

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata. La Plata, Argentina.

NÚCLEO DISCIPLINARIO/COMITÉ ACADÉMICO/OTROS TEMAS: Salud Pública.

TÍTULO DEL TRABAJO: **EFFECTO DEL SILDENAFIL EN EL REMODELAMIENTO VENTRICULAR IZQUIERDO POST- INFARTO AGUDO DE MIOCARDIO EN RATAS.**

AUTOR(ES): MR Piaggio, OA Pinilla, CD Garcarena, NG Pérez, EM Escudero, IL Ennis, HE Cingolani.

CORREOS ELECTRÓNICOS DE LOS AUTORES: mpiaggio@atlas.med.unlp.edu.ar; opinilla@atlas.med.unlp.edu.ar.

PALABRAS CLAVES: Hipertrofia, Remodelamiento, Infarto de Miocardio, PDE5A Inhibición, Sildenafil.

INTRODUCCIÓN

El concepto de remodelamiento ventricular fue introducido en 1985 por Pfeffer y col (1, 2) adjudicándolo a los cambios estructurales y funcionales del ventrículo izquierdo como resultado de la ligadura de una arteria coronaria en ratas. El remodelamiento post-infarto fue definido en 1990 (3) como los cambios en la morfología ventricular que ocurren tanto en el período agudo como en la etapa crónica después de un infarto de miocardio, identificándose a partir de ese momento como un objetivo principal a corregir para mejorar la supervivencia en esos casos. El concepto se ha extendido actualmente y se lo aplica a los cambios que se observan en el corazón en respuesta a sobrecargas de presión y/o de volumen secundarios a diferentes mecanismos de sobrecarga (2).

El remodelamiento secundario al infarto agudo está determinado por una serie de eventos adversos que ocurren progresivamente como la presencia de una zona infartada no contráctil y con posibilidades de expansión, la sobrecarga de volumen determinada por esa expansión y la sobrecarga de presión secundaria al aumento de volumen (4). Muchos de los eventos que ocurren en el remodelamiento miocárdico están regulados por estímulos extracelulares como el estiramiento mecánico, factores neurohormonales o citoquinas. Estos estímulos pueden causar la activación de diferentes vías de señalización intracelular que median cambios en el fenotipo de miocitos y fibroblastos.

Takimoto y col. han descrito recientemente (5) que la inhibición de la fosfodiesterasa-5A (PDE-5A) con sildenafil mejora el remodelamiento del ventrículo izquierdo en corazones sometidos a sobrecarga de presión lo cual deja abierta la posibilidad de analizar si esos hallazgos pueden ser extensivos al remodelamiento posterior al infarto agudo de miocardio.

En el presente estudio se analizó el efecto de la administración crónica de sildenafil sobre la estructura y función del ventrículo izquierdo en ratas normotensas con infarto agudo de miocardio.

MATERIAL Y MÉTODOS

—

Protocolo experimental: La investigación fue realizada teniendo en cuenta las recomendaciones publicadas en "Guide for the care and use of laboratory animals" (NIH publication N° 85-23, revised 1996). Se estudiaron 21 ratas Wistar macho de 3 a 4 meses de edad, con libre acceso al alimento y al agua; asignadas en forma aleatoria a uno de los siguientes grupos: 1: Control (C)(sin infarto y sin tratamiento n= 12); 2: Infarto (IM)(infarto sin tratamiento n= 5); 3: Infarto + sildenafil (IM +S)(infarto y tratamiento n= 4). Los animales en cada grupo fueron seguidos durante 6 semanas.

Producción del infarto: los animales fueron anestesiados con 50 mg/kg de pentobarbital sódico, luego intubados y ventilados con aire ambiente a presión positiva. Se efectuó

toracotomía izquierda a través del 4º espacio intercostal, retrayendo los pulmones para exponer al corazón en el campo quirúrgico. Después de abrir el pericardio se ligó la arteria descendente anterior con hilo de sutura 7.0 en su segmento proximal. La ligadura fue considerada adecuada cuando se observó la presencia de palidez en la pared anterior del ventrículo izquierdo. Los pulmones fueron insuflados aumentando la presión positiva al final de la espiración, cerrando la incisión por planos.

Administración de sildenafil: el grupo con tratamiento recibió una dosis de sildenafil de 100 mg/Kg/día a través del agua de bebida durante las 6 semanas posteriores al infarto. La solución de la droga fue preparada diariamente de acuerdo al registro de consumo de agua y del peso corporal, este último medido cada 2 días.

Estudios hemodinámicos: previo a la eutanasia, 13 ratas (4 controles, 4 infarto y 5 infarto + sildenafil) fueron anestesiadas con 35 mg/kg de pentobarbital intraperitoneal, para introducir por la arteria carótida derecha un catéter (Pebax 03) hasta el ventrículo izquierdo bajo monitoreo constante de la presión. De esta forma se obtuvieron los valores de presión intraventricular izquierda y su primera derivada.

Estudio ecocardiográfico: todos los animales fueron estudiados con ecocardiograma, bajo anestesia leve (35 mg/Kg de pentobarbital intraperitoneal), semanalmente hasta la sexta semana post-infarto. Para la obtención de las imágenes se repitió la metodología empleada en estudios previos realizados en nuestro laboratorio (6,7). Las mediciones para el análisis de la estructura y función del ventrículo izquierdo fueron efectuadas en 3 latidos consecutivos, de acuerdo a las recomendaciones de la American Society of Echocardiography (8). La masa ventricular izquierda fue calculada según Devereux y Reichek (9), y el índice de masa ventricular izquierda, fue obtenido a través del cociente entre la masa ventricular izquierda y el peso corporal del animal. El espesor parietal relativo, el porcentaje de acortamiento endocárdico y el estrés pico sistólico, fueron calculados de acuerdo a lo descrito en trabajos previos (6,7). Desde ventana apical se obtuvieron señales de doppler para analizar las velocidades en el tracto de salida del ventrículo izquierdo (flujo aórtico) y el tracto de entrada (flujo mitral), a partir de las cuales se obtuvo el índice de performance miocárdica (10) Los trazados fueron analizados off-line con un sistema de medición especial (Scion Image) por un observador independiente que no conocía el grupo de pertenencia de los animales estudiados.

Estudios histológicos: luego de los estudios hemodinámicos los animales fueron sacrificados; se extrajeron los corazones, los cuales fueron lavados con solución Ringer-Bicarbonato para extraer la sangre acumulada en las cavidades ventriculares y luego colocados en formol 10% por un tiempo mínimo de 7 días.

Los corazones fijados se cortaron de punta (corte A) a base (corte C). Los cortes de corazón fueron colocados en celdillas para procesamiento de muestras según las técnicas

convencionales de inclusión en parafina (Histoplast), se obtuvieron cortes de 5 μm que fueron teñidos con tricrómico de Masson (TdM) para realizar la evaluación del tamaño de infarto, hematoxilina/eosina (HE) para realizar la evaluación del diámetro de los miocitos y Sirius red (SR) para determinar la concentración de colágeno.

Determinación cuantitativa del tamaño de infarto: Los cortes teñidos con la técnica de TdM fueron digitalizados al 100% utilizando un scanner convencional (HP ScanJet 2400). Estas imágenes fueron analizadas con un software para el análisis de imágenes (ImagePro-Plus® 4.5) que permitió realizar mediciones sobre las mismas.

Se calculó el tamaño de infarto mediante la suma de la longitud epicárdica y endocárdica de la zona de infarto en todos los cortes, dividida por la suma de la longitud epicárdica y endocárdica total (infartada + no infartada) de cada corte. Los datos fueron multiplicados por 100, para expresar el valor en porcentaje.

Determinación de la hipertrofia de los miocitos:

Diámetro: se seleccionaron los cortes teñidos con HE de cada corazón, se evaluaron histológicamente los hallazgos histopatológicos, y utilizando un microscopio Olympus CX31 complementado con una cámara digital Olympus Camedia C-4000 zoom se tomaron imágenes de cada corte con aumento de 40X. En dichas regiones se evaluó el diámetro de los miocitos considerado como la longitud de una línea que pasando de un límite celular al otro opuesto pasa el núcleo en su zona medial. Los miocitos considerados debían poseer las siguientes características: 1- forma redondeada, 2- núcleo central y redondeado y 3- límite celular evidente.

Cuantificación del ARNm de BNP: Se realizó la determinación del ARNm del péptido natriurético cerebral (BNP) a partir de ARN total aislado de ventrículo izquierdo, utilizando la técnica de transcripción reversa (RT) y posterior cuantificación relativa mediante reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (real time RT-PCR). Se utilizó como estándar interno el ARNm de GAPDH.

Determinación cuantitativa de la concentración de colágeno: En cortes teñidos con la técnica de SR se evaluó la concentración de colágeno intersticial. Para ello se utilizó el analizador de imágenes digitales mencionado anteriormente, con un aumento de 40X.

Se analizó un total de 10 a 22 campos microscópicos por cada corte de tejido.

Los componentes del tejido cardíaco fueron identificados de acuerdo al color: las fibras de colágeno color rojo, los miocitos de color amarillo y el espacio intersticial de color blanco. El porcentaje de colágeno correspondiente a cada sector evaluado fue calculado, sumando todas las áreas correspondientes a colágeno, divididas por la suma de todas las áreas totales correspondientes a miocitos + áreas de tejido colágeno, multiplicados por 100, para expresar el valor como porcentaje.

Análisis estadístico Los datos de los parámetros cuantitativos fueron expresados a través de la media y su correspondiente error standard. Se utilizó el análisis de varianza y el test de Student-Newman-Keuls como post-test del anterior, para definir la existencia o no de diferencias entre las variables continuas analizadas en los diferentes grupos. Se utilizó un valor de $p < 0.05$ como límite para señalar la presencia de diferencias significativas entre los diferentes parámetros estudiados.

RESULTADOS

Estructura ventricular izquierda: la producción del infarto provocó un aumento del tamaño del ventrículo izquierdo en su diámetro diastólico que fue detectado por el estudio ecocardiográfico desde la primera semana del evento y en el diámetro sistólico a partir de la 3ª semana (figura 1). La administración de sildenafil disminuyó significativamente el diámetro sistólico hasta los valores de las ratas controles a las 5 semanas de tratamiento; no modificando el diámetro diastólico (figura 2). Como otra manifestación del remodelamiento las ratas con infarto mostraron un aumento del espesor de la pared posterior en relación al grupo control. El tratamiento con sildenafil provocó una reducción del espesor de la pared pero esa diferencia no alcanzó niveles de significación estadística. (IM 1.79 ± 0.10 mm, IM+S 1.59 ± 0.07 mm, C 1.45 ± 0.05 mm $p < 0.05$ entre IM vs C).

El infarto determinó el desarrollo de hipertrofia en relación al grupo control sin modificar el espesor relativo de la pared (h/r) (figura 3). Pese a no detectar una disminución de la hipertrofia con sildenafil, a través de la ecocardiografía. El análisis histopatológico del tejido distal al infarto reveló un aumento significativo del tamaño de los miocitos en el grupo con IM respecto del control (figura 4) y una reducción a valores normales en el grupo tratado, efecto que como mencionamos antes, no habíamos podido detectar por ecocardiografía. Por otro lado, el aumento del tamaño de los miocitos se acompañó de un incremento significativo del ARNm de BNP, otro indicador de hipertrofia, efecto que fue abolido por sildenafil (C: 100 ± 10.01 , IM: 166 ± 22.05 , IM+S: 75 ± 14.37 $p < 0.05$ IM vs C y IMS).

Los corazones post-IM también mostraron un aumento del porcentaje del colágeno intersticial en relación al grupo control (figura 5), lo cual fue parcialmente reducido con el tratamiento.

Por último, la administración de sildenafil no modificó significativamente el tamaño del infarto (Infarto: $40.24 \pm 9.9\%$ - Infarto + sildenafil $31 \pm 7\%$ ns).

Función ventricular izquierda: el porcentaje de acortamiento endocárdico disminuyó significativamente a las 5 semanas del infarto como se puede ver en la figura 6. Los resultados obtenidos al utilizar parámetros hemodinámicos invasivos son coincidentes, observándose una disminución del cociente entre la máxima velocidad de desarrollo de la

presión y el valor de presión a la que ésta ocurre ($dp/dt/P$) (figura 7). El bloqueo de la PDE-5A por sildenafil mejoró los parámetros señalados sugiriendo una mejoría de la función sistólica del ventrículo izquierdo deteriorada por la producción del infarto (figuras 6 y 7).

El índice de performance miocárdico, utilizado como parámetro de evaluación de la función cardíaca global, fue mayor en las ratas infartadas, efecto que fue parcialmente revertido por el tratamiento (figura 8).

El $-dp/dt$ (máxima velocidad de relajación), un indicador de la función diastólica, mostró valores más altos en las ratas infartadas con y sin tratamiento respecto a los controles, pero la diferencia no alcanzó a ser estadísticamente significativa.

DISCUSIÓN

Los resultados de nuestras observaciones demuestran que la producción de un infarto agudo de miocardio en corazones normales de rata, altera en forma progresiva la geometría y función del ventrículo izquierdo, trastorno definido como remodelamiento y detectable precozmente a través de los estudios ecocardiográficos. Si bien el tratamiento con sildenafil no modificó las características estructurales del ventrículo izquierdo, determinó una disminución del tamaño de los miocitos y una reducción de la fibrosis intersticial, mejorando a su vez la función sistólica del ventrículo izquierdo en ese tiempo de evaluación.

En el remodelamiento del ventrículo izquierdo posterior al infarto agudo de miocardio se combinan la pérdida de células contráctiles, su reemplazo por fibrosis reparativa en el área infartada, la sobrecarga de volumen producida por la expansión secundaria al infarto referido y la sobrecarga de presión determinada por el aumento del volumen (4). En nuestras observaciones y en coincidencia con lo señalado por otros autores (11,12) las ratas infartadas, mostraron un aumento del tamaño de la cavidad ventricular izquierda detectada a partir de la primera semana posterior al infarto como expresión de la sobrecarga de volumen. El espesor de la pared posterior del ventrículo izquierdo correspondiente a la zona no infartada, aumentó en respuesta a la sobrecarga de presión. La combinación del aumento del diámetro con el aumento del espesor parietal determinó el desarrollo de hipertrofia ventricular con conservación de la relación espesor/radio a diferencia de lo descrito para el remodelamiento encontrado en otro tipo de sobrecargas de presión como el que tiene lugar en las ratas espontáneamente hipertensas (6) (remodelamiento concéntrico, con aumento de la relación espesor/radio). Nuestros hallazgos sin embargo son coincidentes con los reportados por Litwin y col. (11) quienes mencionan como excéntrica a la hipertrofia secundaria a infarto en ratas. El aumento del espesor en la pared posterior del ventrículo izquierdo, se correspondió con un incremento en el tamaño de los miocitos en la misma zona. En coincidencia con lo señalado en la hipertrofia secundaria a hipertensión

arterial (13) se encontró un aumento del porcentaje de colágeno en el intersticio del miocardio de la región no infartada, como expresión de respuesta no compensadora a la sobrecarga de presión.

Si bien ha sido señalado que en las etapas tempranas del remodelamiento el aumento del diámetro de la cavidad podría resultar beneficioso al mantener el volumen latido dentro de límites normales a través del mecanismo de Frank-Starling (14), en nuestras observaciones se detectó una alteración de la función contráctil evidenciado por los índices hemodinámicos y ecocardiográficos utilizados para esa evaluación. Estas observaciones son coincidentes con lo referido por Litwin y col (11).

El aumento del valor del índice de performance miocárdica, en las ratas infartadas, es interpretado como indicador de compromiso de la función diastólica. La tendencia a la disminución de la máxima velocidad de caída de la presión intraventricular ($-dp/dt$) en los animales con infarto apoyaría lo señalado anteriormente.

El aumento de la fibrosis intersticial señalada en esos animales puede servir como sustento morfológico para explicar el compromiso de la función ventricular en el remodelamiento post-infarto.

Investigaciones recientes han mostrado que la inhibición de la PDE-5A es un mecanismo cardioprotector determinando la reducción del tamaño del infarto de miocardio (15), disminuyendo la injuria por isquemia / reperfusión (16), previniendo o regresando la hipertrofia y la insuficiencia cardíaca provocada por constricción aórtica (5). El tamaño del infarto en nuestras observaciones no varió significativamente en coincidencia con lo encontrado en conejos por Reffelmann y col. (17) Sin embargo es interesante analizar los efectos de la droga sobre el miocardio no infartado donde se pudo comprobar la reducción en el tamaño de los miocitos y de los valores relativos de ARNm de BNP utilizado con marcador de hipertrofia. Si bien no se detectó una regresión de la hipertrofia por ecocardiografía, sí fue evidente la mejoría de la función sistólica global en las ratas en tratamiento con sildenafil. Esta mejoría de la función contráctil podría responder al efecto inhibitorio de la droga sobre el canal rectificador de potasio que aumentaría la duración del potencial de acción y por consecuencia el transitorio de calcio (18) o a la inhibición de la fosfodiesterasa 3 secundaria a un moderado aumento del cGMP con el consiguiente aumento del cAMP (19). La falta de modificación en los valores del índice de performance miocárdica en las ratas en tratamiento con sildenafil, en coincidencia con los valores similares encontrados en el $-dp/dt$ en las ratas infartadas con y sin tratamiento, sugieren que el efecto de la droga no fue suficiente para mejorar la función diastólica, a pesar de la reducción del colágeno intersticial.

CONCLUSIÓN

La inhibición de la PDE-5A con sildenafil en este modelo in-vivo de infarto agudo de miocardio en ratas, mejoró la función sistólica ventricular izquierda, disminuyó el tamaño de los miocitos en la zona no infartada así como los niveles de ARNm de BNP y la fibrosis intersticial. El tratamiento sin embargo no modificó la función diastólica ni las características morfológicas del ventrículo izquierdo. Considerando los conceptos de Pfeffer y col (1,2) podemos inferir que la administración del sildenafil inmediatamente producido el infarto revirtió parcialmente el remodelamiento al mejorar la función sistólica y disminuir la hipertrofia, a pesar de no modificar la geometría ventricular.

BIBLIOGRAFÍA

1. Pfeffer JM, Pfeffer MA, Braunwald E. Influence of chronic captopril therapy on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985; 57: 84–95.
2. Opie L. *Heart physiology*. Philadelphia, PA, USA: Lippincott Williams and Wilkins, 2004.
3. Pfeffer MA, Braunwald E. Ventricular remodeling after myocardial infarction. Experimental observations and clinical implications. *Circulation* 1990; 81: 1161–72.
4. Opie LH, Comerfort PJ, Gersh BJ, and Pfeffer MA. Controversies in ventricular remodelling. *Lancet* 2006;367:356-367.
5. Takimoto E, Champion HC, Li M, Belardi D, Ren S, Rodriguez ER, Bedja D, Gabrielson KL, Wang Y, [Kass DA](#). Chronic inhibition of cyclic GMP phosphodiesterase 5A prevents and reverses cardiac hypertrophy. *Nat Med*. 2005;11:214-222.
6. Escudero EM, Camilión de Hurtado MC, Pérez NG, Tufare AL. Echocardiographic assessment of left ventricular midwall mechanics in spontaneously hypertensive rats. *Eur J Echocardiography* 2004;5:169-75.
7. Escudero EM, Tufare AI, Ennis IL, Garcarena CD, Pinilla OA, Carranza VB. Análisis ecocardiográfico del efecto de diferentes inhibidores del intercambiador Na^+/H^+ sobre la estructura y función sistólica del ventrículo izquierdo en ratas espontáneamente hipertensas. *Medicina* 2006;5:392-398.
8. Lang RM, Bierig M, Devereux RB, Flachskampf FA, Foster E, Pellikka PA, Picard MH, Roman MJ, Seward J, Shanewise JS, Solomon SD, Spencer KT, Sutton MS, Stewart WJ. Recommendations for chamber quantification: a report from the American Society of Echocardiography's Guidelines and Standards Committee and the Chamber Quantification Writing Group, developed in conjunction with the European Association of Echocardiography, a branch of the European Society of Cardiology. *J Am Soc Echocardiogr*. 2005;12:1440-1463.
9. Devereux RB, Reichek N. Echocardiographic determinations of left ventricular mass in man: anatomic validation of the method. *Circulation* 1977;55:613-18
10. Tei C. New non-invasive index for combined systolic and diastolic ventricular function. *J Cardiol* 1995;26:135-6.
11. Litwin SE, Katz SE, Morgan JP and Douglas PS. Serial echocardiographic assessment of left ventricular geometry and function after large myocardial infarction in the rat. *Circulation*, 1994;89:345-354.
12. Liu YH, Yang X-P, Nass O, Sabbah HN, Peterson E, and Carretero OA. Chronic heart failure induced by coronary artery ligation in Lewis inbred rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1997;272:H722-H727.

13. Cingolani HE, Rebolledo OR, Portiansky EL, Pérez NG, Camilión de Hurtado MC. Regression of hypertensive myocardial fibrosis by Na^+/H^+ exchange inhibition. *Hypertension* 2003;41:373-77.
14. McKay RG, Pfeffer MA, Pasternak RC, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: a corollary to infarct expansion. *Circulation* 1986;74:693-702.
15. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil (Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial KATP channels in rabbits. *Am J Physiol* 2002;283:H1263-1269.
16. Bremer YA; Salloum F; Ockaili R; Chou E; Moskowitz William B.; Kukreja Rakesh C. Sildenafil citrate(Viagra) induces cardioprotective effects after ischemia/reperfusion injury in infant rabbits. *Pediatr Res* 2005;57:22-27.
17. Reffelmann T, Kloner RA. Effects of sildenafil on myocardial infarct size, microvascular function, and acute ischemic left ventricular dilation. *Cardiovasc Res.* 2003;59:441-449.
18. Geelen P, Benoit D, Rail J, et al. Sildenafil (Viagra) prolongs cardiac repolarization by blocking the rapid component of the delayed rectifier potassium current. *Circulation.* 2000;102:275-277.
19. Vila-Petroff MG, Younes A, Egan J, Lakatta EG, Sollott SJ. Activation of distinct cAMP-dependent and cGMP-dependent pathways by nitric oxide in cardiac myocytes. *Circ Res* 1999;84:1020-1031.

Legendas para figuras

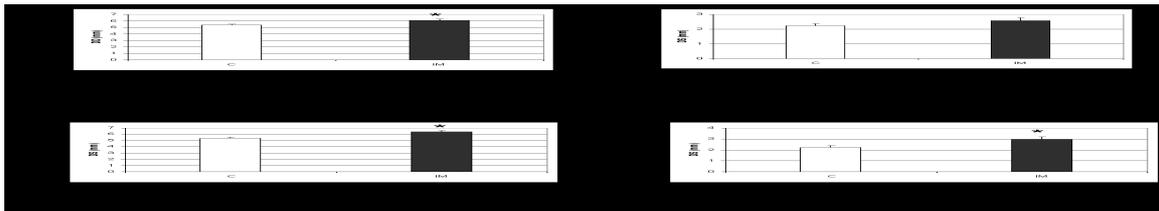


Figura 1: Diámetros diastólico y sistólico del VI a la semana del infarto (A) y a las 3 semanas del mismo respectivamente (B). IM: Infarto de miocardio, C: control. * $p < 0.05$.

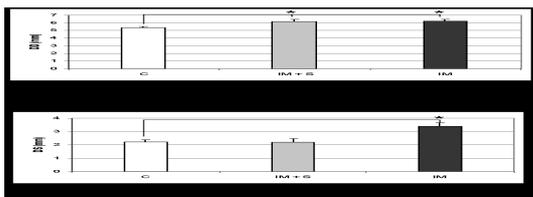


Figura 2: Diámetros diastólico y sistólico del VI a 5 semanas post-infarto. IM: Infarto de miocardio, C: control, IM + S: infartadas tratadas con sildenafil. * $p < 0.05$.

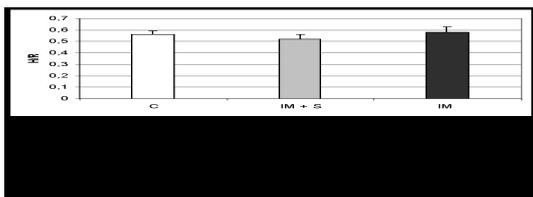


Figura 3: Espesor parietal relativo (h/r) de los corazones de ratas infartadas

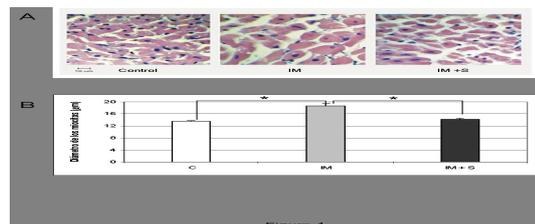


Figura 4: Panel A cortes histológicos originales mostrando el área de sección transversal de los miocitos de los tres grupos estudiados. Panel B Promedio de los diámetros de los miocitos. IM: infarto de miocárdio, IM+S: infarto de miocárdio tratadas con Sildenafil, C: control. * $p < 0.05$

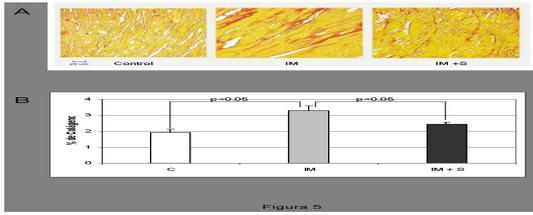


Figura 5: Panel A cortes histológicos originales teñidos con la técnica de Sirius Red para evaluar la concentración de colágeno intersticial distal a la zona de infarto, (fibras de colágeno en color rojo, los miocitos de color amarillo y el espacio intersticial de color blanco). Panel B porcentaje promedio de colágeno encontrado en el miocardio de los diferentes grupos analizados. C: control, IM+S: infarto de miocardio tratadas con Sildenafil, IM: infarto de miocardio.

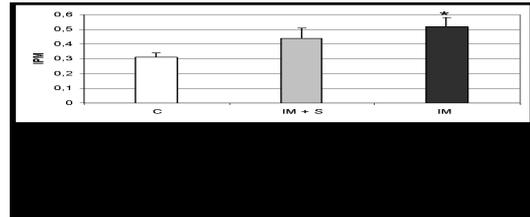


Figura 8: Índice de performance miocárdica de las ratas infartadas (IM), infartadas tratadas con sildenafil (IM+S) y de las controles (C). * $p < 0.05$, entre IM y C.

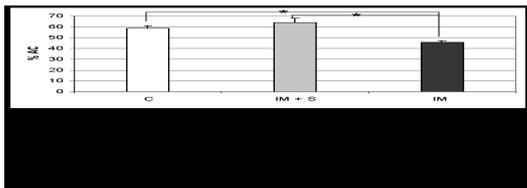


Figura 6: Porcentaje de acortamiento endocárdico utilizado como parámetro de función sistólica del ventrículo izquierdo. C: control, IM+S: infarto de miocardio tratadas con Sildenafil, IM: infarto de miocardio. * $p < 0.05$.

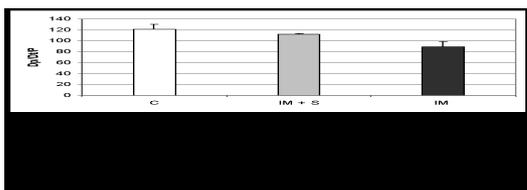


Figura 7: Relación máxima velocidad de desarrollo de la presión / valor de la presión a la cual ocurre (dp/dt/P) en los tres grupos experimentales. * $p < 0.05$.