

Resultados. Administración de L-arginina.

En la serie de 24 animales usados para la medida del tamaño del infarto, un animal murió a consecuencia de fibrilación ventricular intratable durante el período de oclusión, y dos presentaron reoclusión de la arteria coronaria descendente anterior durante el período de reperfusión. Los resultados que se presentan a continuación corresponden a los 21 restantes, distribuidos en dos grupos: 10 recibieron L-arginina y 11 recibieron placebo. Uno de los 8 animales utilizados para determinación de GMPc miocárdico presentó hipotensión intratable durante la fase de oclusión y fue excluido. Los resultados de este grupo corresponden a 7 animales (4 en el grupo tratamiento y 3 en el grupo control).

1. Efectos agudos de la infusión de L-arginina.

1.1. Concentraciones plasmáticas de L-arginina.

La concentración plasmática de L-arginina al comienzo del experimento era de $81.2 \pm 11.6 \mu\text{M}$ sin diferencias entre grupos. La infusión de L-arginina se siguió de un rápido aumento de sus niveles en plasma, hasta alcanzar valores significativamente superiores a los el grupo control en el momento de la oclusión (1496 ± 162 vs $82.8 \pm 3 \mu\text{M}$, $p < 0.0001$), en el momento de la reperfusión (380 ± 41.6 vs $96.7 \pm 11.2 \mu\text{M}$, $p < 0.0002$), y al final del experimento (215 ± 24.9 vs $125.5 \pm 10 \mu\text{M}$, $p < 0.005$) (**Fig 18**).

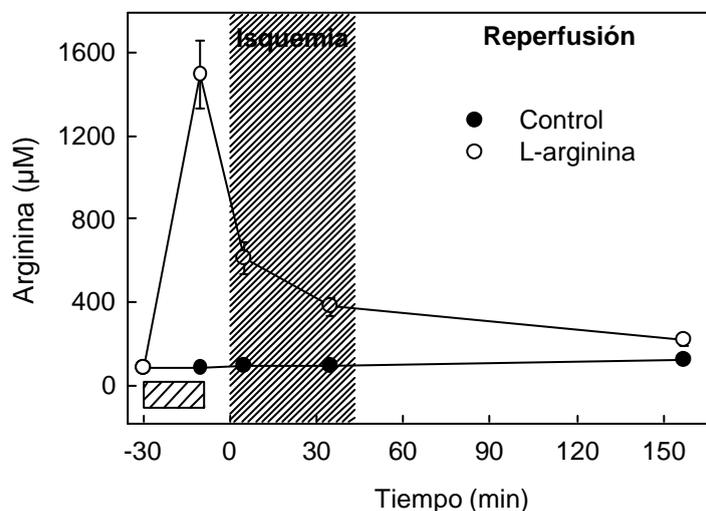


Figura 18. Se representa la evolución de los niveles plasmáticos de L-arginina (del orden de μM) en ambos grupos de tratamiento. La barra horizontal y barrada representa el tiempo de infusión de la solución que contenía L-arginina o placebo.

1.2. Hemodinámica.

Los cambios en las variables hemodinámicas, la contractilidad regional y el flujo coronario durante la infusión de L-arginina o placebo se representan en la **tabla 3**.

Tabla 3.

Variable	Antes de la infusión	Tras la infusión	Preoclusión
FC (lpm)			
L-arginina	76.9±3.3	86.3±5.4*	86.9±6.4*
Control	79.4±4.1	77.2±4.4	79.1±4.7
PAM (mmHg)			
L-arginina	77.0±8.4	90.0±4.8	89.6±5.9
Control	83.3±4.0	83.4±4.1	86.2±5.0
PSVI (mmHg)			
L-arginina	124.3±6.7	132.0±6.8*	131.1±9.1*
Control	116.3±6.3	121.8±5.6*	122.3±6.9*
PDVI (mmHg)			
L-arginina	9.6±1.3	11.6±1.0*	12.4±1.1*
Control	8.1±1.0	8.4±0.9	8.3±0.7
DTD (mm)			
L-arginina	8.5±0.7	8.7±0.7	8.8±0.8
Control	8.2±0.7	8.3±0.6	8.02±0.6
SS (%)			
L-arginina	20.7±1.3	21.1±2.7	21.3±1.0
Control	23.6±1.6	24.3±1.5	23.7±1.5
Flujo coronario (mL.min⁻¹)			
L-arginina	13.9±1.5	15.8±1.8*	15.9±2.1*
Control	14.8±2.9	14.5±3.1	14.9±3.3

Tabla 3. Valores hemodinámicos antes y después de la administración de L-arginina o placebo (control). DTD: Longitud telediastólica en el área en riesgo; FC: frecuencia cardíaca; PSVI: Presión sistólica del VI; PDVI: Presión diastólica del VI; PAM: Presión arterial media; SS: Fracción de acortamiento sistólico. (*) p<0.05 respecto al valor previo a la infusión.

La infusión de L-arginina fue seguida de un ligero incremento de la frecuencia cardíaca y del flujo coronario, que persistió sin cambios hasta el momento de la oclusión coronaria. El resto de variables no presentaron cambios significativos en este período preischemia.

1.3. Concentraciones plasmáticas de GMPc.

La concentración basal de GMPc en plasma era de 37.8 ± 7.2 pmol/ml al inicio del experimento, sin diferencias entre grupos. La infusión de L-arginina no tuvo efecto en los niveles de GMPc, que se mantuvieron similares en ambos grupos al inicio de la oclusión coronaria (37.1 ± 6.9 y de 35.9 ± 9.7 pmol/ml respectivamente, $p=0.92$).

2. Oclusión coronaria y reperfusión.

2.1 Hemodinámica.

Los cambios en frecuencia cardíaca durante los períodos de isquemia y reperfusión fueron virtualmente idénticos en los dos grupos de tratamiento. El pequeño incremento en frecuencia cardíaca que experimentó el grupo tratamiento antes de la oclusión se mantuvo a lo largo del experimento y la FC se mantuvo más elevada en el grupo que recibió L-arginina (114 ± 6.3 vs 97.5 ± 5.9 al inicio de la reperfusión, 114 ± 6.8 vs 95.4 ± 6.7 tras 5 min de reperfusión y 114 ± 5.5 vs 100 ± 3.6 tras 2 horas).

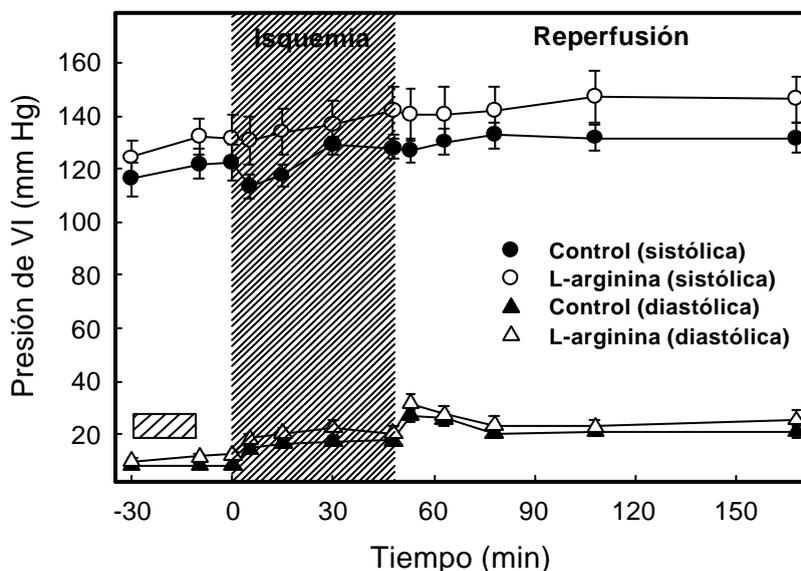


Figura 19. Representación en el tiempo de los valores de presión sistólica y diastólica del ventrículo izquierdo. La barra horizontal previa a la oclusión representa el tiempo de infusión de la solución que contenía L-arginina o placebo.

La presión aórtica media aumentó ligeramente, de 87.8 ± 16.3 mm Hg antes de la oclusión coronaria a 95.6 ± 15.3 mm Hg antes de la reperfusión, y posteriormente se mantuvo estable hasta el final del experimento (100 ± 15.9 mm Hg), sin diferencias entre grupos. Los cambios en la presión del VI durante el período de isquemia y reperfusión no fueron diferentes entre ambos grupos (**figura 19**).

2.2 Flujo coronario.

No hubo diferencias entre los dos grupos en el flujo coronario durante la reperfusión, aunque existió una tendencia no significativa hacia un mayor flujo en el grupo que recibió L-arginina respecto al grupo (**Figura 20**).

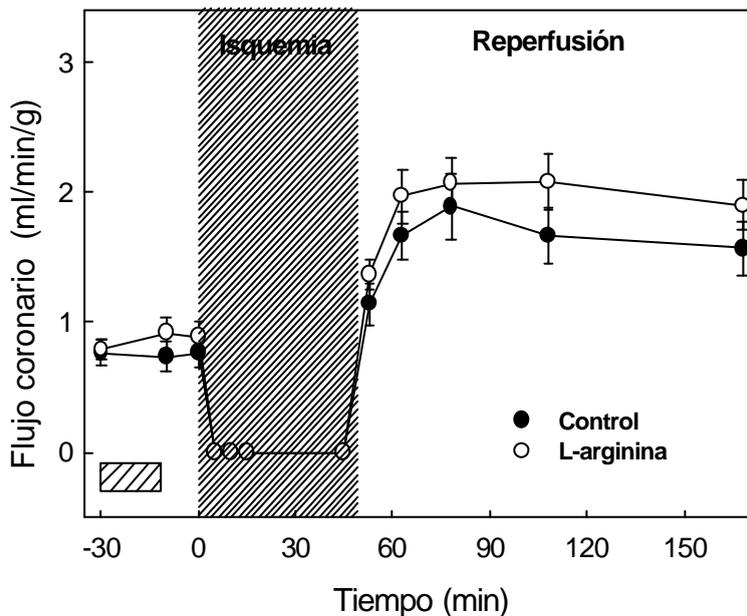


Figura 20. Flujo coronario registrado mediante transductor doppler a nivel del punto de disección de la arteria descendente anterior. Los valores están relativizados por la masa de miocardio en riesgo. La barra horizontal del inicio representa el tiempo de infusión de la solución que contenía L-arginina o placebo

2.3. Motilidad regional segmentaria.

La oclusión coronaria indujo un rápido y marcado aumento en los valores de EDSL, y una abolición del acortamiento sistólico que fue idéntico en los dos grupos de tratamiento, como se refleja en la figura (**figura 21**), al tiempo que aparecía disquinesia en la zona en riesgo. A los 5 minutos de oclusión coronaria la disquinesia había alcanzado su máxima expresión. A partir de este momento, la amplitud del cambio entre la distancia en telediástole (DTD) y telesístole (DTS) se asume como pasivo. A lo largo del período de oclusión esta amplitud de cambio se reduce paulatinamente como expresión del desarrollo de rigor

isquémico(34). Esta reducción se hacía evidente (inferior al 90% del valor a los 5 minutos) a los 19.7 ± 11 min, y a 45 min de oclusión alcanzó el 59.2 ± 4.0 % del valor a los 5 minutos, sin diferencias entre los dos grupos de tratamiento.

La perfusión coronaria se seguía de una reducción brusca de la distancia telediastólica (DTD) que fue más pronunciada en el grupo control. Contrariamente, en el grupo que recibió L-arginina la caída fue menos marcada y presentó un carácter más reversible que en el grupo que recibió la solución placebo, tal y como se aprecia en la figura (figura 21A). A los 30 min de perfusión, el valor de DTD fue 107.78 ± 3.15 % en el grupo que recibió L-arginina vs 97.88 ± 2.47 en los controles ($p=0.025$), y esta diferencia se mantuvo de forma significativa hasta el final del experimento (108.98 ± 3.50 vs 100.34 ± 2.09 , $p=0.043$). No se evidenció una recuperación significativa de la función contráctil (acortamiento sistólico) en la perfusión de manera que el valor del acortamiento sistólico se mantuvo próximo a 0% de forma prácticamente idéntica en los dos grupos. A los 5 minutos de perfusión, sin embargo, el grupo que recibió L-arginina presentó un valor significativamente más negativo que el grupo control, reflejo de una disquinesia más pronunciada (figura 21B).

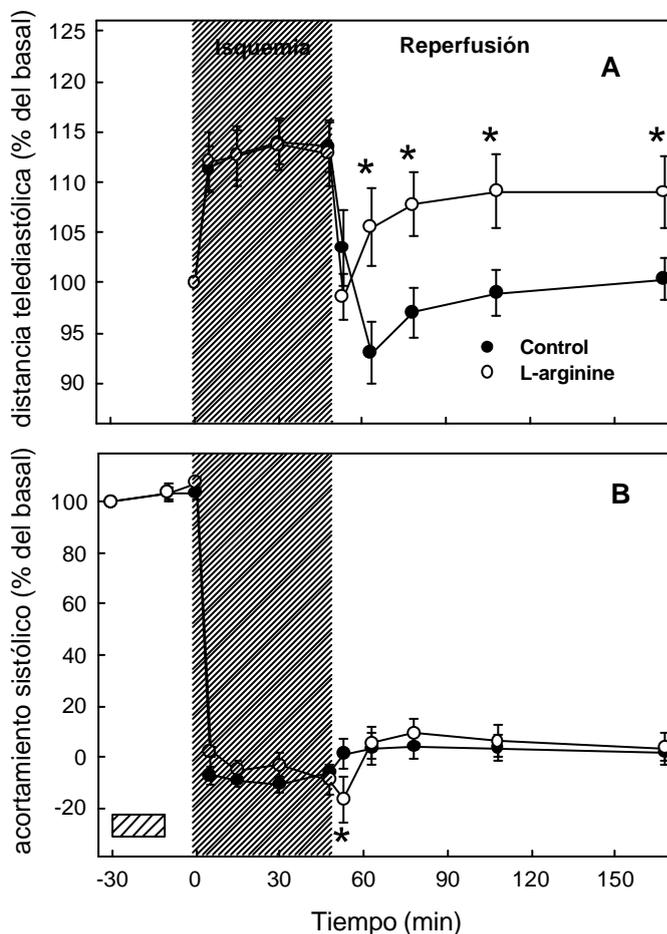


Figura 21. A) Representación de la evolución de la distancia telediastólica durante la oclusión y perfusión coronaria. En isquemia se observa un aumento de la misma, expresión de la expansión de la zona isquémica. En perfusión existe una marcada caída inicial, más pronunciada en el grupo control, para después volver lentamente a valores próximos a los basales. En el grupo tratado, la caída inicial fue menor, y durante la perfusión los valores fueron significativamente más altos que en el grupo que recibió placebo, expresión del menor desarrollo de hipercontractura. **B)** Acortamiento sistólico en el área en riesgo. En isquemia los valores cayeron a cero, sin diferencias entre grupos. En la perfusión inicial, el grupo tratado con L-arginina presentó una caída significativamente mayor a la del grupo control, expresión de un mayor desarrollo de disquinesia. (*= $p<0.05$)

Respecto a la contractilidad en el miocardio control (no sometido a isquemia y reperusión), no hubo diferencias entre grupos (**tabla 4**).

	Tratamiento	Basal	5 min isq.	48 min isq.	120 min rep.
DTD (% valor basal)	L-arginina	100	100 ± 3	101 ± 2	103 ± 4
	Placebo	100	100 ± 2	102 ± 3	102 ± 7
SS (%)	L-arginina	22.2 ± 1.5	21.3 ± 1.7	21.1 ± 1.8	19.9 ± 1.9
	Placebo	19.5 ± 2.5	18.7 ± 1.3	18.9 ± 1.1	17.0 ± 1.3

Tabla 4. DTD: distancia telediastólica; SS: acortamiento sistólico ([distancia telediastólica-distancia telesistólica]x100 / distancia telediastólica). Los valores representados corresponden a la situación basal preoclusión, a 5 y 48 min de isquemia y tras 120 min de reperusión. No existieron diferencias entre grupos. Los valores se expresan como media ± error estándar.

2.4. Arritmias.

Todos los animales presentaron extrasístoles ventriculares durante el período de oclusión coronario. Tres animales del grupo que recibió L-arginina y 3 del grupo control presentaron fibrilación ventricular a los 22.3 ± 2.1 y 26.7 ± 3.8 min de oclusión respectivamente ($p = 0.89$). Durante la reperusión, la fibrilación ventricular se presentó en 2 animales del grupo L-arginina y en ninguno del grupo control. También en el período de reperusión se documentó, en todos los animales, la presencia de salvas de ritmo idioventricular acelerado (RIVA). No hubo diferencias entre grupos en cuanto al tiempo de presentación de las salvas de RIVA (2 ± 0.42 vs 1.7 ± 0.22 min) ni en cuanto a su duración total (27.6 ± 13.7 vs 41.8 ± 9.8 min, $p=0.41$).

2.5. Concentraciones plasmáticas de GMPc.

Las concentraciones plasmáticas de GMPc durante el período de isquemia fueron similares en ambos grupos. Sin embargo, durante la reperusión, los valores de GMPc en plasma aumentaron transitoriamente, de forma que en el grupo que recibió L-arginina fueron superiores a los del grupo control (62.87 ± 13.8 pmol/L vs 43.13 ± 8.4 pmol/L) y significativamente diferentes respecto al valor basal que presentaban antes de la isquemia

($p=0.02$, **figura 22**). Al final de la reperfusión, no hubo diferencias entre grupos respecto a las determinaciones plasmáticas de GMPc.

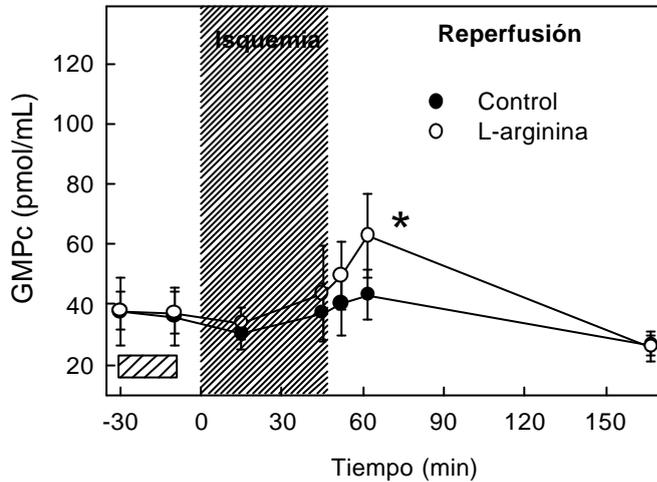


Figura 22. Determinaciones plasmáticas de GMPc para ambos grupos de tratamiento. La barra horizontal del inicio representa el tiempo de infusión de la solución que contenía L-arginina o placebo. (*= $p<0.05$).

2.6. Diferencia arteriovenosa en los niveles de GMPc.

En los 5 experimentos adicionales realizados para determinar los niveles de GMPc en sangre de la gran vena coronárica, los niveles basales fueron de 27.8 ± 6.4 pmol/mL. La infusión de L-arginina se siguió de un aumento transitorio en estos niveles, para conseguir un pico a los 10 minutos de reperfusión ($166 \pm 21\%$ del valor basal), sin observar un aumento de la misma magnitud en el grupo control ($122 \pm 38\%$ del valor basal), aunque la diferencia entre ambos grupos no alcanzó la significación. A los 60 min de reperfusión, los niveles de GMPc en la gran vena coronárica fueron del $93 \pm 18\%$ del valor basal en el grupo que recibió L-arginina y del $64 \pm 19\%$ en el grupo control.

La diferencia arteriovenosa de GMPc (calculada como la diferencia entre los valores en sangre arterial y en seno coronario) fue indetectable basalmente, y mostró un ligero incremento inmediatamente después de la infusión de L-arginina (7 ± 3 pmol/mL inmediatamente antes de la oclusión coronaria vs 2 ± 4 pmol/mL en el grupo control, $p=n.s.$). Durante la reperfusión, la diferencia arteriovenosa en los niveles medidos de GMPc fue nula (**figura 23**).

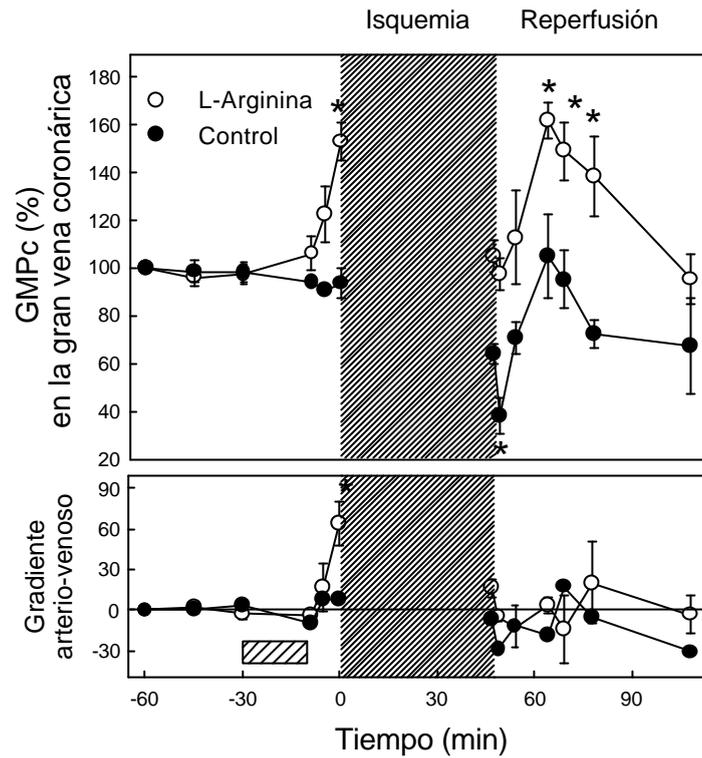


Figura 23. Representación de los niveles de GMPc en la gran vena coronárica (en % respecto al valor basal). En el panel inferior se representa la diferencia arterio-venosa de GMPc. La barra inferior del inicio representa el tiempo de infusión de la solución que contenía L-arginina o placebo. En el panel superior, (*) representa un valor significativo de p (<0.05) respecto a las determinaciones iniciales de GMPc.

2.7. Concentraciones miocárdicas de GMPc.

En los experimentos planificados para la determinación de GMPc miocárdico (n=7), se comprobó una reducción de la concentración de GMPc en el miocardio reperfundido (sometido a ischemia y reperfusión) respecto al miocardio de la zona control. La concentración de GMPc era consistentemente mayor en los animales que recibieron L-arginina, ya fuera en el área en riesgo como en la zona control (tabla 5).

Tratamiento	Zona del miocardio	
	Miocardio control	Área en riesgo
Control	19.8 ± 1.2	12.6 ± 3.2
L-arginina	28.1 ± 5.8	19.8 ± 1.2

Tabla 5. Contenido miocárdico de GMPc (pmol / mg de tejido). Los valores se expresan como media ± error estándar. Efectos en función de análisis de la varianza multifactorial: para la zona miocárdica (p=0.022); para el tratamiento (p=0.169).

2.8. *Area de miocardio en riesgo y tamaño de infarto.*

No hubo diferencias entre los dos grupos (L-arginina y control) en cuanto a la masa de miocardio en riesgo (18.1 ± 1.6 y 19.0 ± 2.1 g respectivamente, $p=0.76$). Sin embargo, la masa de miocardio necrosada (definida como el porcentaje de miocardio en riesgo que desarrolló necrosis, determinada por la reacción negativa al trifeniltetrazolium) fue significativamente inferior en los animales que recibieron L-arginina que en los del grupo control (figura 24).

<i>Tratamiento</i>	<i>Area en riesgo (g)</i>	<i>Area de necrosis (g)</i>	<i>Infarto (% de area en riesgo)</i>
L-arginina	24.4703	4.3261	17.67
Placebo	23.1201	14.3297	61.97
Placebo	32.1763	23.2108	72.0
L-arginina	29.3195	16.1108	54.94
Placebo	21.2262	16.7207	78.77
L-arginina	13.8593	11.3482	81.0
Placebo	8.5881	6.2325	72.57
L-arginina	15.8471	6.099474	38.48
L-arginina	18.1646	2.1665	11.92
Placebo	17.5653	4.5666	26.51
L-arginina	16.8477	11.9902	71.19
Placebo	14.9294	10.8711	72.81
L-arginina	18.5	11.83	63.92
Placebo	16.9791	8.6739	50.08
L-arginina	17.8524	13.4132	75.13
Placebo	21.9823	16.3946	77.03
Placebo	13.6162	4.384	32.19
L-arginina	17.4351	8.2747	47.46
Placebo	8.1202	4.031	49.64
Placebo	25.3311	14.5804	57.55
L-arginina	13.6908	7.8299	57.19

Tabla 6. 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.

2.9. *Actividad de mieloperoxidasa en tejido miocárdico.*

La actividad del enzima mieloperoxidasa en tejido miocárdico control (no sometido a isquemia y reperfusión) fue, en conjunto, de 0.46 ± 0.08 U/g. En el tejido reperfundido fue significativamente superior, sin diferencias entre ambos grupos de tratamiento ($p=0.8$, figura 25).

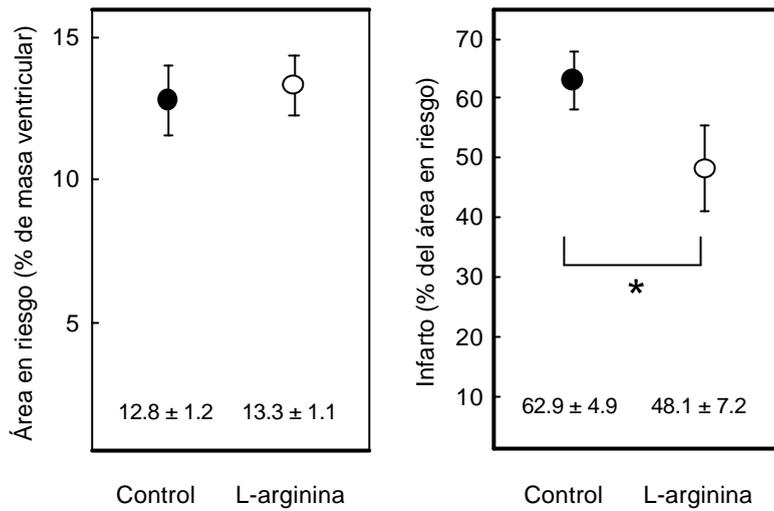


Figura 24. Representación del área de miocardio en riesgo y del tamaño de infarto para los dos grupos de tratamiento. (*=p<0.05).

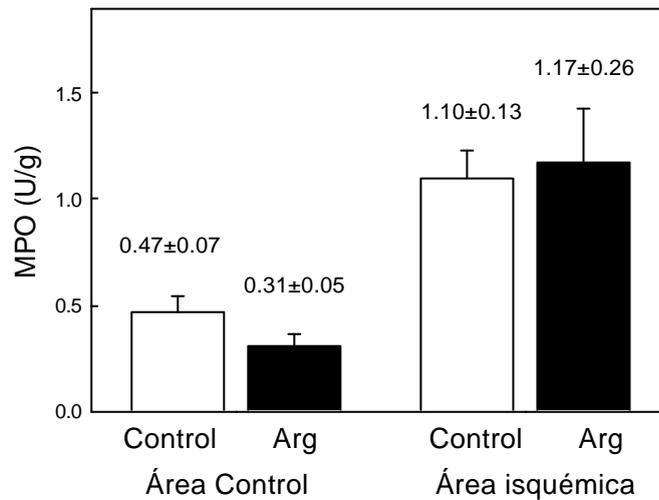


Figura 25. Representación de la actividad de mieloperoxidasa (MPO) en tejido miocárdico de zonas control y del área en riesgo (sometida a isquemia y reperfusión). Las columnas claras corresponden a los animales control, y las oscuras a aquellos animales que recibieron L-arginina.

2.10. Histología cuantitativa.

Los infartos presentaban, casi exclusivamente, necrosis en bandas de contracción. En los seis corazones en los que se realizó un estudio cuantitativo de la extensión de la necrosis

en bandas de contracción, se realizaron, como ya se ha comentado previamente, una media de 167 ± 16 microfotografías digitales de campos adyacentes (aumento x400) en cada extensión. Se objetivó que esta forma de necrosis incluía el $36 \pm 11\%$ del área examinada al microscopio óptico. La reacción negativa al trifeniltetrazolium, a su vez, abarcaba el $51 \pm 9\%$ del área examinada. La correlación entre las dos medidas fue buena ($r=0.82$, $p<0.05$).

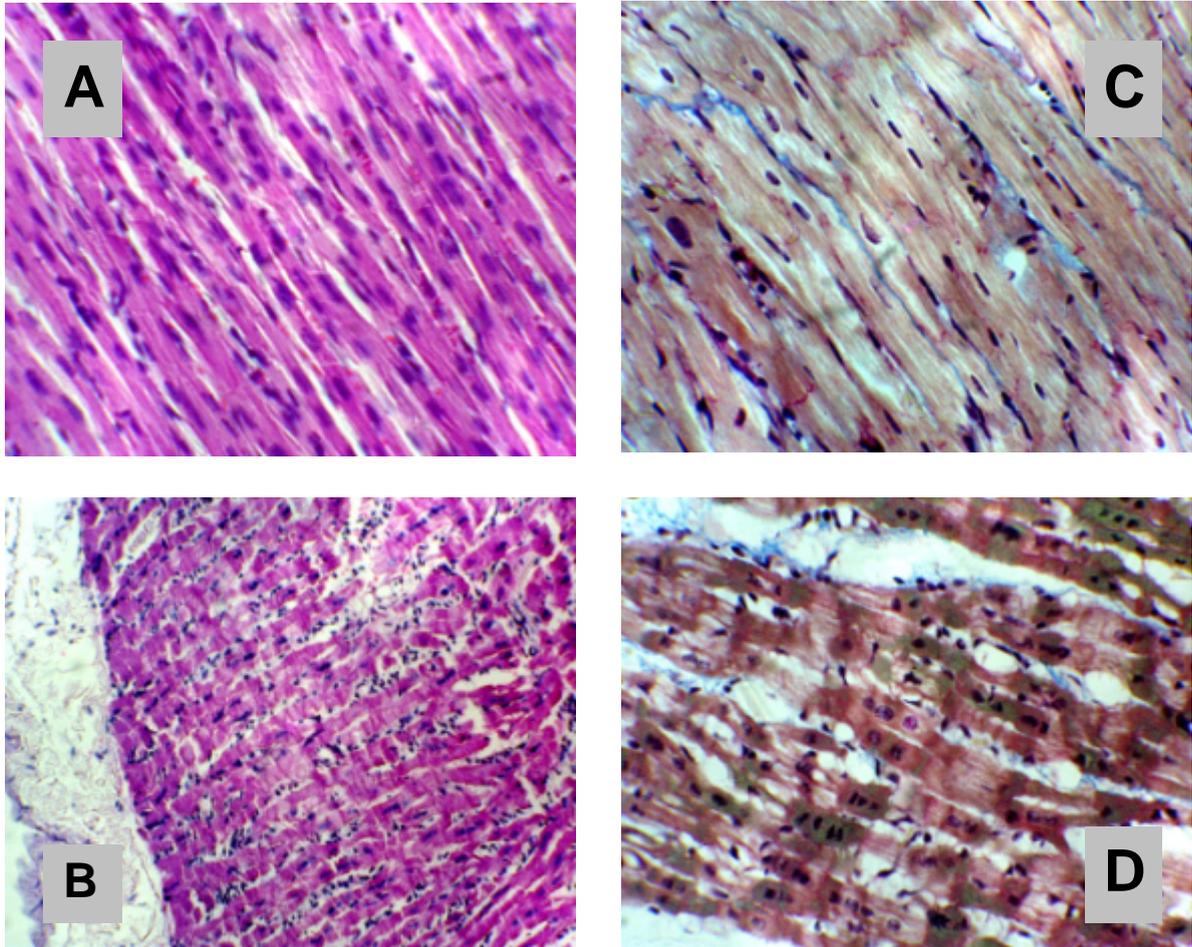


Figura 26. **A)** Miocardio reperfundido salvado (HE, x 400). **B)** Miocardio en el que se aprecia la estriación perpendicular a la longitud de las fibras -bandas de contracción- (HE, x200). **C)** Miocardio reperfundido y salvado (Tricrómico de Mason, x400). **D)** Imagen de miocardio reperfundido con bandas de contracción (Tricrómico de Mason, x400).

2.11. *Bioquímica y hematología.*

No hubo cambios significativos en los valores de hematocrito, recuento de plaquetas, glucosa, sodio, potasio o creatinina a lo largo del experimento, ni tampoco se documentaron diferencias entre los grupos de tratamiento (**tabla 7**).

Tabla 7

	Tratamiento	Basal	Final
Hematocrito (%)	L-arginina	22.4 ± 0.8	23.1 ± 1.0
	Placebo	23.7 ± 0.9	24.2 ± 0.9
Plaquetas (x1000/mm ³)	L-arginina	415.5 ± 24.9	399.3 ± 18.6
	Placebo	393.4 ± 18.7	380.9 ± 21.7
Creatinina (mg/dL)	L-arginina	1.2 ± 0.05	1.1 ± 0.05
	Placebo	1.2 ± 0.05	1.1 ± 0.05
Sodio Meq/L	L-arginina	139.4 ± 0.8	138.6 ± 1.0
	Placebo	139.6 ± 0.9	140.9 ± 1.6
Potasio Meq/L	L-arginina	3.5 ± 0.1	3.9 ± 0.2
	Placebo	3.5 ± 0.1	3.9 ± 0.1
Glucosa mg/dL	L-arginina	125.9 ± 9.5	113.5 ± 8.9
	Placebo	110.0 ± 8.3	112.8 ± 6.6
	Tratamiento	Basal	Final

Tabla 7. 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.

3. Resumen de los resultados.

Los principales resultados de este estudio son:

- La administración de L-arginina previa a la isquemia miocárdica, a dosis previamente utilizadas en pacientes, reduce la necrosis miocárdica secundaria a una oclusión coronaria transitoria, por mecanismos independientes del flujo coronario, de la presión aórtica o de la acumulación de polimorfonucleares en el miocardio reperfundido.

- El tratamiento con L-arginina no modificó los índices de progresión del daño isquémico, como son el tiempo de aparición de rigor o el pico de inestabilidad eléctrica.

- La administración de L-arginina se asoció, al estudiar la motilidad segmentaria del miocardio, con una menor reducción en los valores de la distancia telediastólica del área en riesgo en la reperfusión, indicativa de una menor tasa de hipercontractura.

- Finalmente, tras la isquemia y reperfusión miocárdica, se documentó depleción del contenido de GMPc en el miocardio reperfundido. Esta disminución, en valores absolutos, fue revertida en el grupo tratado con L-arginina.