

Protección miocárdica por estimulación vagal en la lesión por isquemia y reperfusión en ratones

Myocardial Protection by Vagal Stimulation in Ischemia-Reperfusion Injury in Mice

JAZMÍN KELLY¹, BRUNO BUCHHOLZ^{MTSAC, 1}, EDUARDO A. BERNATENÉ¹, NAHUEL MÉNDEZ DIODATI¹, VERÓNICA C. CASANOVA², ELIANA M. CICALÉ², RICARDO J. GELPI^{MTSAC, 1}

RESUMEN

Introducción: Previamente se demostraron beneficios de la estimulación vagal (EV) prolongada en el infarto de miocardio. No obstante, se desconocen los efectos y los mecanismos de protección cuando se aplica en forma selectiva y brevemente antes de la isquemia o al inicio de la reperfusión.

Objetivo: Estudiar si la EV en la reperfusión reduce el tamaño del infarto de manera similar a la EV preisquémica y si en ambas la protección está mediada por receptores muscarínicos o nicotínicos.

Material y métodos: En ratones FVB se realizó una isquemia miocárdica regional de 30 minutos y 2 horas de reperfusión sin EV (I/R), con EV preisquémica por 10 minutos (EVp), con EV preisquémica y bloqueo muscarínico con atropina y con EV preisquémica y bloqueo nicotínico α -7 con metilicaconitina. También se estudiaron los efectos de la EV al inicio de la reperfusión (EVr), con atropina y con metilicaconitina. Se cateterizó el ventrículo izquierdo para medir la función ventricular. Se midió el área de riesgo con azul de Evans y el área de infarto con cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio.

Resultados: La EVr redujo el tamaño del infarto de forma similar a la EVp, aunque los mecanismos de protección fueron diferentes. La EVp protegió a través de la activación colinérgica de los receptores muscarínicos. La EVr, en cambio, protegió por una vía colinérgica nicotínica α -7.

Conclusión: El presente estudio demuestra por primera vez en un modelo de isquemia y reperfusión miocárdica en ratones que una EV breve de 10 minutos es capaz de reducir de manera similar el tamaño del infarto, tanto cuando se aplica previo a la isquemia como en el inicio de la reperfusión, mimetizando de esta manera al preconditionamiento y al posconditionamiento isquémicos, respectivamente.

Palabras clave: Reperfusión miocárdica - Infarto - Isquemia - Nervio vago - Receptores muscarínicos - Receptores nicotínicos

ABSTRACT

Background: The beneficial effects of prolonged vagal stimulation (VS) applied during myocardial infarction have been previously demonstrated. However, the effects and mechanisms of protection are unknown when VS is applied selectively and briefly before ischemia or at the onset of reperfusion.

Objective: The aim of this study was to analyze whether VS applied during reperfusion is capable of reducing infarct size similarly to preischemic VS, and whether in both cases muscarinic or nicotinic receptors mediate the protection.

Methods: FVB mice were subjected to 30-minute regional myocardial ischemia and 2-hour reperfusion without VS (I/R); with 10 minutes preischemic VS (pVS), with pVS and muscarinic blockade by atropine and with pVS and α -7 nicotinic blockade by methyllycaconitine. The effects of VS at the onset of reperfusion (rVS) were also studied with atropine and with methyllycaconitine. A left ventricular catheter was used to measure ventricular function. Area at risk was measured using Evans blue and infarct size was assessed with 2,3,5-triphenyltetrazolium.

Results: Vagal stimulation during reperfusion reduced infarct size similarly to pVS, albeit with different mechanisms of protection. Preischemic VS protected the heart through cholinergic activation of muscarinic receptors, while rVS protection was effected through an α -7 cholinergic nicotinic pathway.

Conclusion: The present study demonstrated for the first time in an ischemia-reperfusion mice model that a brief 10-minute period of VS is able to similarly reduce infarct size when it is applied prior to ischemia or at the onset of reperfusion, mimicking ischemic preconditioning and postconditioning, respectively.

Key words: Myocardial Reperfusion - Infarction - Ischemia - Vagus Nerve - Receptors, Muscarinic - Nicotinic Acetylcholine Receptors

REV ARGENT CARDIOL 2017;85:7-13. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v85.i1.10218>

VÉASE CONTENIDO RELACIONADO: Rev Argent Cardiol 2017;85:4-6. <http://dx.doi.org/10.7775/rac.es.v85.i1.10379>

Recibido: 10/01/2017 - Aceptado: 30/01/2017

Dirección para separatas: Ricardo J. Gelpi - Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires - J. E. Uruburu 950 - 2° Piso - (C1114AAD) Buenos Aires, Argentina - e-mail: rgelpi@fmed.uba.ar

^{MTSAC} Miembro Titular de la Sociedad Argentina de Cardiología

¹ Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Departamento de Patología, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires e Instituto de Bioquímica y Medicina Molecular (IBIMOL) UE UBA-CONICET, Buenos Aires, Argentina

² Bioterio Central de la Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina

Abreviaturas

ACh	Acetilcolina	EVr+Atr	Estimulación vagal en la reperfusión con atropina
dP/dt_{máx}	Máxima derivada de la presión con respecto al tiempo	EVr+MLA	Estimulación vagal en la reperfusión con metilicaconitina
EV	Estimulación vagal	FC	Frecuencia cardíaca
EVp	Estimulación vagal preisquémica	I/R	Isquemia y reperfusión
EVp+Atr	Estimulación vagal preisquémica con atropina	MLA	Metilicaconitina
EVp+MLA	Estimulación vagal preisquémica con metilicaconitina	PDFVI	Presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo
EVr	Estimulación vagal en la reperfusión	PSVI	Presión sistólica del ventrículo izquierdo
		TTC	Cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio

INTRODUCCIÓN

La cardiopatía isquémica es una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en el mundo desarrollado. (1, 2) El tamaño del infarto y la hiperactividad simpática como producto del desequilibrio autonómico que acompañan a las enfermedades cardiovasculares son determinantes fundamentales en la evolución de los pacientes con cardiopatía isquémica. (3, 4) Para contrarrestar la hiperactividad simpática se utilizan bloqueantes de los receptores β -adrenérgicos; si bien mejoraron la evolución de los pacientes, la mortalidad sigue siendo elevada. (5) Es por ello que en los últimos años se ha intensificado la búsqueda de estrategias de protección a través del aumento del tono parasimpático. En este sentido, la electroestimulación vagal ha arrojado resultados alentadores a nivel experimental tanto en modelos de infarto agudo de miocardio (6, 7) como de insuficiencia cardíaca posisquémica. (8) Esta intervención se basa en la liberación de acetilcolina (ACh) por parte de las fibras posganglionares parasimpáticas de los plexos nerviosos cardíacos intrínsecos. (9) Es conocido que la ACh puede unirse tanto a receptores muscarínicos como nicotínicos, generando transducciones de señales intracelulares por distintas vías involucradas en respuestas fisiológicas o fisiopatológicas como la protección miocárdica. (10) Los receptores muscarínicos se encuentran generalmente asociados a la vía intracelular de protección Akt y GSK-3 β (glucógeno sintetasa quinasa 3- β). (11) Recientemente se demostró que una estimulación vagal (EV) aplicada de forma breve y con pulsos intermitentes previo a la isquemia, en un modelo de isquemia y reperfusión (I/R) miocárdica en conejos, fue capaz de proteger al miocardio, contrarrestando al sistema simpático y activando Akt-GSK-3 β por vía muscarínica. Por el contrario, la EV continua aumentó el tamaño del infarto por coactivación simpática, siendo este efecto posiblemente dependiente de la especie estudiada. (6) Por otro lado, es conocido que las intervenciones de protección en el comienzo de la reperfusión tienen un mayor potencial de aplicación clínica. (12) Sin embargo, no se han estudiado bien los efectos y potenciales mecanismos de protección de la EV aplicada selectivamente al inicio de la reperfusión. Por lo tanto, nuestro objetivo fue estudiar si la EV breve aplicada en forma selectiva antes de la isquemia o al inicio de la reperfusión es capaz de reducir el

tamaño del infarto y determinar la participación de los receptores colinérgicos muscarínicos y nicotínicos α -7 en la protección.

MATERIAL Y MÉTODOS

Isquemia y reperfusión miocárdica

Se utilizaron ratones FVB machos, los cuales fueron anestesiados por vía intraperitoneal con una dosis de inducción de 90 mg/kg de pentobarbital sódico y una dosis de mantenimiento de 5-10 mg/kg/h, según los requerimientos controlando los reflejos nerviosos superficiales. Luego, los animales fueron intubados y ventilados con aire ambiental y oxígeno. Además, se les controló la temperatura con un sistema de regulación conectado a una termocupla (TCAT-2AC Controller-Physitemp) para mantenerlos a 37 °C. Posterior a una estabilización, se realizó una incisión a la altura del cuarto espacio intercostal y se efectuó una isquemia regional por oclusión de la arteria coronaria descendente anterior con un hilo de polipropileno 8-0 (Prolene).

Estimulación vagal

En los animales que recibieron EV se disecó el nervio vago derecho a nivel cervical y se colocó un electrodo bipolar (MLA270 Stimulation Cable, AD Instruments) conectado a un neuroestimulador (Grass S44 Stimulator). Se estimuló aplicando parámetros de estimulación constantes, con pulsos eléctricos rectangulares de 0,1 ms, con una frecuencia de 10 Hz y una intensidad variable para reducir aproximadamente un 10% la frecuencia cardíaca (FC) basal. (6)

Mediciones hemodinámicas

Se realizó una incisión cervical media para diseccionar la arteria carótida derecha, a través de la cual se introdujo un catéter de columna de líquido (*fluid-filled*) hasta el ventrículo izquierdo. A través de un preamplificador y de un equipo (PowerLab) conectado a una computadora con el *software* correspondiente (LabChart) se midieron variables hemodinámicas: presión sistólica del ventrículo izquierdo (PSVI), $+dP/dt_{máx}$, $-dP/dt_{máx}$, presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo (PDFVI) y FC.

Protocolos experimentales (Figura 1)

1. *Isquemia y reperfusión (I/R)*: Luego de un período de estabilización, se realizó una isquemia miocárdica de 30 minutos seguida de 2 horas de reperfusión (*grupo control*).
2. *Estimulación vagal preisquémica (EVp)*: Se estimuló el nervio vago derecho durante 10 minutos, luego se dejó recuperar sin EV durante 5 minutos antes de realizar la I/R.
3. *Estimulación vagal preisquémica con atropina (EVp+Atr)*: Se estimuló el nervio vago derecho durante 10 minutos de manera similar al grupo anterior, pero además se ad-

ministró atropina por vía intravenosa durante la EV. Para ello se canuló la vena yugular y se administró la atropina en una dosis suficiente para bloquear el descenso de la FC. La isquemia se realizó 5 minutos luego de finalizada la EV de manera similar a los demás grupos.

4. **Estimulación vagal preisquémica con metilicaconitina (EVp+MLA):** Se estimuló el nervio vago derecho durante 10 minutos antes de la isquemia. Además se administró metilicaconitina (MLA), por vía intraperitoneal, 20 minutos antes de la EV. Luego se dejó recuperar sin EV durante 5 minutos antes de realizar la I/R.
5. **Estimulación vagal en la reperfusión (EVr):** Se estimuló el nervio vago derecho durante 10 minutos, comenzando al inicio de la reperfusión. Luego se realizó la I/R de manera similar al grupo I/R.
6. **Estimulación vagal en la reperfusión con atropina (EVr+Atr):** Se repitió el protocolo del grupo 5 pero se administró atropina por vía intravenosa durante la EV.
7. **Estimulación vagal en la reperfusión con metilicaconitina (EVr+MLA):** Se repitió el protocolo del grupo 6 con la diferencia que se administró MLA 20 minutos antes del inicio de la EV.

Medición del tamaño del infarto

Al finalizar la reperfusión, los animales fueron sacrificados con una sobredosis de anestésico para medir secuencialmente el área de riesgo y el tamaño del infarto. Para ello, se reocluyó la arteria coronaria descendente anterior y se canuló el segmento ascendente del cayado aórtico para infundirle al corazón una solución de azul de Evans al 1%. Luego, los corazones se extrajeron, congelaron y cortaron en secciones transversales de aproximadamente 2 mm de espesor desde la punta hasta la base. Inmediatamente, los cortes se incubaron en una solución de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (TTC) al 1% durante 20 minutos y posteriormente se fijaron en formaldehído al 10% durante 24 horas. Por último, se obtuvieron imágenes digitales de los corazones teñidos con azul de Evans y TTC con el objetivo de determinar el área de riesgo y el área infartada por medición planimétrica con el software Image-Pro Plus. El área de riesgo se expresó como porcentaje del área del ventrículo izquierdo y el tamaño del infarto se expresó como porcentaje del área de riesgo. (6)

Análisis estadístico

Los resultados se expresaron como la media aritmética y el error estándar de la media. Los valores hemodinámicos se analizaron comparando las distintas marcas dentro de cada grupo utilizando ANOVA para medidas repetidas seguido por

la prueba de Bonferroni. Los datos correspondientes al área de riesgo y tamaño del infarto se analizaron utilizando ANOVA de una vía seguido por la prueba de Bonferroni. Por último, se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0,05.

Consideraciones éticas

El protocolo experimental del presente proyecto fue aprobado por el Comité Institucional para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio de la Facultad de Medicina de la Universidad de Buenos Aires (Resol # 1857/15).

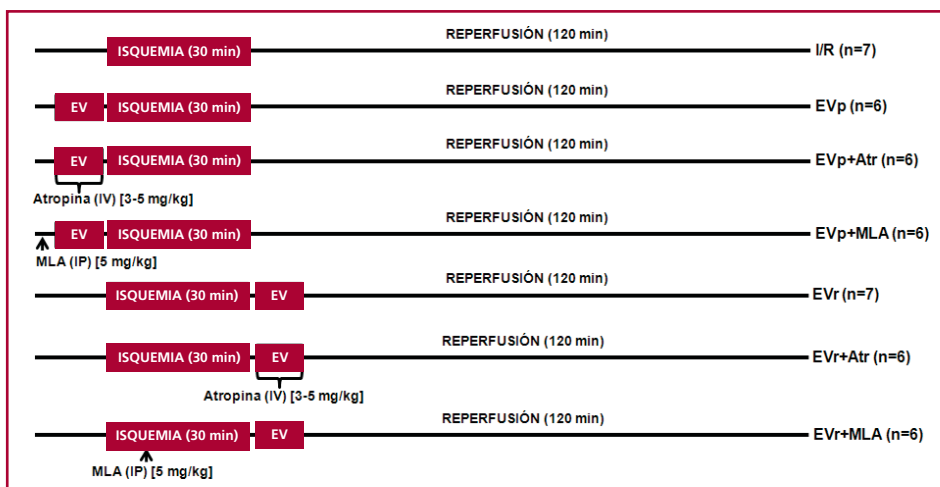
RESULTADOS

Efectos de la estimulación vagal sobre el tamaño del infarto

En la Figura 2 se muestran las áreas de riesgo y los tamaños del infarto de los grupos con EV previo a la isquemia. Como esperábamos, no se observan diferencias en las áreas de riesgo entre los grupos estudiados (*Panel A*) (I/R: 42,29% ± 2,66%; EVp: 45,00% ± 2,91; EVp+Atr: 45,67% ± 1,50% y EVp+MLA: 47,33% ± 3,13%) (p = ns). La EV preisquémica redujo el tamaño del infarto comparativamente con el grupo I/R (41,00% ± 3,14% vs. 58,29% ± 3,20%, respectivamente; p < 0,001) (*Panel B*). El efecto protector de la EV fue bloqueado con la administración de atropina (57,17% ± 1,74%) (p < 0,01 vs. EVp), pero no con la administración de MLA (41,33% ± 1,76%) (p < 0,001 vs. I/R; p = ns vs. EVp).

En la Figura 3 se muestran las áreas de riesgo y los tamaños del infarto de los grupos con EV en la reperfusión. Tampoco se observan diferencias en las áreas de riesgo entre los grupos estudiados (*Panel A*) (I/R: 42,29% ± 2,66%; EVr: 47,13% ± 2,77%; EVr+Atr: 43,50% ± 2,17%; 42,33% ± 3,66% y EVr+MLA: 41,40% ± 3,09%) (p = ns). La EV en la reperfusión redujo el tamaño del infarto comparativamente con el grupo I/R (39,29% ± 2,79% vs. 58,29% ± 3,20%, respectivamente; p < 0,001 vs. I/R) (*Panel B*). El efecto protector de la EV fue bloqueado con la administración de MLA (62,00% ± 2,53%; p < 0,001 vs. EVr), pero no con la administración de atropina (37,17% ± 1,82%) (p < 0,001 vs. I/R; p = ns vs. EVr).

Fig. 1. Representación esquemática de los protocolos experimentales. EV: Estimulación vagal. IV: Intravenoso. MLA: Metilicaconitina. IP: Intraperitoneal. I/R: Isquemia y reperfusión. EVp: Estimulación vagal preisquémica. EVp+Atr: Estimulación vagal preisquémica con atropina. EVp+MLA: Estimulación vagal preisquémica con metilicaconitina. EVr: Estimulación vagal en la reperfusión. EVr+Atr: Estimulación vagal en la reperfusión con atropina. EVr+MLA: Estimulación vagal en la reperfusión con metilicaconitina.



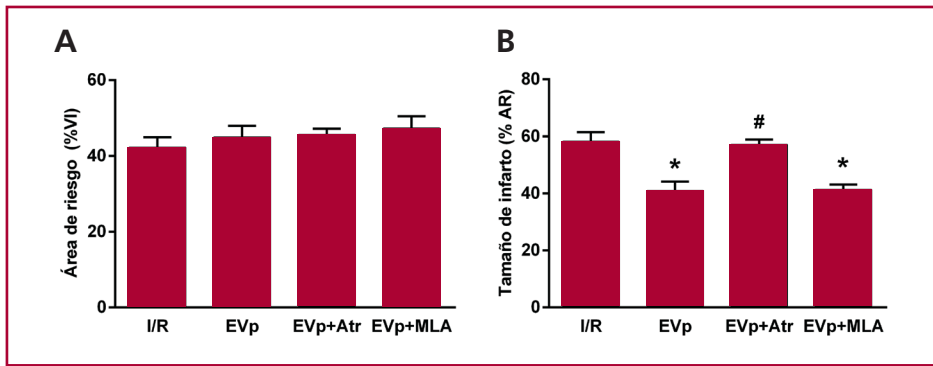


Fig. 2. Área de riesgo (Panel A) y tamaño del infarto (Panel B) de los grupos que recibieron estimulación vagal preisquémica. VI: Ventrículo izquierdo. AR: Área de riesgo. I/R: Isquemia y reperusión. EVp: Estimulación vagal preisquémica. EVp+Atr: Estimulación vagal preisquémica con atropina. EVp+MLA: Estimulación vagal preisquémica con metilicaconitina. Media \pm error estándar (* $p < 0,001$ vs. I/R; # $p < 0,01$ vs. EVp).

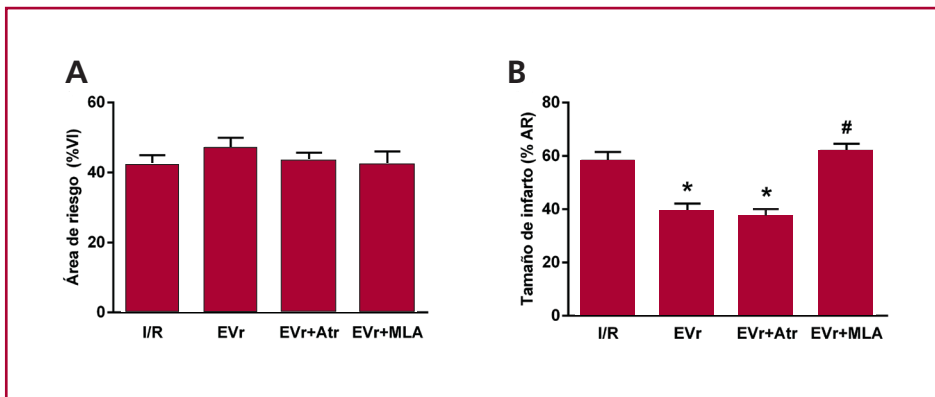


Fig. 3. Área de riesgo (Panel A) y tamaño del infarto (Panel B) de los grupos que recibieron estimulación vagal en la reperusión. VI: Ventrículo izquierdo. AR: Área de riesgo. I/R: Isquemia y reperusión. EVr: Estimulación vagal en la reperusión. EVr+Atr: Estimulación vagal en la reperusión con atropina. EVr+MLA: Estimulación vagal en la reperusión con metilicaconitina. Media \pm error estándar (* $p < 0,001$ vs. I/R; # $p < 0,001$ vs. EVr).

Efectos de la estimulación vagal sobre la función ventricular

En la Tabla 1 se detallan los datos de la función ventricular izquierda de los grupos I/R, EVp, EVp+Atr y EVp+MLA. No se observan diferencias significativas en los valores de FC, PSVI, PDFVI, $+dP/dT_{m\acute{a}x}$ y $-dP/dT_{m\acute{a}x}$ entre los grupos en condiciones basales. Se observa una reducción del 10% en la FC durante la EV en el grupo EVp y del 9% en el grupo EVp+MLA. La administración de atropina bloqueó el efecto de la estimulación del nervio vago sobre la FC. En todos los grupos durante la isquemia se observa un incremento de la PDFVI, que va acompañado de un descenso en la PSVI, la $+dP/dT_{m\acute{a}x}$ y la $-dP/dT_{m\acute{a}x}$. Estos valores no se recuperan de manera significativa durante la reperusión miocárdica, aun en los grupos con menor tamaño de infarto.

En la Tabla 2 se presentan los datos de la función ventricular izquierda de los grupos I/R, EVr, EVr+Atr y EVr+MLA. Similar a lo observado en la Tabla 1, no se encontraron diferencias significativas en los valores de PSVI, PDFVI, $+dP/dT_{m\acute{a}x}$, $-dP/dT_{m\acute{a}x}$ y FC entre los grupos en condiciones basales. Se observó una reducción de la FC en un 9% respecto del valor previo al inicio de la EV (30 minutos de isquemia) en los grupos EVr y EVr+MLA. La atropina bloqueó el descenso de la FC por parte de la EV. En todos los grupos se observó un aumento en la PDFVI, que fue acompañado de una reducción en la PSVI, la $+dP/dT_{m\acute{a}x}$ y la $-dP/dT_{m\acute{a}x}$

durante la isquemia. Estos valores no se recuperaron significativamente durante la reperusión en ninguno de los grupos.

DISCUSIÓN

El presente estudio demuestra por primera vez en un modelo de I/R miocárdica en ratones que una EV breve, de 10 minutos, es capaz de reducir de manera similar el tamaño del infarto tanto cuando se aplica previo a la isquemia como en el inicio de la reperusión, mimetizando de esta manera al preconditionamiento y al poscondicionamiento isquémicos, respectivamente. Sin embargo, a pesar de alcanzarse el mismo efecto protector, los mecanismos implicados difieren. En la EV preisquémica, el efecto protector se pierde con la administración de atropina. En cambio, la protección de la EV en la reperusión se pierde completamente con la administración del bloqueante de los receptores nicotínicos -7 MLA.

La capacidad de la ACh de proteger el miocardio por activación muscarínica de las vías del preconditionamiento isquémico fue bien demostrada por Downey y colaboradores en corazones aislados de conejos, (13) por nosotros con la EV intermitente en conejos *in vivo* (6) y ahora en roedores con la EV continua. Resulta interesante señalar que la EV continua aumentó del tamaño del infarto en el conejo (6) y lo redujo en el ratón. Es posible que

Tabla 1. Función ventricular y frecuencia cardíaca de los grupos que recibieron estimulación vagal preisquémica

Grupos		Basal	5 min Seg/EV	Pre-Isq	30 min Isq	5 min Rep	15 min Rep	120 min Rep
FC								
(lpm)	I/R	436 ± 16	440 ± 20	440 ± 17	458 ± 14	464 ± 10	458 ± 11	443 ± 26
	EVp	471 ± 10	419 ± 8	481 ± 6	476 ± 17	479 ± 18	486 ± 23 ^δ	523 ± 30 ^δ
	EVp+Atr	458 ± 10	500 ± 35	473 ± 17	489 ± 16	490 ± 17	486 ± 16	493 ± 30
	EVp+MLA	477 ± 20	437 ± 20	522 ± 24 ^{*δ}	530 ± 30 ^δ	541 ± 24 ^{*δ}	535 ± 11 ^{*δ}	554 ± 22 ^δ
PSVI								
(mm Hg)	I/R	93 ± 3	86 ± 2	89 ± 3	77 ± 5 [#]	81 ± 4	86 ± 5	87 ± 5
	EVp	92 ± 5	91 ± 6	96 ± 8	80 ± 3	82 ± 3	89 ± 4	82 ± 7
	EVp+Atr	93 ± 6	81 ± 6	87 ± 4	79 ± 4	82 ± 4	85 ± 5	72 ± 7 [#]
	EVp+MLA	107 ± 2	105 ± 5	97 ± 3	92 ± 4	93 ± 3	86 ± 4 ^{#δ}	90 ± 2 ^{#δ}
PDFVI								
(mm Hg)	I/R	3,6 ± 0,4	3,3 ± 0,4	3,4 ± 0,4	9,1 ± 1,3 ^δ	8,4 ± 1,5	7,6 ± 0,8	7,7 ± 1,7
	EVp	3,6 ± 0,5	5,4 ± 0,4 [*]	4,5 ± 0,9	11,2 ± 1,6 ^{#δ}	8,8 ± 1,3 [#]	9,3 ± 1,8	7,7 ± 2
	EVp+Atr	3,1 ± 0,4	3,4 ± 0,3	3,1 ± 0,2	9,7 ± 1 ^{#δ}	8,2 ± 0,8 ^{#δ}	7,3 ± 0,4 ^{#δ}	5,2 ± 0,8
	EVp+MLA	4 ± 0,6	5,8 ± 0,7 [*]	4,6 ± 0,3	9,3 ± 1,1 ^{#δ}	8,5 ± 0,9 [#]	6,9 ± 0,4	8 ± 1,1 [#]
+dP/dt _{max}								
(mm Hg/seg)	I/R	5.530 ± 175	5.139 ± 206	5.532 ± 204	4.608 ± 489	4.437 ± 321	5.136 ± 462	4.760 ± 525
	EVp	5.155 ± 495	5.058 ± 534	5.755 ± 539	4.423 ± 415	4.419 ± 344	5.049 ± 380	4.477 ± 596
	EVp+Atr	5.168 ± 503	4.535 ± 525	4.895 ± 519	4.553 ± 413	4.555 ± 444	4.832 ± 449	3.784 ± 582 [#]
	EVp+MLA	7.637 ± 388	7.357 ± 508 [*]	7.150 ± 283	6.669 ± 374 [*]	6.151 ± 342 [*]	5.975 ± 378	5.742 ± 283 ^{#δ}
-dP/dt _{max}								
(mm Hg/seg)	I/R	-5.281 ± 192	-4.572 ± 303	-4.864 ± 361	-3.735 ± 398 [#]	-4.044 ± 298 [#]	-4.311 ± 381	-4.052 ± 405 [#]
	EVp	-4.791 ± 472	-4.720 ± 461	-4.823 ± 448	-3.710 ± 314	-3.935 ± 340	-4.401 ± 326	-3.845 ± 573
	EVp+Atr	-4.913 ± 600	-3.905 ± 588	-4.437 ± 467	-3.739 ± 344	-3.984 ± 418	-4.118 ± 428	-3.212 ± 543 [#]
	EVp+MLA	-7.368 ± 253	-7.003 ± 426 [*]	-6.579 ± 327 [*]	-5.701 ± 424 ^{*#}	-5.916 ± 364 [*]	-5.352 ± 370 ^{#δ}	-5.270 ± 336 ^{#δ}

Seg: Seguimiento de la función ventricular. Isq: Isquemia. Rep: Reperusión. EV: Estimulación vagal. min: Minutos. seg: Segundos. FC: Frecuencia cardíaca. lpm: Latidos por minuto. PSVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo. PDFVI: Presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo. dP/dt: Derivada de la curva de presión ventricular izquierda. I/R: Isquemia y reperusión. EVp: Estimulación vagal preisquémica. EVp+Atr: Estimulación vagal preisquémica con atropina. EVp+MLA: Estimulación vagal preisquémica con metilcaconitina. Media ± error estándar (*p < 0,05 vs. I/R; #p < 0,05 vs. basal; δ < 0,05 vs. 5 min EV).

una diferencia en la inervación del corazón y el tono autonómico vagal entre el conejo y el ratón puedan explicar estos resultados contrapuestos.

El estudio de los mecanismos de protección aplicados antes de la isquemia es interesante científicamente, pero con la importante limitación de su potencial aplicación en los pacientes. Esto se debe a la dificultad que se tiene para predecir el momento exacto en el que ocurriría un evento coronario. En este sentido, una intervención realizada en el momento de la reperusión tiene una mayor relevancia clínica. Sin embargo, los trabajos que intentaron demostrar el efecto protector de la ACh administrada *in vitro* al corazón aislado no fueron concluyentes y los estudios *in vivo* son muy escasos. Recientemente, Uitterdijk y colaboradores demostraron que una EV de 20 minutos iniciada 5 minutos antes de la reperusión y finalizada a los 15 minutos de ella reduce el tamaño del infarto mediante un mecanismo antiinflamatorio en un modelo de I/R miocárdica en cerdos. (14) En cambio, Shinlapawittayatorn y colaboradores reportaron que la EV intermitente aplicada durante la reperusión fue incapaz de reducir el tamaño del infarto en la misma especie. (15) Ahora nosotros demostramos en el ratón que la EV continua

aplicada selectivamente al inicio de la reperusión reduce el infarto en un grado similar a la EV previa a la isquemia.

De manera interesante, los mecanismos de protección de los dos momentos de EV son diferentes. Si bien estos datos son llamativos, su fundamentación podría hallarse en las diferentes condiciones neuroendocrinas cardiovasculares que se encuentran luego de la isquemia miocárdica. En este sentido, es conocido que luego de 30 minutos de isquemia ocurre un daño en las terminales nerviosas vagales que conlleva una menor liberación de ACh por parte de dichas terminales. (9, 16) Por otro lado, en el corazón isquémico hay un aumento en los niveles de catecolaminas que producen a su vez una inhibición en la liberación de este neurotransmisor colinérgico parasimpático. (17) Por lo tanto, es posible que esta disminución en la biodisponibilidad de ACh cardíaca, al menos en la zona isquémica, no alcance el umbral de activación de los receptores muscarínicos durante la EV en la reperusión.

Recientemente, Dvorakova y colaboradores y Mazloom y colaboradores demostraron la existencia de receptores nicotínicos α-7 a nivel del sarcolema de los cardiomiocitos tanto auriculares como ventricu-

Tabla 2. Función ventricular y frecuencia cardíaca de los grupos que recibieron estimulación vagal en la reperusión

Grupos		Basal	30 min Isq	5 min Rep/EV	15 min Rep	120 min Rep
FC (lpm)	I/R	436 ± 16	458 ± 14	464 ± 10	458 ± 11	443 ± 26 ^δ
	EVr	467 ± 13	463 ± 27	420 ± 18	457 ± 19	508 ± 31
	EVr+Atr	478 ± 21	447 ± 32	460 ± 24	500 ± 13	510 ± 25
	EVr+MLA	425 ± 14	477 ± 17	437 ± 13	481 ± 12	515 ± 30 ^{#δ}
PSVI (mm Hg)	I/R	93 ± 3	77 ± 5 [#]	81 ± 4	86 ± 5	87 ± 5
	EVr	98 ± 5	80 ± 3 [#]	77 ± 2 [#]	84 ± 3 [#]	90 ± 4
	EVr+Atr	102 ± 4	70 ± 6 [#]	71 ± 5 [#]	87 ± 5 ^{#Δ}	82 ± 5 [#]
	EVr+MLA	98 ± 6	83 ± 5	83 ± 3	90 ± 4	85 ± 7
PDFVI (mm Hg)	I/R	3,6 ± 0,4	9,1 ± 1,3 [#]	8,4 ± 1,5	7,6 ± 0,8	7,7 ± 1,7
	EVr	4,5 ± 0,8	12,8 ± 1,8 [#]	9,3 ± 1,4	9,7 ± 1,9	7,6 ± 1,7
	EVr+Atr	3,3 ± 0,1	8,5 ± 0,5 [#]	5,3 ± 0,7	8,8 ± 0,9 ^{#δ}	5,8 ± 1,3
	EVr+MLA	5,1 ± 1	11,9 ± 1,2 [#]	9,4 ± 1,1 [#]	8,7 ± 1	6,3 ± 0,8 ^Δ
+dP/dt _{máx} (mm Hg/seg)	I/R	5.530 ± 175	4.608 ± 489	4.437 ± 321	5.136 ± 462	4.760 ± 525
	EVr	5.714 ± 183	4.434 ± 353 [#]	3.836 ± 318 [#]	4.798 ± 268	5.074 ± 277 ^δ
	EVr+Atr	6.722 ± 275	4.121 ± 680 [#]	4.037 ± 476 [#]	5.341 ± 564 [#]	4.896 ± 583 [#]
	EVr+MLA	6.183 ± 601	5.599 ± 547	5.206 ± 340	6.149 ± 439	5.276 ± 627
-dP/dt _{máx} (mm Hg/seg)	I/R	-5.281 ± 192	-3.735 ± 398 [#]	-4.044 ± 298 [#]	-4.311 ± 381 [#]	-4.052 ± 405 [#]
	EVr	-5.215 ± 241	-3.643 ± 240 [#]	-3.443 ± 129 [#]	-4.075 ± 207 [#]	-4.283 ± 223 ^{#□}
	EVr+Atr	-6.026 ± 371	-3.285 ± 574 [#]	-3.463 ± 434 [#]	-4.604 ± 416 ^{#Δ}	-4.220 ± 562 [#]
	EVr+MLA	-5.986 ± 596	-4.529 ± 448 [#]	-4.543 ± 336 [#]	-5.305 ± 387	-4.642 ± 595

Isq: Isquemia. Rep: Reperusión. EV: Estimulación vagal; min: Minutos. seg: Segundos; FC: Frecuencia cardíaca. lpm: Latidos por minuto. PSVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo. PDFVI: Presión de fin de diástole del ventrículo izquierdo. dP/dt: Derivada de la curva de presión ventricular izquierda. I/R: Isquemia y reperusión. EVr: Estimulación vagal en la reperusión. EVr+Atr: Estimulación vagal en la reperusión con atropina. EVr+MLA: Estimulación vagal en la reperusión con metilcaconitina. Media ± error estándar (*p < 0,05 vs. I/R; #p < 0,05 vs. basal; p < 0,05 vs. 30 min Isq; δ < 0,05 vs. 5 min Rep/EV).

lares en ratas. (18, 19) A su vez, en un trabajo de Li y colaboradores se demostró que hay una expresión compensadora de los receptores nicotínicos α -7 por sobre los receptores muscarínicos, luego de 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperusión en ventrículos de ratas. (20) Una mayor expresión de receptores nicotínicos α -7 también fue observada por Kong y colaboradores luego de 3 horas de isquemia en un modelo de infarto en ratas. (21) Este aumento de los receptores nicotínicos α -7 con la injuria miocárdica podría explicar su participación en la protección de la EV en la reperusión y no en la EV preisquémica. Los receptores nicotínicos α -7 han sido implicados en la protección frente a la injuria por I/R en otros tejidos como el cerebro, (22) pero no se había demostrado su participación local en la protección miocárdica.

Si bien otros autores demostraron beneficios de la EV sobre la función miocárdica, (23, 24) en nuestro modelo experimental no pudimos observar diferencias en la recuperación de la función ventricular izquierda en la reperusión, aun en aquellos grupos con menor tamaño de infarto. Aunque este no fue nuestro princi-

pal objetivo de estudio, es posible que la existencia de zonas de atontamiento miocárdico impida una buena recuperación de la función ventricular durante el período estudiado. (25)

CONCLUSIÓN

La EV realizada de forma breve y continua aplicada antes de la isquemia o al inicio de la reperusión reduce el tamaño del infarto de miocardio, mimetizando al precondicionamiento y al poscondicionamiento isquémico. No obstante, los mecanismos de protección difieren según el momento en el que se aplica la intervención. La EV preisquémica protege a través de la activación colinérgica de los receptores muscarínicos; en cambio, la EV en la reperusión reduce el tamaño del infarto mediante un mecanismo que involucra la activación colinérgica de los receptores nicotínicos α -7.

Declaración de conflicto de intereses

Los autores declaran que no poseen conflicto de intereses.

(Véanse formularios de conflicto de intereses de los autores en la web/ Material suplementario).

BIBLIOGRAFÍA

1. Kannel WB. Incidence and epidemiology of heart failure. *Heart Fail Rev* 2000;5:167-73. <http://doi.org/b6ncqr>
2. Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J Jr, et al. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* 1971;43:67-82. <http://doi.org/bzg4>
3. Wilson Pauwels L, Stewart PA, Akesson EJ. Autonomic nerve. Basic science, clinical aspects, case studies. Edit B. C. Decker Inc.; 1997. p. 1-240.
4. Armour JA. Myocardial ischaemia and the cardiac nervous system. *Cardiovasc Res* 1999;41:41-54. <http://doi.org/dqkx87>
5. Jondeau G, Milleron O. Beta-blockers in acute heart failure: do they cause harm? *JACC Heart Fail* 2015;3:654-6. <http://doi.org/bzg5>
6. Buchholz B, Donato M, Perez V, Deutsch AC, Höcht C, Del Mauro JS, et al. Changes in the loading conditions induced by vagal stimulation modify the myocardial infarct size through sympathetic-parasympathetic interactions. *Pflugers Arch* 2015;467:1509-22. <http://doi.org/bzg6>
7. Katare RG, Ando M, Kakinuma Y, Arikawa M, Yamasaki F, Sato T. Differential regulation of TNF receptors by vagal nerve stimulation protects heart against acute ischemic injury. *J Mol Cell Cardiol* 2010;49:234-44. <http://doi.org/fwmsc9>
8. Li M, Zheng C, Sato T, Kawada T, Sugimachi M, Sunagawa K. Vagal nerve stimulation markedly improves long-term survival after chronic heart failure in rats. *Circulation* 2004;110:120-4.
9. Kawada T, Akiyama T, Shimizu S, Kamiya A, Uemura K, Li M, et al. Detection of endogenous acetylcholine release during brief ischemia in the rabbit ventricle: a possible trigger for ischemic preconditioning. *Life Sci* 2009;85:597-601. <http://doi.org/fwdpjn>
10. Buchholz B. Anatomía funcional del sistema nervioso autónomo. En: Flores JC, editor. *Medicina del dolor: Perspectiva internacional*. Buenos Aires: Elsevier España, S.L.; 2014. p. 103-31.
11. Yellon D, Hausenloy DJ. Protección del corazón frente a la injuria por isquemia/reperfusión: rol del preconditionamiento y poscondicionamiento isquémico. En: Gelpi RJ, Donato M, editores. *Fisiopatología cardiovascular. Bases racionales para la terapéutica*. Buenos Aires: Corpus; 2010. p. 93-122.
12. Buchholz B, Donato M, D'Annunzio V, Gelpi RJ. Ischemic preconditioning: mechanisms, comorbidities, and clinical application. *Mol Cell Biochem* 2014;392:1-12. <http://doi.org/bzg7>
13. Qin Q, Downey JM, Cohen MV. Acetylcholine but not adenosine triggers preconditioning through PI3-kinase and a tyrosine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H727-34. <http://doi.org/bzg8>
14. Uitterdijk A, Yetgin T, te Lintel Hekkert M, Sneep S, Krabbendam-Peters I, van Beusekom HM, et al. Vagal nerve stimulation started just prior to reperfusion limits infarct size and no-reflow. *Basic Res Cardiol* 2015;110:508. <http://doi.org/bzg9>
15. Shinlapawittayatorn K, Chinda K, Palee S, Surinkaew S, Kumfu S, Kumphune S, et al. Vagus nerve stimulation initiated late during ischemia, but not reperfusion, exerts cardioprotection via amelioration of cardiac mitochondrial dysfunction. *Heart Rhythm* 2014;11:2278-87. <http://doi.org/bzhh>
16. Kawada T, Yamazaki T, Akiyama T, Mori H, Uemura K, Miyamoto T, et al. Disruption of vagal efferent axon and nerve terminal function in the postischemic myocardium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2002;283:H2687-H2691. <http://doi.org/bzhc>
17. Akiya T, Yamazaki T. Adrenergic inhibition of endogenous acetylcholine release on postganglionic cardiac vagal nerve terminals. *Cardiovasc Res* 2000;46:531-8. <http://doi.org/dpfcqc>
18. Dvorakova M, Lips KS, Brüggmann D, Slavikova J, Kuncova J, Kummer W. Developmental changes in the expression of nicotinic acetylcholine receptor α -subunits in the rat heart. *Cell Tissue Res* 2005;319:201-9. <http://doi.org/cf22gq>
19. Mazloom R, Eftekhari G, Rahimi M, Khori V, Hajizadeh S, Dehpour AR, et al. The role of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor in modulation of heart rate dynamics in endotoxemic rats. *PLoS One* 2013;8:e82251. <http://doi.org/bzhd>
20. Li DL, Liu BH, Sun L, Zhao M, He X, Yu XJ, et al. Alterations of muscarinic acetylcholine receptors-2, 4 and $\alpha 7$ -nicotinic acetylcholine receptor expression after ischaemia/reperfusion in the rat isolated heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2010;37:1114-9. <http://doi.org/br6vj2>
21. Kong SS, Liu JJ, Hwang TC, Yu XJ, Zhao M, Zhao M, et al. Optimizing the parameters of vagus nerve stimulation by uniform design in rats with acute myocardial infarction. *PLoS One* 2012;7:e42799. <http://doi.org/bzhh>
22. Marrero MB, Bencherif M. Convergence of alpha 7 nicotinic acetylcholine receptor-activated pathways for anti-apoptosis and anti-inflammation: central role for JAK2 activation of STAT3 and NF-kB. *Brain Res* 2009;1256:1-7. <http://doi.org/fdxt39>
23. Shinlapawittayatorn K, Chinda K, Palee S, Surinkaew S, Thunsiri K, Weerateerangkul P, et al. Low-amplitude, left vagus nerve stimulation significantly attenuates ventricular dysfunction and infarct size through prevention of mitochondrial dysfunction during acute ischemia-reperfusion injury. *Heart Rhythm* 2013;10:1700-7. <http://doi.org/bzhh>
24. Zhao M, He X, Bi XY, Yu XJ, Gil Wier W, Zang WJ. Vagal stimulation triggers peripheral vascular protection through the cholinergic anti-inflammatory pathway in a rat model of myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Res Cardiol* 2013;108:345. <http://doi.org/bzhh>
25. Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975;56:978-85. <http://doi.org/b3n7h9>