



REVISTA MÉDICA UNIVERSITARIA
Facultad de Ciencias Médicas - UNCuyo

Vol 5 · N° 2 · 2009
ISSN 1669- 8921



EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS DEL ÁCIDO ACETILSALICÍLICO EN LA INJURIA POR ISQUEMIA/REPERFUSIÓN

Lucero G, Diez E, Ponce Zumino A

Laboratorio de Fisiología Cardiovascular, Área de Fisiología Normal, Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Cuyo (IMBECU-FCM, CONICET).

Contacto: Diez Emiliano Raúl, Área de Fisiología Normal. Av. Libertador 80. Centro Universitario. (5500) Mendoza. Argentina. Casilla de Correo 33 (5500) Mendoza. Tel: 054-0261-4135000 int 2682 - Fax: 054-0261-4494047.

E-mail-address: diez.emiliano@fcm.uncu.edu.ar

RESUMEN

La reperfusión, luego de un período de isquemia miocárdica breve, puede desencadenar un daño paradójico, dentro del cual, se destacan las arritmias ventriculares. Existen estudios que reportan un efecto beneficioso del ácido acetilsalicílico (AAS) a nivel cardiovascular, pero se desconocen los efectos electrofisiológicos en el proceso de injuria por isquemia/reperfusión. El objetivo de este estudio es evaluar las propiedades electrofisiológicas del AAS, en especial si puede evitar las arritmias de reperfusión (AR) en forma independiente de su efecto antiplaquetario. Se trabajó con corazones aislados de rata Sprague Dawley según la técnica de Langendorff sometidos a 10 minutos de isquemia regional. Se realizaron 3 series experimentales: 1) control (C, n=10); 2) , corazones perfundidos durante todo el protocolo con AAS 0.14 mM (AAS, n=10) y 3) corazones que recibieron la misma dosis de AAS sólo en los 3 primeros minutos de la reperfusión (AASR, n=9). Se analizaron la incidencia y severidad de las AR y su relación con el ECG y los potenciales de acción registrados simultáneamente. El 82% del grupo control presentó AR sostenidas, el 30 % con AAS y el 22% con AASR (ambas $p < 0.05$ por χ^2). En la reperfusión se observó que luego de los primeros tres minutos la duración del potencial de acción (DPA) fue mayor en el grupo AASR ($81,5 \pm 23,1$) que en el grupo AAS ($55,2 \pm 10,0$) $p < 0.05$ por ANOVA I. Por lo tanto, la menor incidencia de AR en los grupos tratados podría asociarse al efecto de la aspirina sobre la DPA y que la droga estudiada tendría efectos sobre esta variable sólo al momento de reperfusión.

Palabras claves: Aspirina, arritmias de reperfusión, potencial de acción.

ABSTRACT

Ventricular fibrillation may occur within seconds after restoration of blood flow to myocardium turned ischemic by a period of coronary occlusion (reperfusion). The mechanisms of the beneficial cardiovascular effects of acetylsalicylic acid (ASA, aspirin) therapy are not completely understood. In this study, we tested the hypothesis that ASA treatment could reduce reperfusion arrhythmias acting during ischemia and/or during early reperfusion by an antiplatelet independent mechanism.

We evaluate the effects of ASA 0.14mM perfused from the beginning of the experiment (ASA) or only for 3 min after 10 min of regional ischemia in isolated rat hearts (ASAR). ECG and membrane potential were synchronously recorded. ASA did not change any electrophysiological properties until reperfusion. Both treatments reduce reperfusion ventricular tachycardia and/or fibrillation to 30% and 22,2 % in ASA and ASAR respectively, versus 81,8 % in control group. Action potential duration was prolonged after ASA was ceased when compared with continuous ASA perfusion, suggesting a modification only at reperfusion. The conclusions from this study were that acute aspirin treatment, infused at an early reperfusion period has similar beneficial actions than a continuous infusion of this compound and that this treatment only modify electrophysiological variables at reperfusion.

Key words: Aspirin, reperfusion arrhythmias, action potential.

Introducción

La isquemia es el sufrimiento celular causado por la disminución transitoria o permanente del riego sanguíneo y consecuente disminución del aporte de oxígeno, de nutrientes y de la eliminación de productos del metabolismo de un tejido biológico. Al restablecerse el flujo se produce, paradójicamente, un daño por acción de la reperfusión.¹ Se postula que esta injuria por isquemia/reperfusión es debida a la liberación de especies reactivas del oxígeno, acumulación de calcio citoplasmático, alteración en el metabolismo, trastornos en la interacción intercelular, etc. Si estos procesos se desarrollan en el corazón, pueden condicionar un daño funcional y estructural, factible de manifestarse como entidades nosológicas denominadas: miocardio aturdido o hibernado, “fenómeno de no reflujo” (daño microvascular) y/o arritmias por reperfusión (AR).¹⁻⁴ Al ser el corazón un tejido excitable, las propiedades electrofisiológicas han sido la base conceptual para tratar de estudiar los trastornos del ritmo.

Las arritmias producidas en el contexto del síndrome coronario agudo son una de las principales causas de muerte.⁵ Debido a que la mayoría de las arritmias se producen de manera súbita y fuera de ámbito hospitalario, podrían ser explicadas por el daño isquémico o por las injuria por isquemia/reperfusión. Los reportes sobre la incidencia de AR indican que esta complicación no es tan frecuente en el manejo hospitalario, sin embargo, en los últimos años el cambio en las estrategias orientadas a lograr la reperfusión más tempranamente, siguiendo el concepto “tiempo es miocardio”, se ha relacionado con un aumento de su incidencia.^{6,7} Por otro lado, es relevante el estudio de medidas para prevenir las AR, ya que los que sobreviven a las mismas presentan, a largo plazo, una peor evolución comparada con los pacientes que no las sufrieron.⁸

El uso de ácido acetil salicílico (AAS) es una práctica instituida y ampliamente probada en el manejo terapéutico del síndrome coronario agudo, tanto en la prevención como en el tratamiento del mismo.^{9,10} En especial se resalta la capacidad de ser un antiagregante plaquetario muy eficaz y con un poderoso bloqueo de la producción de tromboxanos.¹¹ También se ha descrito que posee propiedades antioxidantes.^{12,13} Debido a que esta droga confiere protección en modelos patológicos donde no hay plaquetas circulantes esto abre la puerta a diferentes mecanismos de cardioprotección.¹⁴ A pesar de ser la droga más estudiada de la historia, se desconoce si tiene un efecto directo sobre los potenciales de acción en las distintas etapas de la injuria por isquemia/reperfusión.

El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del AAS sobre las variables electrofisiológicas y las arritmias de reperfusión en corazones aislados de ratas.

Materiales y métodos

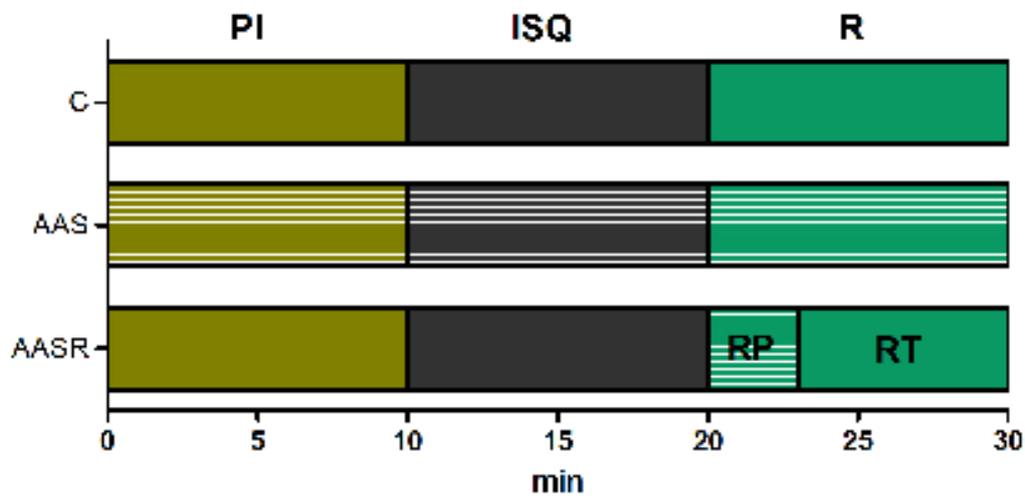
Se trabajó con ratas Sprague Dawley macho de 320 a 420 g. Los corazones aislados de ratas, fueron perfundidos según la técnica de Langendorff con una solución de Krebs-Henseleit modificada (KH) a 36.5 ± 0.5 °C que contenía en mM: 121 NaCl, 5 KCl, 2 CaCl₂, 1.2 MgSO₄, 1.2 NaHPO₂, 25 NaHCO₃, 10 glucosa, equilibrada a pH 7.4 mediante el burbujeo de una mezcla gaseosa de 5% de CO₂ en O₂.

Se realizaron 3 series experimentales con corazones latiendo espontáneamente, a saber: 1) control (C) n=11; 2) corazones perfundidos durante todo el protocolo con AAS 0.14 mM (AAS), n=10, esta dosis fue elegida por ser la concentración plasmática libre, luego de la absorción oral de una dosis de 100 mg de este fármaco; 3) corazones que recibieron la misma dosis de AAS sólo en los 3 primeros minutos de la reperfusión (AASR), n=9.

Se registraron los potenciales de acción epicárdicos del ventrículo izquierdo a través de microelectrodos de vidrio convencionales, hechos flexibles por medio de un hilo de tungsteno. Además, con electrodos extracelulares colocados en la aurícula derecha y en la punta del corazón, se registró el electrograma simulando la derivación D_{II}. Se midieron el potencial de reposo, la amplitud y duración de los potenciales de acción transmembrana y la frecuencia cardíaca, en las diferentes etapas del protocolo experimental. Los potenciales de acción se analizaron sólo en los latidos sinusales que fueron corroborados electrocardiográficamente.

Luego de 20 minutos de estabilización del preparado se registró la actividad eléctrica basal durante 10 minutos (PI). Luego se realizó una isquemia regional ligando la arteria coronaria descendente anterior con un hilo 6/0 por 10 minutos y se registraron las modificaciones a lo largo de la isquemia (ISQ). Una vez liberada la ligadura, se registraron los datos correspondientes al período de reperfusión (R) que se extendió 10 minutos. En el grupo AASR se perfundió en los primeros 3 minutos de R con la droga en estudio y luego se volvió a la solución KH. A fin de evaluar los efectos de la aspirina sobre las propiedades electrofisiológicas se dividió al período de reperfusión en dos: una etapa precoz (RP), durante los primeros tres minutos, y otra tardía (RT), los siete restantes.

Figura 1 Protocolo experimental



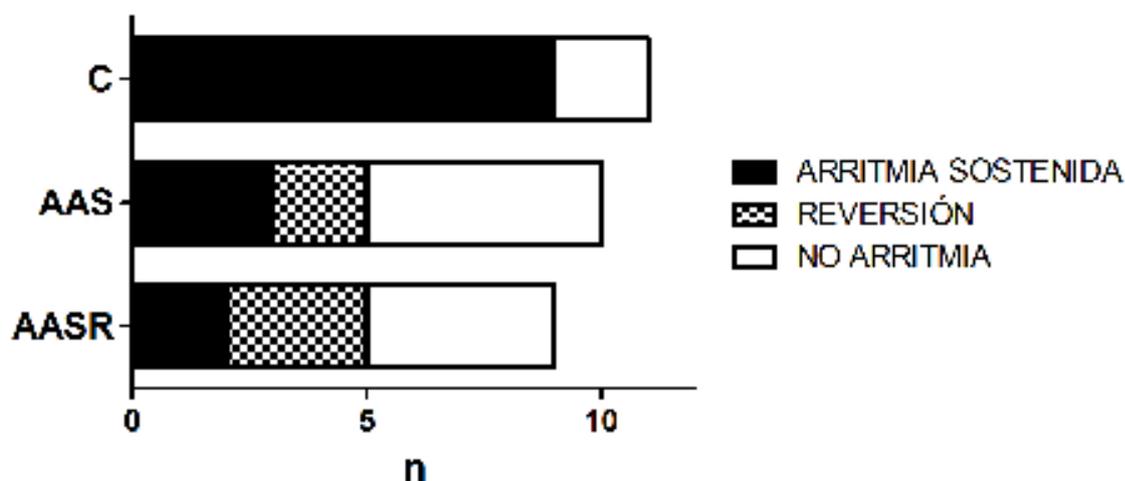
Se analizaron datos referentes a la incidencia y duración de las arritmias de reperusión de acuerdo a la convención de Lambeth (15). Arritmias sostenidas

Los datos fueron expresados como media \pm desvío estándar y analizados estadísticamente mediante ANOVA I. Los datos de frecuencia fueron analizados en tablas de contingencia mediante el test de χ^2 y se considero significativo un valor de $p < 0,05$.

Resultados

En la figura 2 se observa una disminución de las arritmias sostenidas (relleno negro) en el grupo AAS y AASR respecto al C (30% y 22,2 % versus 81,8 % respectivamente $p < 0,05$). En los grupos AAS y AASR también se observa una reversión a ritmo sinusal (20% y 33,3% respectivamente, cuadrulado). En blanco se observan los experimentos que no padecieron arritmias en ningún momento.

Figura 2 Incidencia de Arritmias

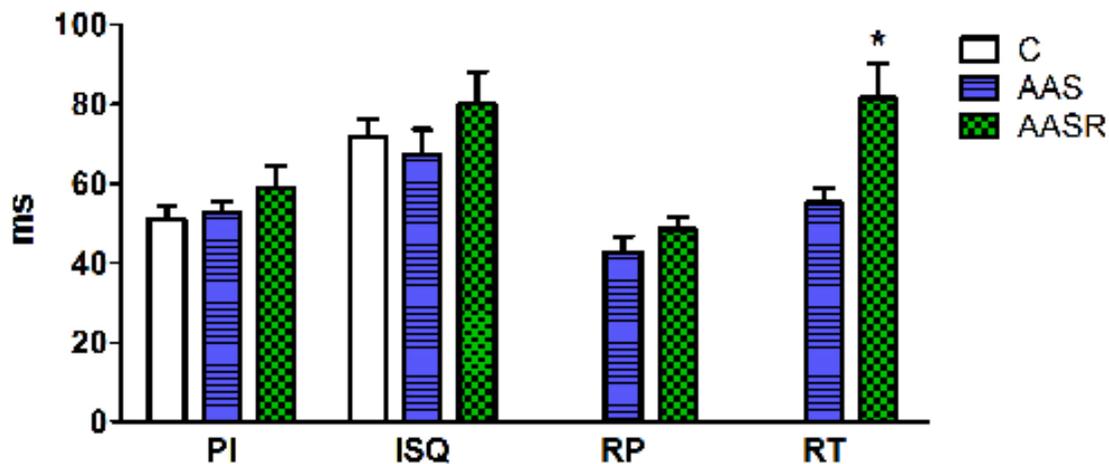


La amplitud de los potenciales (mV) fue similar en el periodo de PI siendo los valores $87,6 \pm 6,3$ en el grupo C; $86,5 \pm 8,0$ en grupo AAS y $90,1 \pm 5,3$ en el grupo AASR. Durante ISQ todos los grupos sufrieron una reducción de aproximadamente 17 a 20 mV alcanzando valores de $68,4 \pm 12,3$; $70,4 \pm 9,9$ y $73,4 \pm 9,0$ para C, AAS y AASR respectivamente. Al no tener un número comparable de latidos sinusales durante la R para grupo el C, debido a que la mayoría presentó arritmias sostenidas, sólo se analizaron los grupos AAS y AASR. En la RP la amplitud para el grupo AAS se recuperó más rápidamente alcanzando $80,4 \pm 12,4$, mientras que para AASR alcanzó $71,4 \pm 16,2$. La alta dispersión podría explicar la falta de significación. En la RT los valores para ambos grupos se equipararon siendo $85,3 \pm 5,7$ y $88,8 \pm 10,6$, para AAS y AASR respectivamente.

En la figura 3 se puede apreciar la comparación de duración del potencial de acción, al 90% de la repolarización, (DPA) en milisegundos para el grupo C, AAS y AASR en los distintos periodos. En PI $51,1 \pm 10,2$; $52,8 \pm 8,2$ y $58,7 \pm 17,4$, respectivamente. En ISQ los valores alcanzados fueron: grupo C $71,6 \pm 15,2$; AAS $67,4 \pm 19,9$ y AASR $80,0 \pm$

25,6. Si bien no se encontraron diferencias en los primeros 3 minutos de R ($42,7 \pm 11,1$ y $48,5 \pm 8,1$), en RT la restitución de la solución de KH se asoció con un aumento de la DPA desde $55,2 \pm 10,0$ para el grupo AAS hasta $81,5 \pm 23,1$ en el grupo AASR.

Figura 3 Duración del potencial de acción



El potencial de reposo no presentó cambios al ser comparados respecto al grupo control ni entre los grupos en ninguno de los períodos estudiados.

La frecuencia cardíaca (latidos por minuto) en PI fue: C $250,8 \pm 64,6$, AAS $262,1 \pm 47,8$ y AASR $292,5 \pm 34,7$; y en ISQ C $202,8 \pm 46,7$; AAS $217,2 \pm 45,8$ y AASR $251,5 \pm 36,2$.

Durante la RP se apreció una disminución significativa en AASR respecto de AAS ($91,7 \pm 21,9$ vs. $237,0 \pm 51$ $p < 0,05$), la cual no se mantuvo durante la RT (AAS $244,9 \pm 40,2$ y AASR $208,9 \pm 46,7$).

Discusión

En este trabajo se ha puesto en evidencia un efecto antiarrítmico del AAS asociado a modificaciones en el potencial de acción durante la reperfusión, que hasta donde llega nuestro conocimiento, no habían sido descritas. La droga redujo las arritmias ventriculares tanto al ser administrada a lo largo de todo el protocolo como al perfundirla

transitoriamente en la primera etapa de la reperfusión. La prolongación que se aprecia en la duración del potencial de acción al restituir la solución de K-H indica que el AAS impediría la prolongación de la duración del potencial de acción durante la reperfusión y que este efecto podría conferirle estabilidad eléctrica y ser uno de los mecanismos implicados en la cardioprotección. Por otro lado, la reducción importante de la frecuencia cardíaca en la RP podría colaborar con el efecto antiarrítmico en cuestión y pone aun más en evidencia la acción sobre la duración del potencial de acción, que en este caso no se prolongó a pesar de la bradicardia.

El estudio del efecto antiarrítmico del AAS, una droga tradicionalmente incluida dentro de los antiagregantes plaquetarios, en un modelo donde no hay plaquetas es una forma de aislar sus potenciales efectos electrofisiológicos.¹⁴ Si bien este abordaje nos permite comparar las propiedades de esta droga en una etapa control, luego durante la isquemia, y evaluar su impacto como antiarrítmico, el alto índice de arritmias de reperfusión oculta los posibles efectos a nivel del potencial de acción en esta etapa. El agregado de la droga en forma transitoria, sólo en la etapa de reperfusión, aporta dos nuevos elementos, por un lado la posibilidad de testear al fármaco como modificador del daño por reperfusión, aislándolo de los posibles efectos que pueda tener en la isquemia o preisquemia, y por otro lado, permite comparar el efecto una vez retirado el fármaco en cuestión.

Existen evidencias que refieren que la administración de AAS puede modificar la respuesta miocárdica a la isquemia, y a los procesos relacionados con la injuria por isquemia/reperfusión y en particular propiedades antiarrítmicas.^{14,16-18} Sin embargo, algunos autores refieren efectos deletéreos a nivel cardiovascular, inclusive efectos proarrítmicos, sobre todo en períodos de isquemias prolongadas.¹⁹ Si bien existen

reportes donde no se logró comprobar el efecto cardioprotector frente a las arritmias que se producen en la isquemia, las diferencias en los mecanismos fisiopatológicos, diferentes diseños experimentales y dosis podrían estar implicadas en los resultados obtenidos por estos autores.²⁰

En nuestro caso se utilizó la administración aguda de la droga en un modelo de corazón aislado libre de elementos formes de la sangre, este abordaje permite un mejor estudio de las propiedades eléctricas del corazón entero, a la vez que permite analizar fenómenos que ocurren a nivel de la membrana celular. Sin embargo, carece de las influencias que puedan aportar los estudios realizados mediante perfusión de sangre entera o con plaquetas²¹, del los fenómenos de ajuste que puede realizar el organismo al desarrollarse estudios *in vivo* o de los efectos que pueda tener la administración crónica de AAS sobre las propiedades electrofisiológicas.

A diferencia del estudio de las propiedades eléctricas en tejido o en células aisladas, el abordaje experimental utilizado nos permitió el estudio conjunto de las arritmias en el corazón entero y la morfología del potencial de acción epicárdico sólo en la etapa de la reperfusión.²² Sin embargo, no nos permite profundizar en los mecanismo moleculares íntimos, ni tampoco dilucidar qué corrientes iónicas serían las alteradas en los cambios arriba descritos.

Nuestro trabajo podría ampliar los fundamentos del efecto protector de la administración aguda de aspirina en cuanto a la mortalidad de los pacientes que sufren un infarto agudo de miocardio.²³⁻²⁴

En conclusión, el ácido acetilsalicílico fue capaz de reducir la incidencia y duración de las arritmias de reperfusión en corazones aislados de ratas, tanto cuando se perfundió

durante todo el protocolo, como en aquellos en los que sólo se perfundió la droga en la etapa temprana de la reperfusión.

En la reperfusión tardía se observó un aumento de la duración del potencial de acción en el grupo AASR, estos resultados y la ausencia de modificaciones en la morfología de los potenciales al perfundir la droga durante las etapas de preisquemia e isquemia, indica que la droga estudiada tendría efectos sobre esta variable sólo al momento de la reperfusión. Este grupo presentó, además, una transitoria disminución en la frecuencia cardíaca lo que refuerza aún más el efecto directo de la droga sobre la duración del potencial de acción.

Referencias bibliográfica

1. Férrez Santander SM, et al. Daño miocárdico por reperfusión. *Rev Esp Cardiol* 2004; 57: 9 – 21.
2. Carmeliet E. Cardiac Ionic Currents and Acute Ischemia: From Channels to Arrhythmias. *Physiol. Rev.* 79: 917–1017. 1999.
3. Zweier JL, Hassan Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-190.
4. Brooks WW, Conrad CH, Morgan JP. Reperfusion induced arrhythmias following ischemia in intact rat hearts: Role of intracellular calcium. *Cardiovasc Res* 1995; 29: 536-542.
5. Zipes DP. Guía de la Sociedad Europea de Cardiología: manejo de pacientes con arritmias ventriculares y la prevención en la muerte cardiaca súbita. *Rev Esp Cardiol* 2006; 59:1328.e1-51.
6. Grines CL, Browne KF, Marco J, Rothbaum D, Stone GW, O'Keefe J, et al. A comparison of immediate angioplasty with thrombolytic therapy for acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1993; 328:673-679.
7. Mehta RH et al. Primary Angioplasty in Myocardial Infarction (PAMI) Investigators. Sustained ventricular tachycardia or fibrillation in the cardiac catheterization laboratory among patients receiving primary percutaneous coronary intervention: Incidence, predictors, and outcomes. *J Am Coll Cardiol* 2004 43: 1765-1772.
8. Al-Khatib SM, Stebbins AL, Califf RM, for GUSTO-III trial. Sustained ventricular arrhythmias and mortality among patients with acute myocardial infarction: results from the GUSTO-III trial. *Am Heart J* 2003; 145(3):515-21.

9. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. Antithrombotic Trialists' Collaboration. *BMJ* 2002; 324:71-86.
10. Hung J; Medical Issues Committee of the National Heart Foundation of Australia. Aspirin for cardiovascular disease prevention. *Med J Aust.* 2003;179(3):147-52.
11. Rainsford KD. Anti-inflammatory drugs in the 21st century. *Subcell Biochem* 2007; 42:3-27.
12. Shi X, Ding M, Dong Z, Chen F, et al. Antioxidant properties of aspirin: characterization of the ability of aspirin to inhibit silica-induced lipid peroxidation, DNA damage, NF-kappaB activation, and TNF-alpha production. *Mol Cell Biochem* 1999;199(1-2):93-102.
13. Wolin MS. Novel Antioxidant Action of Aspirin May Contribute Beneficial Cardiovascular Actions. *Circ. Res.* 1998; 82:1021-1022 .
14. Johnston KM, MacLeod BA, Walker MJ. Effects of aspirin and prostacyclin on arrhythmias resulting from coronary artery ligation and on infarct size. *Br J Pharmacol.* 1983; 78(1):29-37.
15. Walker MJA et al. The Lambeth conventions: Guidelines for the study of arrhythmias in ischemia, infarction and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988; 22:447-455.
16. Moschos CB, Haider B, De La Cruz C, Lyons MM, Regan TJ. Antiarrhythmic effects of aspirin during nonthrombotic coronary occlusion. *Circulation* 1978;57:681-684.
17. Shehadeh AA, Arena J, Moschos CB, Regan TJ. Nonplatelet effects of aspirin during acute coronary occlusion: electrophysiologic and cation alterations in ischemic myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol Ther* 2000; 5(2):113-20.

18. Ahn YK, Cho JG, Park WS, et al. The effects of antiplatelet agents in the prevention of ventricular tachyarrhythmias during acute myocardial ischemia in rats. *Jpn Heart J* 1999; 40(1):79-86.
19. Dhein S, Gottwald M, Gottwald E, Hohlfeld T, Salameh A, Klaus W. Acetylsalicylic acid enhances arrhythmogeneity in a model of local ischemia of isolated rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 1997; 339(2-3):129-39.
20. Wainwright CL, Parratt JR. Failure of cyclo-oxygenase inhibition to protect against arrhythmias induced by ischaemia and reperfusion: implications for the role of prostaglandins as endogenous myocardial protective substances. *Cardiovasc Res* 1991; 25(2):93-100.
21. Flores, N.A., et al. Myocardial ischaemia induces platelet activation with adverse electrophysiological and arrhythmogenic effects. *Cardiovasc Res* 1994; 28(11): 1662-1671.
22. Aiello AE, Jabr RI, Cole WC. Arrhythmia and delayed recovery of cardiac action potential during reperfusion after ischemia. *Circ Res.* 1995;77:153-162
23. Hirsh J. Antiplatelet agents: their role in the prevention of sudden death. *Ann N Y Acad Sci.* 1982;382:289-304.
24. Gale CP, Manda SO, Batin PD, Weston CF, et al. Predictors of in-hospital mortality for patients admitted with ST-elevation myocardial infarction: a real-world study using the Myocardial Infarction National Audit Project (MINAP) database. *Heart.* 2008 Nov;94(11):1407-12.