular research. In: Stanton HC, Mersmann HJ, eds. *Swine in Cardiovascular Research (vol I)*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc, 1986:39-59.
163. Bloor CM, White FC, Lammers RJ. Cardiac ischemia and coronary blood flow in swine. In: Stanton HC, Mersmann HJ, eds. *Swine in Cardiovascular Research (vol II)*. Boca Raton, Florida: CRC Press, Inc., 1986:87-104.
164. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J* 1981;101:593-600.

165. Barrabes JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M et al. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion in situ. Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch* 1996;431:519-26.
166. Griswold DE, Hillegass LM, Hill DE, Egan JW, Smith EF. Method for quantification of myocardial infarction and inflammatory cell infiltration in rat cardiac tissue. *J Pharmacol Methods* 1988;20:225-35.
167. Thadani U. Isosorbide Mononitrate. In: Messerli FH, ed. *Cardiovascular Drug Therapy*. 2nd Edition. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1996:881-5.
168. Fujiwara H, Ashraf M, Sato S, Millard RW. Transmural cellular damage and blood flow distribution in early ischemia in pig hearts. *Circ Res* 1982;51:683-93.
169. Garcia-Dorado D, Theroux P, Elizaga J et al. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1987;21:537-44.
170. Izumi T, Saito Y, Kishimoto I et al. Blockade of the natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A inhibits NF-kappaB activation and alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury. *J Clin Invest* 2001;108:203-13.
171. Padilla F, Garcia-Dorado D, Agullo L et al. L-Arginine administration prevents reperfusion-induced cardiomyocyte hypercontracture and reduces infarct size in the pig. *Cardiovasc Res* 2000;46:412-420.
172. Pabla R, Curtis MJ. Effects of NO modulation on cardiac arrhythmias in the rat isolated heart. *Circ Res* 1995;77:984-92.
173. Pabla R, Curtis MJ. Endogenous protection against reperfusion-induced ventricular fibrillation: role of neuronal versus non-neuronal sources of nitric oxide and species dependence in the rat versus rabbit isolated heart. *J Mol Cell Cardiol* 1996;28:2097-110.
174. Podzuweit T, Braun W, Muller A, Schaper W. Arrhythmias and infarction in the ischemic pig heart are not mediated by xanthine oxidase-derived free oxygen radicals. *Basic Res Cardiol* 1987;82:493-505.
175. Neshar R, Robinson WF, Gibb L, Bishop SP, Kruger FA. Cyclic nucleotide levels in the perfused rat heart subjected to hypoxia. *Experientia* 1977;33:215-7.
176. Takeuchi K, McGowan FX, Danh HC, Glynn P, Simplaceanu E, del Nido PJ. Direct detrimental effects of L-arginine upon ischemia--reperfusion injury to myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1405-14.
177. Mori E, Haramaki N, Ikeda H, Imaizumi T. Intra-coronary administration of L-arginine aggravates myocardial stunning through production of peroxynitrite in dogs. *Cardiovasc Res* 1998;40:113-23.
178. Hajjar RJ, Schwinger RH, Schmidt U et al. Myofilament calcium regulation in human myocardium. *Circulation* 2000;101:1679-85.

179. O'Donnell P, Grace AA. Cortical afferents modulate striatal gap junction permeability via nitric oxide. *Neuroscience* 1997;76:1-5.
180. Gerbes AL, Vollmar AM, Kiemer AK, Bilzer M. The guanylate cyclase-coupled natriuretic peptide receptor: a new target for prevention of cold ischemia-reperfusion damage of the rat liver. *Hepatology* 1998;28:1309-17.
181. Bilzer M, Gerbes AL. Preservation injury of the liver: mechanisms and novel therapeutic strategies. *J Hepatol* 2000;32:508-15.
182. Bilzer M, Jaeschke H, Vollmar AM, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of Kupffer cell-induced oxidant injury in rat liver by atrial natriuretic peptide. *Am J Physiol* 1999;276:G1137-G1144.
183. Du Toit EF, Meiring J, Opie LH. Relation of cyclic nucleotide ratios to ischemic and reperfusion injury in nitric oxide-donor treated rat hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 2001;38:529-38.
184. Wu CF, Bishopric NH, Pratt RE. Atrial natriuretic peptide induces apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes. *J Biol Chem* 1997;272:14860-6.
185. The ESPRIM trial: short-term treatment of acute myocardial infarction with molsidomine. European Study of Prevention of Infarct with Molsidomine (ESPRIM) Group. *Lancet* 1994;344:91-7.
186. Armstead VE, Minchenko AG, Schuhl RA, Hayward R, Nossuli TO, Lefer AM. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol* 1997;273:H740-H746.
187. Garcia-Dorado D, Theroux P, Tornos P et al. Previous aspirin use may attenuate the severity of the manifestation of acute ischemic syndromes. *Circulation* 1995;92:1743-8.
188. Garcia-Dorado D, Permanyer-Miralda G, Brotons C et al. Attenuated severity of new acute ischemic events in patients with previous coronary heart disease receiving long-acting nitrates. *Clin Cardiol* 1999;22:303-8.