

Daño por isquemia-reperfusión durante el trasplante cardíaco experimental. Evaluación del papel citoprotector de la trimetazidina

Evaristo Castedo^a, Javier Segovia^a, Cristina Escudero^c, Begoña Olmedilla^d, Fernando Granado^d, Carmen Blas^e, José M. Guardiola^e, Isabel Millán^f, Luis A. Pulpón^b y Juan Ugarte^a

^aServicio de Cirugía Cardiovascular. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^bServicio de Cardiología. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^cServicio de Cirugía Experimental. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^dServicio de Nutrición. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^eServicio de Bioquímica. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

^fServicio de Bioestadística. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. España.

Introducción y objetivos. El objetivo de este trabajo fue analizar el daño por isquemia-reperfusión mediado por radicales libres que se produce durante el trasplante cardíaco y evaluar el posible efecto citoprotector de la trimetazidina (TMZ).

Material y método. Se realizaron 21 trasplantes cardíacos ortotópicos en cerdos. Dividimos los experimentos en 2 grupos: A (n = 11), en el que se realizó una protección miocárdica estándar, y B (n = 10), en el que se administró TMZ en la cardioplejía empleada para parar el corazón donante (TMZ, 10⁻⁵ mol/l), como pretratamiento intravenoso del receptor (TMZ, 2,5 mg/kg) y como parte de la cardioplejía infundida en el receptor antes de despinzar la aorta (TMZ, 10⁻⁵ mol/l). Se tomaron muestras de sangre del seno coronario del receptor en 3 momentos: basal, isquemia y reperfusión. Se determinó la concentración de malondialdehído como marcador de peroxidación lipídica y de varios antioxidantes: glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa, α -tocoferol, retinol y estado de antioxidantes totales.

Resultados. Durante la isquemia-reperfusión aumentó la producción de malondialdehído y la actividad de los antioxidantes enzimáticos, mientras que el retinol disminuyó. El incremento de malondialdehído y de la actividad de la glutatión peroxidasa entre el momento basal y la reperfusión fue significativamente mayor en el grupo A.

Conclusiones. Durante el trasplante se incrementó progresivamente el nivel de peroxidación lipídica y se activaron los sistemas antioxidantes intracelulares. La TMZ ejerció un efecto citoprotector y limitó el daño por isquemia-reperfusión generado por los radicales libres, además de modificar el patrón de reacción de parte de los sistemas de defensa.

Palabras clave: *Trasplante. Daño por reperfusión. Radicales libres. Trimetazidina.*

VÉASE EDITORIAL EN PÁGS. 895-7

Correspondencia: Dr. E. Castedo.
Departamento de Cirugía Cardiovascular. Clínica Puerta de Hierro.
San Martín de Porres, 4. 28035 Madrid. España.
Correo electrónico: evaristocm@terra.es

Recibido el 23 de diciembre de 2004.
Aceptado para su publicación el 7 de abril de 2005.

Ischemia-Reperfusion Injury During Experimental Heart Transplantation. Evaluation of Trimetazidine's Cytoprotective Effect

Introduction and objectives. The objectives of this study were to analyze the ischemia-reperfusion injury due to free radicals that occurs during heart transplantation and to determine the potential cytoprotective effect of trimetazidine.

Material and method. A total of 21 orthotopic heart transplantations were performed in pigs. We divided the experimental animals into 2 groups: in group A (n=11), standard myocardial protection was used; in group B (n=10), trimetazidine was added to the cardioplegic solution used to protect the donor heart and to the solution administered to the recipient prior to release of the aortic clamp (trimetazidine, 10⁻⁵ mol/L), and recipients were pre-treated with trimetazidine, 2.5 mg/kg. Blood samples were taken from the recipient's coronary sinus at three times: at baseline, during ischemia, and during reperfusion. We measured the levels of malondialdehyde, a marker of lipid peroxidation, and of several antioxidants: glutathione peroxidase, glutathione reductase, superoxide dismutase, α -tocopherol, and retinol. The total antioxidant status was also determined.

Results. Malondialdehyde production and enzymatic antioxidant activity rose during ischemia and reperfusion, while the retinol level decreased. The increases in malondialdehyde level and glutathione peroxidase activity that occurred between baseline and reperfusion were significantly higher in group A.

Conclusions. The degree of lipid peroxidation and the level of activity of intracellular antioxidant mechanisms increased progressively throughout transplantation. Trimetazidine had a cytoprotective effect. It ameliorated free radical-induced reperfusion injury and modified the response pattern of several defense mechanisms.

Key words: *Transplantation. Reperfusion injury. Free radicals. Trimetazidine.*

Full English text available at: www.revespcardiol.org

ABREVIATURAS

TC: trasplante cardíaco.
 DIR: daño por isquemia-reperfusión.
 MDA: malondialdehído.
 ROS: radicales libres derivados del oxígeno.
 TMZ: trimetazidina.

INTRODUCCIÓN

El trasplante cardíaco (TC) ha revolucionado la historia natural de los pacientes con insuficiencia cardíaca terminal y ha posibilitado una supervivencia del 54% a los 10 años¹. No obstante, es un procedimiento no exento de complicaciones que condicionan una importante tasa de mortalidad. Mientras que la supervivencia a largo plazo y la calidad de vida de los pacientes trasplantados ha mejorado significativamente debido al avance en la inmunodepresión y al mejor manejo de donantes y receptores, sin embargo, la técnica quirúrgica, la estrategia de protección miocárdica y la tasa de mortalidad operatoria y hospitalaria no han cambiado de forma sustancial en los últimos 25 años. En España, un 24% de los pacientes trasplantados fallece en el primer año postrasplante y, de éstos, un 50% lo hace en el primer mes¹. La causa más frecuente de mortalidad en el período hospitalario es el fallo primario del injerto, síndrome que se asocia con multitud de variables clínicas² pero cuyos mecanismos fisiopatológicos permanecen sin aclarar.

Aunque se están aplicando modificaciones quirúrgicas a la técnica clásica, como la técnica bicava o el trasplante total, no parece que, aparte de disminuir el grado de insuficiencia de las válvulas auriculoventriculares y la incidencia de arritmias auriculares, estas técnicas reduzcan la incidencia de fallo primario del injerto y la mortalidad precoz postrasplante³. Otra posibilidad abierta a la investigación es tratar de optimizar la técnica de preservación miocárdica con el fin de atenuar el daño por isquemia-reperfusión (DIR) mediado por radicales libres derivados del oxígeno (ROS), que se sabe que está involucrado en la aparición del fallo primario del injerto⁴⁻¹¹. En el ámbito experimental, se ha observado que el empleo de antioxidantes disminuye el daño producido por ROS y mejora la función y la supervivencia del injerto^{4-6,8-11}. No obstante, hasta el momento, ninguno de esos agentes ha generado beneficio clínico alguno en el TC humano.

La trimetazidina (TMZ) ha demostrado experimentalmente tener un efecto citoprotector basado en la disminución de la producción de ROS y el daño inducido por éstos, lo cual confiere a las células mayor resistencia frente a la hipoxia y capacidad de recuperación funcional en la reperfusión¹²⁻¹⁶. Clínicamente, se ha

observado que limita el DIR en el corazón tras un infarto agudo de miocardio en combinación con terapia convencional¹⁷, angioplastia primaria¹⁸ o trombólisis¹⁹, así como tras cirugía de revascularización coronaria^{20,21}. En modelos experimentales de trasplante renal^{8,9} y pulmonar¹⁰, la inclusión de TMZ en la cardioplejía o su administración en el receptor se ha asociado con un menor nivel de citotoxicidad inducido por ROS y con una mejor función del injerto postoperatoria. El objetivo del presente trabajo es evaluar si la TMZ ejerce alguna acción citoprotectora frente al DIR en el TC.

MATERIAL Y MÉTODO

Población de estudio y definición de grupos

Para la realización de este estudio empleamos 42 cerdos hembra de 2 meses de edad, cruce de las razas *Landrace x Large-White*, con un peso comprendido entre 18 y 25 kg. Los animales fueron suministrados por una granja industrial en la que eran criados para el consumo humano y donde fueron vacunados contra las enfermedades de Aujeszky y parvovirus porcina, así como desparasitados con oxibendazol contra vermes redondos. Al llegar a nuestro hospital fueron estabulados, observados durante una semana y alimentados *ad libitum* con harina de cebada (Lanzadera 90 Plus. Purina). En 21 animales realizamos un TC ortotópico y empleamos a los otros 21 como donantes. Dividimos los experimentos en 2 grupos y asignamos a los animales aleatoriamente a uno u otro grupo:

– Grupo A: constituido por 11 TC que se realizaron de manera similar a como se efectúan en humanos en nuestro hospital, tanto en lo que se refiere a técnica quirúrgica como a la estrategia de protección miocárdica. Para parar el corazón donante antes de su extracción empleamos 1l de cardioplejía con una elevada concentración de potasio. Una vez suturado el injerto y antes de despinzar la aorta, se infundió de forma anterógrada por la raíz aórtica una solución de 250 ml de suero fisiológico.

– Grupo B: constituido por los 10 TC restantes, en los que empleamos una estrategia de protección miocárdica diferente basada en la utilización de TMZ. Dicho fármaco fue administrado, tanto en el donante como en el receptor, de la siguiente forma:

1. En el *donante*, añadiéndolo al litro de cardioplejía que empleamos para parar el corazón antes de su extracción (TMZ, 10^{-5} mol/l).
2. En el *receptor*, como pretratamiento intravenoso 10 min antes de pinzar la aorta (TMZ, 2,5 mg/kg).
3. En el *receptor*, añadiéndolo a los 250 ml de suero fisiológico que se infundieron de forma anterógrada por la raíz aórtica una vez que el injerto fue suturado e

inmediatamente antes de despinzar la aorta (TMZ, 10^{-5} mol/l).

Técnica anestésica y quirúrgica

Todos los cerdos recibieron un trato de acuerdo con las recomendaciones sobre investigación con animales de laboratorio de la Sociedad Americana de Fisiología. El día del estudio fueron premedicados por vía intramuscular con ketamina (20 mg/kg), diazepam (1 mg/kg) y atropina (0,04 mg/kg). La inducción anestésica se realizó con isoflurano al 5% vaporizado en oxígeno a 2 l/min y el mantenimiento con una infusión continua de fentanilo (10 μ g/kg/h) y pancuronio (0,2 mg/kg/h), e isoflurano al 1-1,5% vaporizado en oxígeno a 2 l/min.

La cardiectomía en el donante se realizó de forma similar al TC humano, tras parar el corazón con cardioplejía cristaloides a 4 °C introducida a través de la raíz aórtica e irrigar el saco pericárdico con suero salino fisiológico a 4 °C. El almacenamiento del corazón hasta el implante se realizó en una bolsa con suero salino fisiológico a 4 °C, que a su vez fue depositada en hielo para mantener el órgano a una temperatura entre 5 y 8 °C. El implante en el receptor se llevó a cabo mediante la técnica clásica. Previamente se anticoaguló al animal con heparina sódica (3 mg/kg) y se instauró la circulación extracorpórea con hipotermia a 28 °C. Como máquina corazón-pulmón se empleó una Stöckert modelo 10-00-00 (Stöckert Instrumente GmbH, München, Alemania), a la que se conectaron un reservorio de cardiectomía, un oxigenador de fibra hueca de polipropileno de bajo cebado con intercambiador de calor SPIRALOXY™ Bentley® y un reservorio venoso BMR 1900 Bentley (Baxter Healthcare Corporation, Bentley Division, Irvine, CA 92714, Estados Unidos).

Variables estudiadas y toma de muestras

Las variables analizadas se reflejan en la tabla 1. Para realizar las determinaciones analíticas se tomaron muestras de sangre del seno coronario del animal receptor en tres momentos:

1. Momento basal: antes de la heparinización y de comenzar la circulación extracorpórea.
2. En el momento de máxima isquemia fría: una vez suturado el injerto, justo antes de despinzar la aorta.
3. A los 30 min de reperfusión.

Determinación de productos derivados de la peroxidación lipídica

La peroxidación lipídica inducida por ROS es un mecanismo bien establecido de daño celular que da lugar a la desintegración de los ácidos grasos poliinsaturados de la membrana citoplasmática en peróxidos lipídicos y aldehídos, como el malondialdehído (MDA). La determi-

TABLA 1. Variables analizadas

<i>Variables intraoperatorias:</i> tiempo de isquemia, tiempo de circulación extracorpórea, necesidad de fármacos inotrópicos
<i>Marcadores de necrosis celular:</i> creatinincinasa, lactato deshidrogenasa
<i>Productos de la peroxidación lipídica:</i> malondialdehído
<i>Antioxidantes enzimáticos:</i> glutatión peroxidasa, glutatión reductasa, superóxido dismutasa
<i>Antioxidantes no enzimáticos:</i> vitamina A (retinol), vitamina E (α -tocoferol)
<i>Otros antioxidantes:</i> estado de antioxidantes totales

nación en sangre o en tejido de estos aldehídos reactivos es un índice adecuado de peroxidación lipídica y, por tanto, una medida indirecta del nivel de ROS. En el presente estudio se determinó la concentración de MDA en suero. El análisis se llevó a cabo por el método colorimétrico Bioxytech® LPO-586 (Oxis International S.A., Francia), empleando un espectrofotómetro Philips (modelo PU8620, Cambridge, Inglaterra).

Determinación de glutatión peroxidasa y glutatión reductasa

La glutatión peroxidasa inhibe la formación de ROS *de novo* mediante la neutralización de peróxidos que reaccionan con metales de transición para dar lugar a ROS. Esta enzima cataliza la oxidación del glutatión por el hidroperóxido de ácido graso. La glutatión reductasa tiene una acción complementaria catalizando la reducción del glutatión oxidado, con lo que se recupera el sustrato de la glutatión peroxidasa. Para su determinación se empleó un método espectrofotométrico utilizando los kit Ransel Glutathione Peroxidase® y Glutathione Reductase® Cat. n.º GR2368 (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Coumlin, Reino Unido) automatizados en analizador Hitachi 717 de Boeringer-Mannheim.

Determinación de superóxido dismutasa

La función antioxidante de esta enzima se basa en catalizar la dismutación de los ROS superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno molecular (reacción dismutasa). Se determinó la concentración de superóxido dismutasa en sangre periférica mediante espectrofotometría, para lo que se empleó el *kit* Ransod® Superoxide dismutase Cat. N.º SD 125 (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Coumlin, Reino Unido) automatizado en el analizador Hitachi 717 de Boeringer-Mannheim.

Determinación de vitaminas

El mecanismo de acción antioxidante de la vitamina E es doble: neutraliza los radicales peróxido lipídicos

dando lugar a la formación de radical tocoferoxilo, compuesto relativamente estable que no es capaz de iniciar la cadena de peroxidación lipídica por sí mismo, y reduce el infiltrado por leucocitos polimorfonucleares y el daño tisular derivado de éste a través de la inhibición de la expresión de P-selectina y la molécula de adhesión intercelular-1 en la superficie endotelial. La vitamina A tiene un efecto antioxidante *in vivo* e *in vitro* basado en su capacidad para disminuir el grado de peroxidación lipídica provocado por ROS y potenciar la resistencia de las membranas celulares al daño oxidativo. Mediante cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa se determinó la concentración de vitamina A (retinol) y vitamina E (α -tocoferol) en el suero.

Determinación del estado de antioxidantes totales

El «estado de antioxidantes totales» es un parámetro que refleja de forma global el potencial antioxidante de una determinada solución. Es poco específico, ya que no distingue entre antioxidantes enzimáticos y «no enzimáticos». Para su determinación en el plasma se empleó un método espectrofotométrico utilizando el kit Total Antioxidant Status® Cat. n.º Nx 2331 (Randox Laboratories Ltd., Ardmore, Diamond Road, Coumlin, Reino Unido) automatizado en analizador Hitachi 717 de Boeringer-Mannheim.

Análisis estadístico

El diseño del estudio fue el de un ensayo clínico en el que figuraron dos grupos de animales, uno tratado

con TMZ y otro no. El objetivo fue la comparación entre los grupos de una serie de variables cuantitativas durante su evolución en los tiempos basal, de isquemia y de reperfusión. Además, se analizó la evolución de las variables en los 3 momentos dentro de cada grupo. La hipótesis de normalidad de las distribuciones se evaluó mediante el test de Shapiro-Wilk. El análisis estadístico se realizó con un análisis de varianza de medidas repetidas con dos factores, uno intrasujeto (tiempo) y otro intersujeto (tratamiento), y del efecto de la interacción entre ambos. Dentro de cada grupo se realizó el test de comparaciones múltiples de Tukey. Se valoraron los niveles de significación $< 0,05$ con contraste bilateral. Los datos fueron tratados mediante el programa estadístico SPSS versión 10.0.7 para Windows (SPSS Inc, Chicago, Ill, Estados Unidos).

RESULTADOS

En todos los casos fue posible la desconexión del corazón trasplantado de la máquina de corazón-pulmón, de forma que las medidas correspondientes a la reperfusión se tomaron fuera de circulación extracorpórea. La tolerancia a la TMZ fue excelente y no se registró ningún caso de hipotensión arterial ni se observaron alteraciones significativas de la frecuencia cardíaca durante la administración intravenosa. El tiempo de isquemia del órgano y de derivación cardiopulmonar fue similar en ambos grupos (149 ± 24 min en grupo A frente a 157 ± 14 min en grupo B y 100 ± 15 min en grupo A frente a 105 ± 14 min en grupo B, respectivamente; $p = \text{NS}$). En 12 casos fue necesario el uso de inotrópicos durante la reperfusión para salir de

TABLA 2. Resultado de las determinaciones analíticas en los 3 momentos del trasplante

Variable	Grupo	Basal	Isquemia	Reperfusión
Creatincinasa (U/l)	A	747,3 \pm 308,5	1.238,2 \pm 732,1 ^a	2.297,3 \pm 935,8 ^b
	B	1.238,1 \pm 1.109,1	1.388,9 \pm 907,8 ^a	2.365,8 \pm 777,3 ^b
Lactato deshidrogenasa (U/l)	A	602,3 \pm 133,7	781,2 \pm 346,6 ^a	1.104,8 \pm 311,5 ^b
	B	712,4 \pm 126,9	872,8 \pm 235,8 ^a	1.162,6 \pm 196,0 ^b
Malondialdehído ($\mu\text{mol/l}$)	A	3,61 \pm 1,04	7,93 \pm 2,52 ^a	9,69 \pm 3,36 ^b
	B	3,22 \pm 1,45	6,18 \pm 1,69 ^a	7,01 \pm 1,86 ^b
Glutación peroxidasa (U/g hemoglobina)	A	287,4 \pm 71,9	335,5 \pm 90,6 ^a	378,5 \pm 86,3 ^b
	B	398,1 \pm 117,9	419,8 \pm 92,3 ^a	442,2 \pm 123,6 ^b
Glutación reductasa (U/l)	A	74,9 \pm 12,2	125,7 \pm 45,4 ^a	130,7 \pm 38,9 ^a
	B	85,3 \pm 11,9	111,4 \pm 37,4 ^a	118,3 \pm 36,6 ^a
Superóxido dismutasa (U/g hemoglobina)	A	706,8 \pm 227,9	796,8 \pm 215,1 ^a	917,6 \pm 349,2 ^b
	B	983,4 \pm 272,8	1.106,0 \pm 249,3 ^a	1.227,3 \pm 322,5 ^b
α -tocoferol ($\mu\text{g/dl}$)	A	135,7 \pm 35,6	140,8 \pm 39,6	135,5 \pm 37,6
	B	136,9 \pm 34,8	123,4 \pm 41,6	129,7 \pm 34,9
Retinol ($\mu\text{g/dl}$)	A	24,2 \pm 7,7	20,2 \pm 8,2 ^a	19,2 \pm 7,5 ^a
	B	22,8 \pm 4,1	16,9 \pm 3,3 ^a	17,7 \pm 2,7 ^a
Estado de antioxidantes totales (mmol/l)	A	0,60 \pm 0,07	1,08 \pm 0,41 ^a	1,16 \pm 0,38 ^a
	B	0,71 \pm 0,18	1,10 \pm 0,50 ^a	1,09 \pm 0,45 ^a

^aDiferencia estadísticamente significativa con respecto al valor basal. ^bDiferencia estadísticamente significativa con respecto al valor basal y al valor en isquemia. Las variables se presentan como media \pm desviación estándar.

circulación extracorpórea: 6 en el grupo A y 7 en el B ($p = \text{NS}$). Los datos analíticos se reflejan en la tabla 2.

Necrosis celular

La creatincinasa y la lactato deshidrogenasa aumentaron significativamente entre el momento basal y la isquemia, y entre la isquemia y la reperfusión ($p < 0,001$). No hubo diferencia entre los grupos ni tampoco efecto de interacción, ya que los grupos se comportaron de forma similar.

Peroxidación lipídica

La producción de MDA se incrementó significativamente en los 2 grupos entre el momento basal y la isquemia, así como entre la isquemia y la reperfusión ($p < 0,001$). No obstante, el aumento en la isquemia-reperfusión con respecto al valor basal fue mayor en el grupo A (efecto interacción; $p < 0,05$) (fig. 1A). El incremento de MDA entre el momento basal y la reperfusión fue menor en el grupo B ($6,08 \pm 2,75$ frente a $3,79 \pm 1,73$; $p = 0,03$), y lo mismo sucedió cuando comparamos el incremento entre la situación basal y la isquemia ($4,32 \pm 1,81$ frente a $2,97 \pm 0,94$; $p = 0,04$) (fig. 2A y B). En el intervalo entre la isquemia y la reperfusión, si bien el incremento en el grado de peroxidación lipídica fue mayor en el grupo A, la diferencia no llegó a ser significativa ($1,76 \pm 1,28$ frente a $0,83 \pm 1,27$; $p = 0,11$).

Antioxidantes enzimáticos

La actividad de la glutatión peroxidasa aumentó en los 2 grupos de forma significativa durante el procedimiento, del momento basal a la isquemia y de ésta a la reperfusión ($p < 0,001$). Hubo diferencias entre ambos grupos y los valores de glutatión peroxidasa fueron mayores en el grupo B ($p = 0,048$), pero no hubo efecto interacción (fig. 1B). No obstante, el incremento en la actividad plasmática de la glutatión peroxidasa entre el momento basal y la reperfusión fue significativamente mayor en el grupo A ($91,09 \pm 44,76$ frente a $44,10 \pm 38,98$; $p = 0,019$) (fig. 2C).

La actividad de la glutatión reductasa se incrementó de la situación basal a la isquemia-reperfusión en los 2 grupos ($p < 0,01$), sin que hubiera diferencias entre isquemia y reperfusión. No hubo diferencias significativas entre los grupos ni en el efecto interacción (fig. 1C). El incremento en la actividad plasmática entre el momento basal y la reperfusión fue mayor en el grupo A, con una diferencia muy próxima a la significación estadística ($61,82 \pm 46,7$ frente a $33,0 \pm 30,45$; $p = 0,10$).

Los valores de la superóxido dismutasa se incrementaron de manera significativa entre el momento basal y la isquemia y entre isquemia y reperfusión.

Aunque el comportamiento fue similar en ambos grupos, la actividad enzimática fue mayor en el grupo B ($p = 0,01$) (fig. 1D).

Antioxidantes no enzimáticos

No hubo diferencias significativas en los valores de α -tocoferol entre tiempos ni entre grupos, que se comportaron de forma similar. El retinol se redujo significativamente entre el momento basal y la isquemia ($p < 0,001$), aunque no entre la isquemia y la reperfusión. Tampoco hubo diferencias entre los grupos ni efecto interacción (fig. 1E). No obstante, entre el momento de máxima isquemia y la reperfusión, el comportamiento de los grupos fue diferente. Mientras en el grupo A la concentración de retinol siguió descendiendo hasta alcanzar un mínimo coincidiendo con los 30 min de reperfusión, en el grupo B la concentración de retinol no disminuyó, sino que se recuperó ligeramente. La diferencia (retinol en reperfusión – retinol en isquemia) se acercó a valores estadísticamente significativos ($-0,99 \pm 2,49$ en el grupo A frente a $0,79 \pm 2,23$ en el grupo B; $p = 0,10$).

Estado de los antioxidantes totales

El estado de los antioxidantes totales se incrementó significativamente del estado basal a la isquemia y a la reperfusión ($p < 0,001$), pero no entre estas dos últimas. No hubo diferencias significativas entre los grupos y, además, su comportamiento fue similar (fig. 1F).

DISCUSIÓN

La cirugía cardíaca y en concreto el TC constituyen un escenario ideal para el estudio del DIR, al ser procesos reproducibles, con una isquemia larga y una reperfusión controlada. En el presente trabajo se analiza el posible efecto citoprotector de la TMZ al atenuar el daño mediado por los ROS en un modelo experimental de TC.

Daño por isquemia-reperfusión en el trasplante cardíaco

A juzgar por el incremento en la actividad plasmática de la creatincinasa y la lactato deshidrogenasa, durante el TC se produjo una progresiva pérdida de la integridad de la membrana citoplasmática y la viabilidad celular, que comenzó en la fase de isquemia y alcanzó su máximo en la reperfusión. En otros modelos experimentales^{22,23} y clínicos^{20,21,24} de DIR se ha observado un incremento similar en reperfusión de la actividad de estas enzimas. Por lo que respecta al TC, Bando et al²⁵ encontraron que la isoenzima MB de la creatincinasa permanecía constante en isquemia, pero aumentaba de

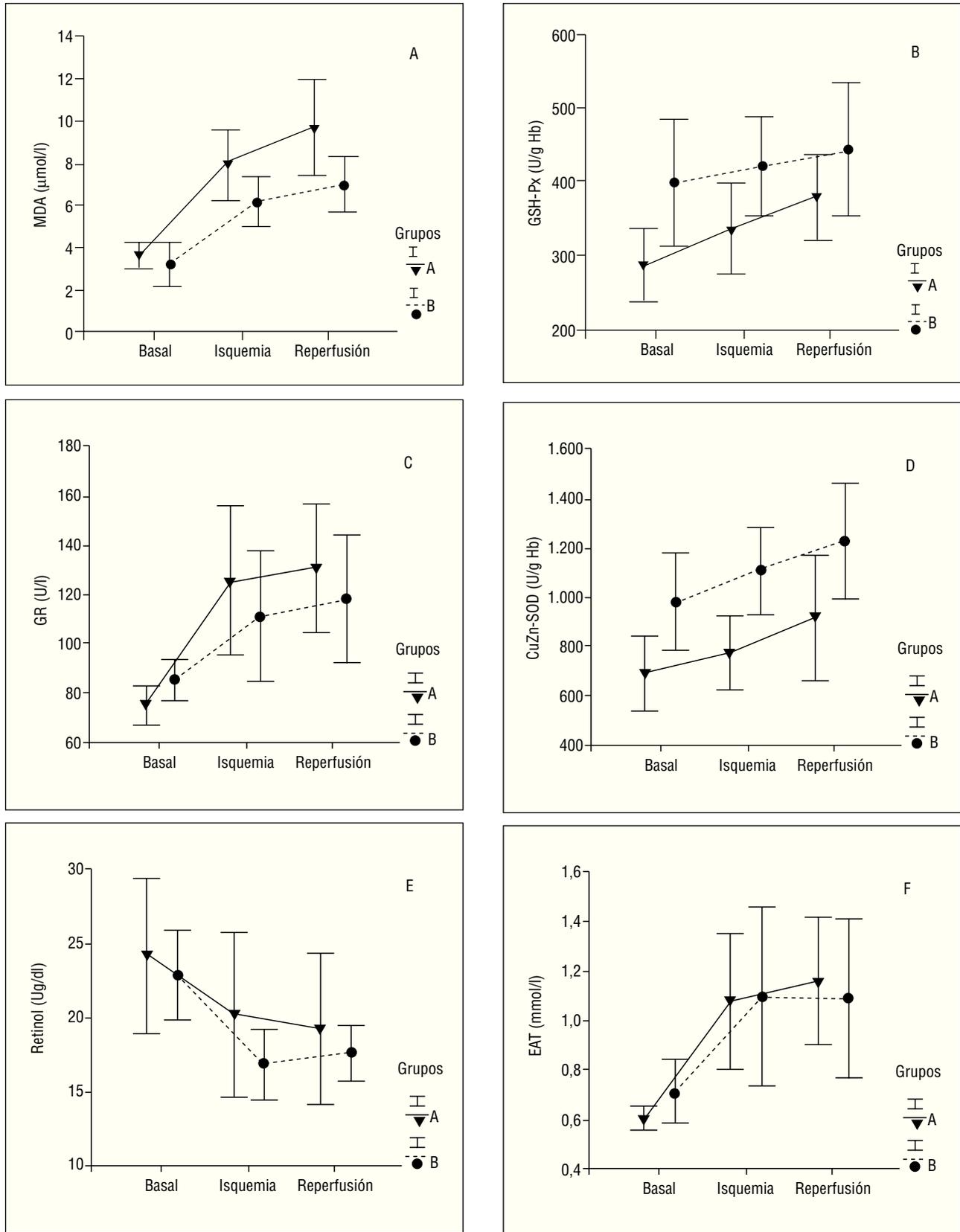


Fig. 1. Determinaciones analíticas en ambos grupos en los 3 tiempos de observación durante el trasplante. Gráfico de barras de error que representan la media y el intervalo de confianza del 95%. A: malonildialdehído (MDA); B: glutatión peroxidasa (GSH-Px); C: glutatión reductasa (GR); D: superóxido dismutasa (CuZn-SOD); E: retinol; F: estado de antioxidantes totales (EAT).

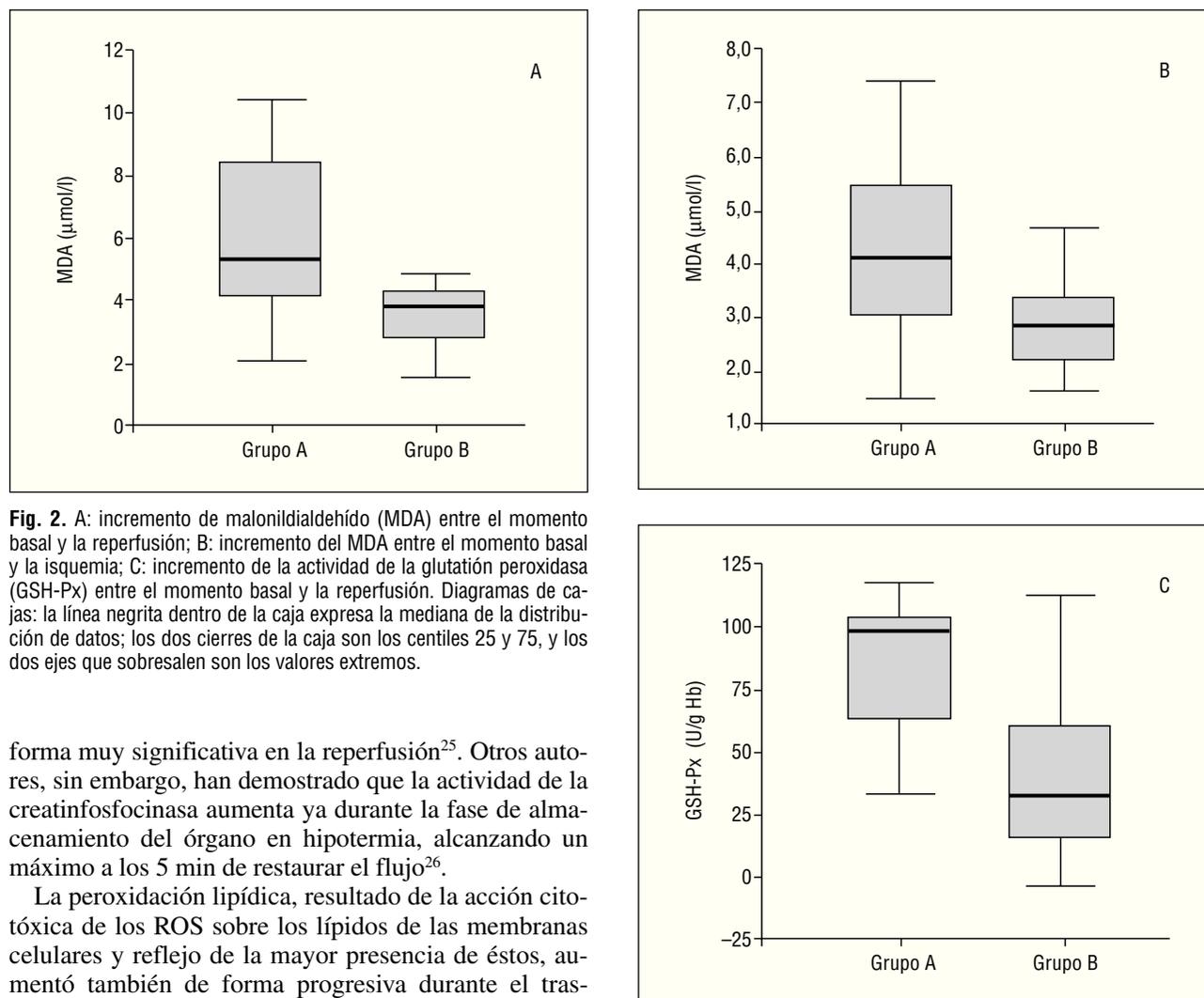


Fig. 2. A: incremento de malondialdehído (MDA) entre el momento basal y la reperusión; B: incremento del MDA entre el momento basal y la isquemia; C: incremento de la actividad de la glutatión peroxidasa (GSH-Px) entre el momento basal y la reperusión. Diagramas de cajas: la línea negra dentro de la caja expresa la mediana de la distribución de datos; los dos cierres de la caja son los centiles 25 y 75, y los dos ejes que sobresalen son los valores extremos.

forma muy significativa en la reperusión²⁵. Otros autores, sin embargo, han demostrado que la actividad de la creatinfosfocinasa aumenta ya durante la fase de almacenamiento del órgano en hipotermia, alcanzando un máximo a los 5 min de restaurar el flujo²⁶.

La peroxidación lipídica, resultado de la acción citotóxica de los ROS sobre los lípidos de las membranas celulares y reflejo de la mayor presencia de éstos, aumentó también de forma progresiva durante el trasplante. Así se deduce del significativo incremento que se produjo en ambos grupos en las concentraciones de MDA entre la situación basal y la isquemia, y entre ésta y la reperusión. El aumento del índice de peroxidación lipídica en la reperusión es frecuente en trabajos experimentales y clínicos sobre DIR^{27,28}. En el campo del trasplante experimental, Stewart et al²⁹ y Bando et al²⁵, en sendos modelos de TC ortotópico, y Takeuchi³⁰, en un modelo de trasplante cardiopulmonar, también han observado un incremento del MDA tras la reperusión.

Durante el TC se produjo una reacción de los sistemas antioxidantes intracelulares, que debe entenderse como una respuesta ante la progresiva mayor presencia de ROS. El incremento en la actividad de la glutatión peroxidasa y reductasa permite neutralizar hidroperóxidos que reaccionen con metales de transición para generar nuevos ROS, mientras que el de la superóxido dismutasa neutraliza el exceso de radicales superóxido mediante la reacción dismutasa. En pacientes en los que se realiza cirugía cardíaca con circulación extracorpórea también aumenta la actividad de la glutatión reductasa eritrocitaria en reperusión³¹. En un

modelo experimental en ratas que recibieron una dieta deficitaria en vitamina B₆, se ha demostrado que cuanto mayor era el grado de peroxidación lipídica, mayor era la actividad cardíaca de la glutatión peroxidasa y reductasa³². Otros factores oxidantes, como el alcohol, el ejercicio y el tabaquismo se han asociado con una mayor actividad de este sistema enzimático^{33,34}. La respuesta de la superóxido dismutasa ante el estrés oxidativo no es tan uniforme y, aunque se ha observado un incremento en su actividad intracardíaca paralelo al aumento de la peroxidación lipídica inducido por el ejercicio³³, en otros modelos se ha encontrado un descenso de la actividad³⁴ o la concentración²⁸ de la enzima. Lafont et al³⁵ han atribuido la no modificación de la actividad de la superóxido dismutasa tras la angioplastia coronaria postinfarto a la corta duración del proceso de DIR en comparación con la vida media del hemátie, lo que puede explicar por qué en nuestro modelo, con tiempo de isquemia más prolongado, sí se han encontrado cambios.

El descenso en la concentración de retinol en isquemia-reperfusion podría ser consecuencia de su mayor consumo al neutralizar los ROS. En varios trabajos sobre DIR experimental^{28,36} y en pacientes sometidos a angioplastia coronaria³⁵ o trombólisis postinfarto³⁷ se ha observado un descenso en la concentración de vitaminas E y A durante la reperfusion. En cirugía cardíaca, si bien Coghlan et al³⁸ han evidenciado una disminución de α -tocoferol tras la revascularización coronaria, otros autores no han encontrado cambios³⁹. En el presente trabajo, el hecho de que la mayor producción de ROS en la isquemia-reperfusion se haya acompañado exclusivamente de un descenso en la concentración de retinol y no de vitamina E puede deberse a que el α -tocoferol, a pesar de haberse consumido al neutralizar una mayor cantidad de radicales peroxilo, se haya también regenerado con rapidez a partir del radical tocoferoxilo.

El incremento en la isquemia-reperfusion del estado de antioxidantes totales, que representa de forma global e inespecífica la potencia antioxidante del plasma, es un resumen de lo ocurrido con el resto de los antioxidantes.

Efecto de la trimetazidina

La TMZ (1-[2, 3, 4-trimetoxibenzil] piperacina diclorhidrato; Servier, Courbevoie, Francia) es una sustancia farmacéutica introducida en la práctica clínica humana en 1987 por su actividad antiisquémica desprovista de efectos hemodinámicos colaterales⁴⁰. En varios trabajos experimentales y clínicos se ha demostrado que, además, ejerce un efecto citoprotector limitando el DIR, cuyo mecanismo de acción es múltiple: potenciación del metabolismo oxidativo de la glucosa, disminución de la acidosis y la hipercalcemia intracelular, y atenuación de la respuesta inflamatoria y la producción de ROS¹²⁻¹⁶.

En nuestro modelo experimental de TC, la TMZ no influyó en el grado de necrosis celular, pero sí ejerció un efecto cardioprotector al reducir el grado de peroxidación lipídica generado por los ROS durante la isquemia-reperfusion. En diferentes modelos experimentales en el corazón se ha confirmado esta capacidad del fármaco para disminuir la generación de ROS y el daño inducido por éstos en la membrana citoplasmática^{12,13,15}. En la clínica humana, su efecto beneficioso mejorando la función ventricular postoperatoria en pacientes con cirugía coronaria se ha relacionado con la reducción del MDA en el seno coronario durante la fase de reperfusion²¹. Baumert et al⁸, en un modelo de autotrasplante renal en cerdo, han observado una mejor preservación de la integridad mitocondrial y una mejor función renal postoperatoria tras la inclusión de TMZ en la solución de preservación de órganos. En otra experiencia de trasplante unipulmonar en rata, Inci et al¹⁰ obtuvieron tras la reperfusion una mejor

oxigenación, una mayor reserva energética celular y un menor valor de peroxidación lipídica al pretratar al receptor con TMZ intravenosa e incluirla en la cardioplejía.

La presencia de una menor presión oxidativa durante las fases de isquemia y reperfusion puede perfectamente explicar la alteración del patrón de reacción de los sistemas antioxidantes intracelulares que se produjo en el grupo tratado. La TMZ atenuó la activación del sistema enzimático derivado del glutatión y el consumo de retinol en la reperfusion. A diferencia de la glutatión peroxidasa, en el caso del retinol y la glutatión reductasa las diferencias, probablemente por el limitado tamaño de la muestra, no alcanzaron la significación estadística, pero la tendencia fue clara.

Limitaciones del estudio

Los 2 grupos de animales no fueron homogéneos antes del TC por lo que respecta a la actividad basal de la glutatión peroxidasa y la superóxido dismutasa. El grupo B partió con una actividad basal mayor de estas enzimas, a pesar de que todos los animales procedieron de la misma granja, fueron tratados de igual forma y alimentados con la misma dieta, lo que presupone un nivel de estrés oxidativo similar. La explicación puede residir en el limitado tamaño de la muestra y en la alta dispersión natural del grado de actividad de estas enzimas en esta especie. Asimismo, hubo una importante diferencia en la creatinincinasa basal entre los 2 grupos ($p = 0,08$) que podría obedecer a traumatismos musculares que los cerdos se producen unos a otros durante su traslado y estabulación.

El TC no es un modelo puro de DIR, pues está «maquillado» por los efectos de la hipotermia, la cardioplejía y la circulación extracorpórea, que pueden resultar factores de confusión al evaluar la actividad citoprotectora de un fármaco. La hipotermia bloquea la expresión de E-selectina en la superficie endotelial⁴¹, lo que puede atenuar la activación de polimorfonucleares y la generación de ROS. La cardioplejía contiene aditivos antioxidantes, como el manitol, la histidina y el glutatión reducido. El contacto de la sangre con el circuito de circulación extracorpórea da lugar a la producción de multitud de mediadores que pueden activar el endotelio vascular y promover la generación de ROS. Una alternativa para obviar esta interferencia hubiera sido la realización del TC de forma heterotópica, en normotermia y sin cardioplejía, pero nuestra intención era imitar al máximo las condiciones en las que habitualmente se desarrolla el TC humano, ámbito de una futura probable aplicación de la TMZ.

CONCLUSIONES

Durante las fases de isquemia y reperfusion del TC se incrementa el grado de peroxidación lipídica y se

activan los sistemas antioxidantes intracelulares, lo que indica una progresiva generación de los ROS. La TMZ ejerce una acción citoprotectora, al limitar el DIR producido por los ROS y atenuar la respuesta de dichos sistemas de defensa.

BIBLIOGRAFÍA

- Almenar Bonet L. Registro Español de Trasplante Cardíaco. XIV Informe oficial de la sección de insuficiencia cardíaca, trasplante cardíaco y otras alternativas terapéuticas de la Sociedad Española de Cardiología (1984-2002). *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:1210-7.
- Martinez-Dolz L, Almenar L, Arnau MA, Osa A, Rueda J, Vicente JL, et al. Análisis de los factores que pueden influir en la aparición del fallo agudo del corazón trasplantado. *Rev Esp Cardiol*. 2003;56:168-74.
- Aziz TM, Burgess MI, El-Gamel A, Campbell CS, Rahman AN, Deiraniya AK, et al. Orthotopic cardiac transplantation technique: a survey of current practice. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1242-6.
- Kazimoglu K, Bozkurt AK, Suzer O, Konukoglu D, Koksak C, Kurdal T, et al. The role of antioxidant supplementation in cardiac transplantation: an experimental study en rats. *Transplant Proc*. 2004;36:2939-43.
- Jung FJ, Yang L, Harter L, Inci I, Schneiter D, Lardinois D, et al. Melatonin in vivo prolongs cardiac allograft survival in rats. *J Pineal Res*. 2004;37:36-41.
- Ryan JB, Hicks M, Cropper JR, Nicholson A, Kesteven SH, Wilson MK, et al. Lazaroid (U74389G)-supplemented cardioplegia: results of a double-blind, randomized, controlled trial in a porcine model of orthotopic heart transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2003;22:347-56.
- Biagioli B, Scolletta S, Marchetti L, Tabucchi A, Carlucci F. Relationships between hemodynamic parameters and myocardial energy and antioxidant status in heart transplantation. *Biomed Pharmacother*. 2003;57:156-62.
- Baumert H, Faure JP, Zhang K, Petit I, Goujon JM, Dutheil D, et al. Evidence for a mitochondrial impact of trimetazidine during cold ischemia and reperfusion. *Pharmacology*. 2004;71:25-37.
- Faure JP, Petit I, Zhang K, Dutheil D, Doucet C, Favreau F, et al. Protective roles of polyethylene glycol and trimetazidine against cold ischemia and reperfusion injuries of pig kidney graft. *Am J Transplant*. 2004;4:495-504.
- Inci I, Dutly A, Inci D, Boehler A, Weder W. Recipient treatment with trimetazidine improves graft function and protects energy status after lung transplantation. *J Heart Lung Transplant*. 2001;20:1115-22.
- Nydegger UE, Carrel T, Laumonier T, Mohacs P. New concepts in organ preservation. *Transpl Immunol*. 2002;9:215-25.
- Monteiro P, Duarte AI, Goncalves LM, Moreno A, Providencia LA. Protective effect of trimetazidine on myocardial mitochondrial function in an ex-vivo model of global myocardial ischemia. *Eur J Pharmacol*. 2004;503:123-8.
- Singh D, Chopra K. Effect of trimetazidine on renal/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res*. 2004;50:623-9.
- Stanley WC. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*. 2004;9 Suppl 1:31-45.
- Marzilli M. Cardioprotective effects of trimetazidine: a review. *Curr Med Res Opin*. 2003;19:661-72.
- Lopaschuk GD, Barr R, Thomas PD, Dyck JR. Beneficial effects of trimetazidine in ex vivo working ischemic hearts are due to a stimulation of glucose oxidation secondary to inhibition of long-chain 3-ketoacyl coenzyme a thiolase. *Circ Res*. 2003;93 Suppl E:26-32.
- Kountouris E, Pappa E, Pappas K, Dimitroula V, Karanikis P, Tzimas T, et al. Metabolic management of coronary heart disease: adjunctive treatment with trimetazidine decreases QT dispersion in patients with a first acute myocardial infarction. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2001;15:315-21.
- Polonski L, Dec I, Wojnar R, Wilczek K. Trimetazidine limits the effects of myocardial ischaemia during percutaneous coronary angioplasty. *Curr Med Res Opin*. 2002;18:389-96.
- Di Pasquale P, Lo Verso P, Bucca V, Cannizzaro S, Scalzo S, Maringhini G, et al. Effects of trimetazidine administration before thrombolysis in patients with anterior myocardial infarction: short-term and long-term results. *Cardiovasc Drugs Ther*. 1999;13:423-8.
- Tunerir B, Colak O, Alatas O, Besogul Y, Kural T, Aslan R. Measurement of troponin T to detect cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery bypass grafting. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:2173-6.
- Fabiani JN, Ponzio O, Emerit I, Massonet-Castel S, Paris M, Chevalier P, et al. Cardioprotective effect of trimetazidine during coronary artery graft surgery. *J Cardiovasc Surg*. 1992;33:486-90.
- Suzuki K, Sawa Y, Ichikawa H, Kaneda Y, Matsuda H. Myocardial protection with endogenous overexpression of manganese superoxide dismutase. *Ann Thorac Surg*. 1999;68:1266-71.
- Eng S, Maddaford TG, Kardami E, Pierce GN. Protection against myocardial ischemic/reperfusion injury by inhibitors of two separate pathways of Na⁺ entry. *J Mol Cell Cardiol*. 1998;30:829-35.
- Buerke M, Rupprecht HJ, Vom Dahl J, Terres N, Seyfarth M, Schultheiss HP, et al. Sodium-hydrogen exchange inhibition: novel strategy to prevent myocardial injury following ischemia and reperfusion. *Am J Cardiol*. 1999;83:G19-22.
- Bando K, Mamoru T, Shigeru T. Prevention of free radical-induced myocardial injury by allopurinol. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 1988;95:465-73.
- Cargnoni A, Ceconi C, Bernocchi P, Parrinello G, Benigno M, Boraso A, et al. Changes in oxidative stress and cellular redox potential during myocardial storage for transplantation: experimental studies. *J Heart Lung Transplant*. 1999;18:478-87.
- De la Cruz JP, Villalobos MA, Sedeno G, Sánchez de la Cuesta F. Effect of propofol on oxidative stress in an in vitro model of anoxia-reoxygenation in the rat brain. *Brain Res*. 1998;800:136-44.
- Campo GM, Squadrito F, Campo S, Altavilla D, Avenoso A, Ferlito M, et al. Antioxidant activity of U-83836E, a second generation lazaroid, during myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Res*. 1997;27:577-90.
- Stewart JR, Gerhardt EB, Wehr CJ, Shuman T, Merrill WH, Hammon JW, et al. Free radical scavengers and myocardial preservation during transplantation. *Ann Thorac Surg*. 1986;42:390-3.
- Takeuchi K. Reperfusion injury after heart-lung transplantation -OP41483-alpha-CD (prostaglandin I2 analogue) as a preventive for the reperfusion injury, especially the oxygen derived free radicals. *Nippon Kyobu Geka Gakkai Zasshi*. 1992;40:225-34.
- Inal M, Alatas O, Kanbak G, Akyuz F, Sevin B. Changes of antioxidant enzyme activities during cardiopulmonary bypass. *J Cardiovasc Surg Torino*. 1999;40:373-6.
- Cabrini L, Bergami R, Fiorentini D, Marchetti M, Landi L, Tolomelli B. Vitamin D6 deficiency affects antioxidant defenses in rat liver and heart. *Biochem Mol Biol Int*. 1998;46:689-97.
- Husain K, Somani SM. Response of cardiac antioxidant system to alcohol and exercise training in the rat. *Alcohol*. 1997;14:301-7.
- Helen A, Vijayammal PL. Effect of vitamin A supplementation on cigarette smoke-induced lipid peroxidation. *Vet Hum Toxicol*. 1997;39:18-21.
- Lafont A, Marwick TH, Chisolm GM, Van Lente F, Vaska KJ, Whitlow PL. Decreased free radical scavengers with reperfusion after coronary angioplasty in patients with acute myocardial infarction. *Am Heart J*. 1996;131:219-23.
- Palace V, Kumar D, Hill MF, Khaper N, Singal PK. Regional differences in non-enzymatic antioxidants in the heart under control

- and oxidative stress conditions. *J Mol Cell Cardiol.* 1999;31:193-202.
37. Young IS, Purvis JA, Lightbody JH, Adgey AA, Trimble ER. Lipid peroxidation and antioxidant status following thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 1993;14:1027-33.
38. Coghlan JG, Flitter WD, Clutton SM, Ilesley CD, Rees A, Slater TF. Lipid peroxidation and changes in vitamin E levels during coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1993;106:268-74.
39. Tangney CC, Hankins JS, Murtaugh MA, Piccione W Jr. Plasma vitamins E and C concentrations of adult patients during cardiopulmonary bypass. *J Am Col Nutr.* 1998;17:162-70.
40. Sellier P, Audouin P, Payen B, Corona P, Duong TC, Ourbak P. Acute effects of trimetazidine evaluated by exercise testing. *Eur J Clin Pharmacol.* 1987;33:205-7.
41. Haddix T, Pohlman TH, Noel RF, Sato TT, Boyle EM, Verrier ED. Hypothermia inhibits human E-selectin transcription. *J Surg Res.* 1996;64:176-83.