

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

CARDIOPLEJIA REGIONAL SELECTIVA
MEDIANTE LA INFUSION INTRACORONARIA
DE 2,3 BUTANODIONA MONOXIMA

TESIS DOCTORAL

Elena Esteban Paúl

Septiembre 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

DEPARTAMENTO DE MEDICINA

TESIS DOCTORAL

"CARDIOPLEGIA REGIONAL SELECTIVA MEDIANTE LA
INFUSION INTRACORONARIA DE 2,3 BUTANODIONA MONOXIMA"

realizada por:

ELENA ESTEBAN PAUL

DIRECTOR:

D. DAVID GARCIA-DORADO GARCIA

Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid.

TUTOR:

D. PEDRO ZARCO GUTIERREZ

Catedrático de Cardiología del Departamento de Medicina Interna de la Facultad de
Medicina de la Universidad Complutense de Madrid.

SEPTIEMBRE, 1994

INFORME DEL DIRECTOR DE LA TESIS

EL trabajo experimental en el que se basa la presente tesis ha sido diseñado bajo mi dirección y realizado con rigor metodológico por la doctoranda. El análisis estadístico de los datos ha sido supervisado por mí y los resultados obtenidos constituyen una evidencia sólida, justifican plenamente las conclusiones y responden a los objetivos propuestos. Todo ello se refleja claramente en la memoria redactada, que reúne los requisitos para ser presentada y defendida.

V.º B.º
EL TUTOR (2)

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: _____

2474536

El Director de la Tesis

Fdo.: _____

(fecha y firma)

D.N.I.: _____

DAVID GARCIA-DORADO

1397791

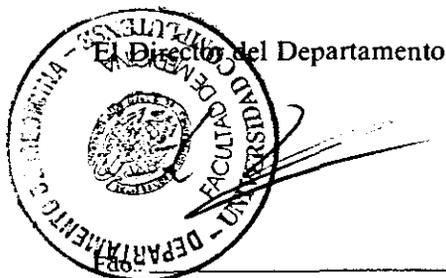
INFORME DEL CONSEJO DE DEPARTAMENTO

Prof. Dr. Carlos Perezagua Clamagirand, Director del Departamento de Medicina de la Facultad de Medicina de la UCM

Informa: que una vez examinado el Trabajo presentado por Dña. Elena Esteban Paul, titulado: "CARDIOPLEJIA REGIONAL SELECTIVA MEDIANTE LA INFUSION INTRACORONARIA DE 2,3 BUTANODIOMA MONOXIMA", dirigido por D. David García-Dorado y tutelada por el Prof. Dr. Pedro Zarco Gutiérrez, este Departamento da su conformidad para que dicho trabajo sea leído y defendido en público con vistas a su aprobación como Tesis Doctoral.

Fecha reunión
Consejo Departamento

21-6-1994



(fecha y firma)

13-9-1994

El trabajo experimental en que se basa esta tesis doctoral ha sido realizado en el Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Gregorio Marañón de Madrid.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. David García-Dorado, por haber aceptado dirigir esta tesis, y por su continua ayuda y amistad, sin cuya dedicación no hubiera sido posible la realización de este trabajo.

Al Dr. Pedro Zarco, por haber aceptado ser tutor de esta tesis y por su continua colaboración.

Al Dr Pierre Théroux, por su decisiva intervención en el diseño del experimento y en la interpretación de los resultados.

A mis compañeros y amigos Joaquín Alonso, Javier Botas, Juan Manuel Durán, Jaime Elízaga, Francisco Fernández-Avilés, Roberto Muñoz y Javier Soriano, por su decisiva colaboración en la preparación y realización experimental.

Al personal del quirófano y del laboratorio del Pabellón de Medicina y Cirugía Experimental, por su inestimable ayuda.

A Juan Angel Esteban y a Enrique Teigell por su eficaz colaboración en la realización de esta memoria.

A mis padres

A Enrique

INDICE

INDICE

I. INTRODUCCION.	1
1.- ISQUEMIA MIOCARDICA.	4
1.1. Distribución del flujo coronario.	4
1.2. Modelo de oclusión coronaria "in situ". Factores determinantes del daño isquémico.	5
1.3. Efectos metabólicos de la isquemia.	10
1.4. Desarrollo temporal del daño isquémico.	12
1.5. Alteraciones iónicas y del equilibrio ácido/base. Edema osmótico.	15
1.6. Transtornos de la función contráctil.	18
1.7. Alteraciones de las propiedades electrofisiológicas.	20
1.8. Fragilidad osmótica. Teoría del daño del citoesqueleto.	21
2.- REPERFUSION MIOCARDICA.	25
2.1. Paradoja del calcio.	28
2.2. Paradoja del oxígeno.	30
2.3. Sobrecarga de calcio en la reperfusión.	31
2.4. Factores mecánicos:	33
2.4.1. Cambios en la presión osmótica y en el pH. Edema osmótico.	34
2.4.2. Hipercontractura. Interacción intercelular.	37
2.5. Lesión por radicales libres derivados del oxígeno.	41
2.6. Evolución del daño miocárdico tras la reperfusión.	43

2.7. Arritmias de reperfusión.	46
2.8. Disfunción contráctil postisquémica: miocardio aturdido.	48
2.9. Precondicionamiento isquémico.	49
3.- ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS.	51
3.1. Estrategias terapéuticas para disminuir el daño isquémico.	51
3.2. Estrategias terapéuticas para prevenir el daño por reperfusión.	53
3.3. Utilidad de la inhibición de la contractilidad en la prevención del daño miocárdico por isquemia y reperfusión.	55
II. OBJETIVOS.	58
III. MATERIAL Y METODOS.	61
1.-MODELO EXPERIMENTAL.	62
1.1. Animales.	62
1.2. Procedimiento quirúrgico.	62
1.3. Instrumentación.	65
1.3.1. Colocación de catéteres para monitorización hemodinámica.	65
1.3.2. Cateterismo de la arteria coronaria descendente anterior.	65
1.3.3. Implantación de cristales piezoeléctricos.	68

2.-MONITORIZACION.	68
2.1.Hemodinámica y electrocardiográfica.	68
2.2.Contracción segmentaria: cristales piezoeléctricos.	71
3.-SOLUCIONES PARA INFUSION INTRACORONARIA.	78
4.-PROTOCOLO DE ESTUDIO.	81
4.1.Efecto de la infusión intracoronaria sin isquemia.	84
4.1.1.Estudio del efecto del calcio extracelular sobre la contracción segmentaria.	84
4.1.2.Estudio del efecto de la infusión de BDM sobre la contracción segmentaria.	84
4.1.3.Estudio del efecto de la interacción entre el calcio extracelular y la BDM sobre la contracción segmentaria.	85
4.2.Efecto de la oclusión coronaria transitoria sobre la contracción segmentaria.	85
4.3.Efecto de la infusión intracoronaria durante la isquemia y la reperfusión.	86
5.-ANALISIS ESTADISTICO.	86
IV. RESULTADOS.	88
1.-EFECTO DE LA INFUSION INTRACORONARIA SIN ISQUEMIA.	89

1.1. Estudio del efecto del calcio extracelular sobre la contracción segmentaria.	89
1.2. Estudio del efecto de la infusión de BDM sobre la contracción segmentaria.	97
1.3. Estudio del efecto de la interacción entre el calcio extracelular y la BDM sobre la contracción segmentaria.	105
2.-EFECTO DE LA OCLUSIÓN CORONARIA.	109
3.-EFECTO DE LA INFUSIÓN INTRACORONARIA DURANTE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSIÓN.	114
V. DISCUSIÓN.	123
1.- ESTUDIOS PREVIOS SOBRE PROTECCIÓN MIOCARDICA.	125
1.1. Fibrilación ventricular.	127
1.2. Hipotermia.	129
1.3. Agentes farmacológicos con acción inotropa negativa.	139
1.3.1. Potasio.	139
1.3.2. Betabloqueantes.	146
1.3.3. Antagonistas del calcio y soluciones con concentraciones variables de calcio.	148
1.3.4. Etanol.	154
1.3.5. Otros agentes con acción inotropa negativa.	155
1.4. Preservación miocárdica para trasplante cardíaco.	157

2.- ESTUDIOS CON BDM.	159
2.1. Antecedentes. Modelos experimentales.	159
2.2. Efecto de la BDM sobre el tejido muscular.	
Propiedades farmacológicas.	161
2.2.1. Acción sobre la contractilidad.	162
2.2.2. Acción sobre las propiedades electrofisiológicas.	171
2.2.3. Relación dosis-efecto de la BDM. Importancia de la concentración de BDM.	172
2.3. Efecto de la BDM durante la isquemia y la reperfusión.	173
2.4. Otras posibles aplicaciones de la protección miocárdica con BDM.	179
3.- ORIGINALIDAD DE ESTE ESTUDIO. IMPLICACIONES CLINICAS.	182
4.- CONSIDERACIONES METODOLOGICAS.	184
VI. CONCLUSIONES.	186
VII. BIBLIOGRAFIA.	189

I. INTRODUCCION

I. INTRODUCCION

La utilización de agentes trombolíticos y, más recientemente, el desarrollo de las técnicas de angioplastia, han permitido una amplia difusión de la terapéutica de reperfusión en pacientes con infarto de miocardio. Esto ha motivado un aumento del interés por los procesos subyacentes a la lesión isquémica en el miocardio y las consecuencias de la reperfusión.

Existen diversos estudios que han demostrado que la reperfusión es capaz de disminuir la extensión del área necrótica de un infarto de miocardio en evolución, mejorar la función ventricular izquierda y prolongar la supervivencia de los pacientes con infarto agudo de miocardio (1-6).

No obstante, existen datos cada vez más sólidos que sugieren que la reperfusión puede causar daño, poniendo en peligro miocardio potencialmente salvable (3, 6-11). Así, la eficacia de la reperfusión en cada caso correspondería al balance final entre sus efectos beneficiosos y los nocivos. Nayler y colaboradores (7) popularizaron el concepto de "daño por reperfusión", que se refiere al daño o muerte celular causados por la reperfusión, en contraste con el daño o la muerte celular causados por el episodio isquémico previo. En este sentido, la expresión "daño por reperfusión" se empleaba para describir la muerte explosiva durante la reperfusión de miocitos severamente isquémicos pero aparentemente intactos (7, 12-14), lo cual

englobaría dos fenómenos muy diferentes: a) la aceleración de la lisis de miocitos ya muertos, que se podría denominar "lisis postreperusión", y b) la muerte de miocitos todavía viables. Aunque existen pruebas concluyentes de la existencia del primer fenómeno, la existencia de lo que se podría llamar "necrosis postreperusión" no ha podido ser confirmada con los métodos actualmente disponibles (15) y no es universalmente aceptada (1, 3, 8, 12, 14, 16, 17). Sin embargo, observaciones recientes (13, 16, 18) han hecho que la discusión se centre ahora más en la importancia relativa de la necrosis postreperusión que en su existencia, y se admite que el éxito de las intervenciones farmacológicas y mecánicas como la trombolisis o la ACTP durante el infarto de miocardio puede estar limitado por la posibilidad de daño por reperusión (2, 9, 10, 16, 19).

Frecuentemente, el término "daño por reperusión" es empleado, también, para englobar algunos hechos que ocurren durante la reperusión del miocardio isquémico, como la disfunción contráctil (aturdimiento miocárdico), las arritmias de reperusión y el daño vascular (fenómeno de "no reflujo") (8, 11, 15).

El miocardio isquémico no puede recuperarse a menos que se restablezca la perfusión. La razón por la que la reperusión causa la recuperación de unos miocitos "reversiblemente dañados" y la destrucción de otros con "daño irreversible" no es bien conocida. Jennings y cols (1, 14) describieron que el daño irreversible se asociaba a detención del metabolismo anaerobio y marcado descenso de los niveles de ATP, junto a cambios estructurales en la mitocondria y en el sarcolema.

La valoración del daño por reperfusión ha sido objeto de numerosos estudios experimentales, fundamentalmente en miocitos aislados o en corazones aislados que son reperfundidos tras períodos prolongados de isquemia global en situación de normotermia (13, 20-25). Bajo estas condiciones, "in vitro", la cuantificación del daño adicional asociado a la reperfusión es relativamente fácil (7). Liberación de enzimas intracelulares y de otras macromoléculas, cambios estructurales, aumentos mantenidos de la tensión telediastólica de reposo, incremento del contenido de calcio y agua de los tejidos y defectos en la eliminación extracelular de marcadores y tintes son algunos de los índices que se han empleado (7, 14, 21, 23, 24). Por el contrario, la detección y cuantificación del daño asociado con la reperfusión "in vivo" es difícil (14, 26). Deben considerarse muchos factores, como la cantidad de circulación colateral existente, los cambios hemodinámicos que afectan a la circulación periférica, la localización precisa o el tamaño del infarto. Incluso si todos estos factores son controlados, la valoración adecuada del daño adicional debido a la reperfusión es complicada, ya que depende de la identificación cuantitativa de las células que han sido dañadas como consecuencia directa de la reperfusión (7, 9, 14).

1.- ISQUEMIA MIOCARDICA

1.1. Distribución del flujo coronario.

El miocardio depende fundamentalmente del metabolismo aerobio y, en consecuencia, de una vascularización abundante. Cada célula miocárdica está en estrecho contacto con 2-4 capilares. El flujo coronario normal es de 0.7-0.9 ml/gr/min y la liberación de oxígeno de 0.1 ml/gr/min. Normalmente el corazón extrae

aproximadamente el 75% del oxígeno (pudiendo aumentarse la extracción hasta el 100%) y las modificaciones en la demanda metabólica se ajustan en gran medida por aumentos o disminuciones en el flujo sanguíneo coronario. El flujo coronario se distribuye fundamentalmente en la diástole, puesto que la contracción sistólica aumenta la resistencia vascular intramiocárdica. Además, durante la sístole, la presión hística a nivel del miocardio subendocárdico se aproxima a la presión que existe en el interior del miocardio ventricular izquierdo, lo cual produce compresión capilar e interrupción de la perfusión en la zona más interna. Por otra parte, la presión hística es más baja en la zona subepicárdica, de forma que esta zona recibe sangre tanto en sístole como en diástole. En el miocardio no isquémico esta diferencia física está compensada con un cortocircuito preferencial de sangre hacia la pared interna del ventrículo izquierdo durante la diástole. Los vasos que irrigan esta zona se dilatan, de forma que la perfusión global es similar en todas las regiones del miocardio ventricular izquierdo (14, 18, 27, 28).

1.2. Modelo de oclusión coronaria "in situ". Factores determinantes del daño isquémico.

Cuando tiene lugar una oclusión coronaria se produce isquemia de la zona dependiente de la arteria ocluida, pero el flujo coronario tiende a alcanzar la región isquémica a través de anastómosis colaterales. En el modelo canino (y también en el hombre cuando su circulación colateral se encuentra desarrollada) estas conexiones se localizan sobre todo en la región epicárdica y subepicárdica del ventrículo izquierdo y desde allí perfunden las zonas más profundas del miocardio por medio de las arterias musculares perforantes. Debido al aumento de la tensión intramiocárdica durante la

sístole, existe un gradiente transmural en el flujo colateral que limita más la perfusión del subendocardio en relación al subepicardio. Reimer y cols en su modelo en perros con oclusión coronaria de la arteria circunfleja, observaron una disminución del flujo subendocárdico hasta el 3% durante la isquemia, mientras que el flujo epicárdico se mantuvo en un 17% del basal (18, 27). También en el hombre pueden existir, en determinadas circunstancias, anastómosis colaterales entre los vasos subepicárdicos, siendo también su miocardio subendocárdico más vulnerable ante el daño isquémico.

La interrupción brusca del flujo en la arteria coronaria delimita, en las especies de laboratorio y en el hombre, una zona de isquemia de espesor transmural que se denomina área en riesgo anatómica o simplemente área en riesgo (1). Hoy se sabe que los límites de esta zona son perfectamente nítidos, aunque anfractuosos, debido a que no existen interconexiones entre los lechos capilares adyacentes (5, 18, 29).

El tamaño de la necrosis determina tanto la mortalidad como la morbilidad de los pacientes tras un infarto agudo de miocardio (18). Los experimentos con oclusión coronaria transitoria realizados en diversos modelos animales han demostrado que la cantidad de miocardio salvado depende fundamentalmente de: la duración del período de isquemia (1, 11, 30, 31), el flujo residual a la zona isquémica (1, 18, 26, 31), las condiciones hemodinámicas durante la oclusión coronaria (1, 26, 31), las condiciones previas a la oclusión (16, 32-35) y las condiciones en las que se realiza la reperfusión (9, 36-42).

La duración del período de isquemia es el principal determinante de la extensión del área de necrosis postreperusión. A medida que se retrasa la reinstauración del flujo al territorio isquémico, el área necrótica se va extendiendo de endocardio a epicardio, en forma de un frente de onda (18, 30). Jennings y cols (1, 18) en su modelo de oclusión coronaria en perros, evaluaron la cantidad de miocardio "recuperable" por la reperusión en relación con la duración del episodio isquémico. Durante los primeros 15 minutos todo el territorio es recuperable y no se produciría necrosis postreperusión, tras 40 minutos de oclusión coronaria sería recuperable el 60-70% de lo que supondría el infarto completo tras oclusión permanente, y después de 3-6 horas de isquemia sólo sería recuperable el 10%. En otro estudio realizado en perros, con oclusión coronaria de la arteria descendente anterior durante períodos de 2 y 4 horas seguidos de reperusión durante un mes, los autores observaron recuperación contráctil en los que tuvieron oclusión durante 2 horas, y persistencia de la disfunción sistólica tras un mes de reperusión en los sometidos a oclusión coronaria durante 4 horas (43).

Sin embargo, se observan algunas discrepancias en los resultados de los estudios sobre el daño isquémico realizados por los distintos grupos, en gran medida relacionadas con diferencias entre los principales modelos experimentales empleados, fundamentalmente en la cantidad de circulación colateral existente, que determina el flujo residual a la zona isquémica (5, 26, 29, 44, 45). El desarrollo de circulación colateral varía mucho entre las distintas especies (5) estando prácticamente ausente en el cerdo (29) y siendo generalmente importante en el perro (26). Como consecuencia de ello, en el modelo experimental canino, caracterizado por su abundante circulación colateral, la reperusión tras oclusión coronaria de 2-3 horas permite salvar

cantidades apreciables de miocardio (5, 18, 26). Reimer, Jennings y cols describieron en su modelo canino con oclusión coronaria de la arteria circunfleja (18), que tras 40 minutos de oclusión coronaria se apreciaba una necrosis del miocardio subendocárdico, mientras que gran parte del subepicardio era aún viable si se restablecía la perfusión. Después de 3 horas de oclusión coronaria aún persistía músculo viable en el subepicardio, y la perfusión en este período logró disminuir el tamaño del infarto. Sin embargo, tras 6 horas de oclusión coronaria los infartos reperfundidos eran sólo ligeramente menores que los permanentes. Los autores describieron que la extensión de la necrosis transmural se relacionaba inversamente con el flujo colateral al subepicardio en oclusiones de 3 y 6 horas, resultando infartos transmurales tras 3 horas de oclusión en ausencia de circulación colateral significativa, y después de 6 horas en presencia de ésta.

Por el contrario, en el cerdo, cuya circulación colateral es prácticamente inexistente, cuando una oclusión coronaria se prolonga por encima de los 45 minutos provoca un crecimiento exponencial del área infartada, que alcanza tras 90 minutos de oclusión coronaria el 75% del producido con oclusiones permanentes (30, 44). Miyazaki y cols en un modelo porcino tras oclusión coronaria de una hora objetivaron infarto transmural, 2/3 del cual se encontraba ocupado con necrosis en bandas de contracción, y tras 2 horas de oclusión coronaria el tamaño del infarto fue similar al que producía la oclusión permanente de la arteria (47).

La circulación colateral es escasa en el hombre sano, pero puede estar muy desarrollada en pacientes con cardiopatía isquémica crónica, presentando en este caso características fisiopatológicas especiales (45). Sin embargo, aproximadamente

el 50% de los pacientes presentan un infarto de miocardio como la primera manifestación de su enfermedad coronaria (48).

Las condiciones hemodinámicas durante el período de oclusión pueden modificar la evolución del daño isquémico; así el flujo colateral disminuye en la hipotensión arterial secundaria a arritmias o fallo contráctil, o en situaciones en que la presión telediastólica del ventrículo izquierdo se eleve por encima de la presión de perfusión tisular (1). Se ha demostrado que la hipertensión arterial incrementa el tamaño del infarto en un modelo experimental sin circulación colateral (5, 31). Opie y cols describieron que el aumento de la frecuencia cardíaca se acompañaba de aumento de la severidad del daño isquémico y mayor incidencia de arritmias de reperfusión (11).

Muchos autores han sugerido que las condiciones en las que se realiza la reperfusión (temperatura, pH, concentración de calcio, presencia de leucocitos o agentes anti-radicales libres) pueden modificar el tamaño del infarto (9, 36-42). La importancia terapéutica de este aspecto, que será tratado en las páginas siguientes, se ve potenciada por la dificultad de actuar sobre los factores anteriormente descritos, como la cantidad de circulación colateral o la duración de la isquemia en pacientes con infarto de miocardio. Las estrategias para acelerar la llegada al hospital de estos pacientes o para administrarles el tratamiento trombolítico antes de la misma implican un coste elevado y no han logrado reducciones importantes de la duración de la isquemia (5, 48).

La importancia de las condiciones previas a la oclusión coronaria ha sido reconsiderada muy recientemente. Los períodos breves y repetidos de isquemia

miocárdica tienen un paradójico efecto protector frente a un período ulterior de isquemia prolongada y, especialmente, respecto al tamaño del infarto (11, 32-35).

Desde el punto de vista clínico existen otras circunstancias, además del infarto de miocardio, en las cuales el control del daño por reperfusión adquiere especial importancia, como en la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea y en la preservación del corazón para trasplante (28, 49-52).

1.3. Efectos metabólicos de la isquemia.

Se puede definir la isquemia miocárdica como aquella situación en la que la perfusión sanguínea del miocardio resulta insuficiente para mantener la pO_2 intramitocondrial necesaria para la reposición, mediante fosforilación oxidativa, de los enlaces fosfato de alta energía consumidos por el metabolismo celular (5, 14). Independientemente de la causa que lo motiva (trombosis, espasmo o embolismo), la reducción masiva y súbita o el cese del flujo sanguíneo tienen dos consecuencias inmediatas sobre el miocardio correspondiente: la reducción en el aporte de oxígeno y sustratos para el metabolismo y el acúmulo de productos del metabolismo (7, 53).

Tras la instauración de la isquemia se produce el paso del metabolismo aerobio al anaerobio, lo que conlleva un acúmulo de protones, lactato y fosfato inorgánico (5, 7, 14, 54, 55). Estos hechos se producen rápidamente y el cambio de glucólisis aerobia a anaerobia ocurre unos segundos (15-30 seg) después del inicio de la isquemia (56, 14).

La interrupción brusca del aporte de oxígeno produce en escasos segundos la saturación del sistema transportador de electrones en las mitocondrias, la disminución o detención de la betaoxidación de los ácidos grasos y del ciclo de los ácidos tricarboxílicos y una disminución marcada de la producción mitocondrial de ATP. Inmediatamente se pone en marcha la glucólisis anaerobia y se activa la glucogenólisis, por acción fundamentalmente del AMPc a través de un aumento de la actividad de la enzima fosfopiruvato-cinasa (5, 14).

El aumento de la glucólisis anaerobia, que llega a multiplicar por 20 su actividad durante el primer minuto de estado anaerobio, da lugar a un gran aumento de la producción de piruvato y lactato (5, 14). A pesar de la disminución de la producción de ATP desde los primeros segundos del estado anaerobio, su concentración citoplasmática se mantiene durante un corto período gracias a la refosforilación del adenosín-difosfato (ADP), que se va produciendo mediante la utilización del radical fosfato (P) del creatín-fosfato en una reacción catalizada por la creatín-cinasa (CK). El consumo de creatín-fosfato en esta reacción es muy rápido y en menos de 3 minutos la concentración puede llegar a ser inferior al 20% de la normal (5, 55).

La glucólisis anaerobia puede dar lugar únicamente a una cantidad limitada de ATP, produciendo 3 moléculas por unidad glicosilada de glucógeno convertido en lactato, en comparación con las 38 moléculas de ATP producidas por el metabolismo aerobio de la glucosa para formar dióxido de carbono y agua (1, 27). Así pues, se produce una pérdida progresiva de las reservas intracelulares de ATP (que disminuye hasta un 35% de los valores basales tras 15 minutos de isquemia y hasta menos del 10% después de 40 minutos de isquemia) a pesar de que la utilización de

fosfatos de alta energía para la actividad contráctil queda muy disminuida o completamente interrumpida (14, 27). El adenosín-difosfato hístico (ADP) aumenta marcadamente cuando se instaura la isquemia, pero disminuye posteriormente a medida que el miocito utiliza la adenilato-ciclasa para capturar el fosfato de alta energía de la molécula de ADP. El adenosín-monofosfato (AMP) producido se defosforiliza para dar lugar al nucleótido adenosina que puede difundir desde el miocito al espacio extracelular. La adenosina se degrada posteriormente a inosina (tanto en el interior como en el exterior del miocito). Finalmente, se acumulan los productos del catabolismo posterior como protones, hipoxantina y xantina (5, 14, 27). La aparición en plasma de enzimas (creatínquinasa, succinatodeshidrogenasa, aspartatoaminotrasferasa) y otras sustancias de origen intracelular (mioglobina, inosina o hipoxantina) permite valorar la severidad y extensión del daño isquémico (53).

1.4. Desarrollo temporal del daño isquémico

Describiremos a continuación la secuencia de producción del daño isquémico, que en general se ha referido casi siempre en la literatura al modelo canino (7, 14, 27). Tras un período de isquemia severa de pocos minutos, las imágenes ultraestructurales muestran miocitos hinchados (tras 2 ó 3 minutos de isquemia). Se produce un incremento en el tamaño relativo de las células y en el grado de claridad del espacio sarcoplásmico (14, 27). Tras 15 minutos de isquemia se produce deplección de los gránulos de glucógeno, la cromatina del núcleo puede presentar agregación periférica, desaparecen los gránulos de la matriz mitocondrial y alguna mitocondria aparece hinchada. El sarcoplasma aparece más claro debido al edema intracelular y a la pérdida de glucógeno. Las miofibrillas están relajadas y presentan líneas N a cada

lado de las líneas Z. El plasmalema, no obstante, permanece intacto y la reperusión en este momento da lugar a la recuperación completa de la estructura, presentando las miofibrillas, la mayor parte de las mitocondrias, el núcleo y el sarcolema características indistinguibles del miocardio no isquémico, y tan sólo algunas mitocondrias muestran evidencia de lesión (14, 27).

La situación es diferente cuando el período isquémico es más prolongado. En un plazo de 30 ó 40 minutos desde el inicio de la isquemia severa, el dato mas importante desde el punto de vista ultraestructural es el acúmulo de fluido bajo el sarcolema. La sobrecarga osmótica de la isquemia produce edema de los miocitos que contribuye a la disrupción y lesión de las membranas (14, 27). El plasmalema permanece aún aparentemente intacto y es capaz de retener enzimas intracelulares, pero muestra algunos cambios incipientes (7).

Si el período de isquemia se prolonga más de 40 minutos aparecen progresivamente cambios más marcados en la morfología celular y ya es posible detectar algunas roturas focales del plasmalema mediante microscopía electrónica de alta resolución. La lesión queda documentada por un aumento importante en el espacio de difusión de la inulina, indicativo de un aumento de la permeabilidad (14, 27).

Si la isquemia se prolonga por encima de los 60 minutos, a medida que se afecta la morfología tisular, los cambios ultraestructurales son más evidentes; la agregación periférica de la cromatina nuclear es más prominente, las mitocondrias aparecen muy hinchadas, con un aumento de su matriz interna en la que aparecen cuerpos densos osmiofílicos amorfos. El sarcoplasma carece prácticamente de

glucógeno y las miofibrillas aparecen sobredistendidas y presentan bandas I más prominentes, la mayoría de las cuales contienen una línea N (1, 14, 27).

Finalmente, se detectan discontinuidades en el plasmolema, cuya aparición señala la muerte de la célula, puesto que permiten la libre difusión de macroléculas, agua y electrolitos a través de lo que previamente era una barrera semipermeable. Los cuerpos densos amorfos de la matriz mitocondrial aumentan en tamaño y cantidad (7, 14, 27). Bajo estas circunstancias, la reperfusión con la reintroducción de un aporte ilimitado de oxígeno y calcio podría tan sólo precipitar la muerte celular, incluso si se introducen ahora procedimientos de "protección" (7).

Durante la isquemia se producen también alteraciones vasculares cuya intensidad es proporcional a la duración de la isquemia, aunque se desarrollan más lentamente que el daño de los miocitos (1, 5). El llamado fenómeno de "no reflujo" se ha relacionado con el daño endotelial, el edema de miocitos y células endoteliales, el desarrollo de contractura y, tal vez, con la obstrucción de los capilares por parte de los granulocitos y las plaquetas. El daño vascular contribuye también a la aparición de hemorragia intramiocárdica (11).

La heterogeneidad es un aspecto importante a tener en cuenta en el desarrollo temporal del daño isquémico. Se describe así, la posible coexistencia en un mismo instante de células que muestran todas las características del daño isquémico (discontinuidad del sarcolema, mitocondrias hinchadas, deplección de glucógeno y marginación de la cromatina nuclear) junto a células relativamente normales desde el punto de vista de su aspecto ultraestructural. Esta heterogeneidad es particularmente

evidente cuando se emplean secciones transmuralles para cuantificar el daño isquémico, apreciándose en el endocardio cambios ultraestructurales tempranos en relación al epicardio (1, 7).

Describiremos a continuación algunos aspectos significativos de la afectación isquémica del miocardio, que se refieren a alteraciones iónicas y del equilibrio ácido/base, a trastornos de la función contráctil y de las propiedades electrofisiológicas, y al fenómeno de "fragilidad osmótica".

1.5. Alteraciones iónicas y del equilibrio ácido/base. Edema osmótico.

La acumulación de metabolitos en el espacio intersticial, característica de la isquemia regional "in vivo", tiene importantes consecuencias y está modulada por la cuantía del flujo residual local. El déficit energético que se produce durante el metabolismo anaerobio se acompaña de una tendencia al aumento en las concentraciones intracelulares de Ca^{++} , Na^+ y H^+ , a la vez que se eleva la concentración de K^+ extracelular (5, 7, 14, 55).

La paralización de la bomba Na^+/K^+ ATPasa, que en condiciones normales expulsa 3 moléculas de Na^{++} y admite una de K^+ con la hidrólisis de una molécula de ATP, produce un aumento de la concentración intracelular de Na^+ . Este aumento se produce lentamente durante la primera media hora de estado anaerobio y se acompaña de un incremento del contenido celular de agua (5, 21).

La concentración intracitoplasmática de calcio aumenta lentamente, manteniéndose en valores prácticamente normales durante los primeros 15-20 minutos. El aumento del nivel citoplasmático de calcio durante esta fase se produce principalmente por la incapacidad del retículo sarcoplásmico para captarlo en contra del gradiente citoplasma-retículo, por la paralización de la bomba sarcolemal de calcio y la inversión de los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ (5, 55). Las mitocondrias son capaces de recoger enormes cantidades de Ca^{++} durante la isquemia, gracias a un transportador monoiónico que introduce este ión a favor de gradiente eléctrico citoplasma-mitocondria. Este transportador, de baja afinidad y alta capacidad, trabaja en combinación con un intercambiador de fosfatos que puede introducirlos en la mitocondria, donde precipitan con el Ca^{++} formando cristales de hidroxapatita (1, 5, 55). Sin embargo, la captación de calcio por las mitocondrias se ve entorpecida por el aumento de la concentración de Na^+ y por la acidosis, debido a la existencia de intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ y Na^+/H^+ en la pared mitocondrial. En fases avanzadas de la lesión isquémica, el calcio puede entrar en la célula por rutas anormales a través del sarcolema y discos intercalares.

El aumento del nivel de NAD reducido y de las concentraciones de metabolitos intermediarios de la vía glucolítica y del metabolismo de los ácidos grasos conduce a la acidosis celular, a la que también contribuye, aunque en menor medida por la detención de la respiración, el aumento de la pCO_2 (5, 53, 55). Se produce así, una acidosis hística progresiva y severa, cuyas principales consecuencias son la detención precoz de la vía glucolítica, aun antes de que se agote el sustrato y la deplección de nucleótidos (1, 5, 14).

La concentración de potasio intracelular tiende a disminuir durante el estado anaerobio. Durante la isquemia, el almacenamiento en el espacio extracelular del K^+ liberado por las células hace que la despolarización sea mucho más marcada que en las preparaciones anóxicas (5, 55).

La isquemia induce un incremento del contenido de agua del miocardio (3, 21, 36, 37, 56) por un mecanismo aún no completamente aclarado. El contenido normal de agua en el miocardio es aproximadamente de 380 ml/100 gr de tejido seco, con escasas variaciones interindividuales e interespecie. El agua intracelular representa el 77% del contenido total de agua, siendo el 23% restante intravascular, y existe sólo una pequeña cantidad de agua intersticial (14, 16). Como se ha comentado anteriormente, durante la isquemia, la rotura de grandes moléculas produce acúmulo de productos del metabolismo (de la glucólisis anaerobia, proteólisis, lipólisis e hidrólisis del ATP). La osmolaridad tisular aumenta, alcanzando aproximadamente 420 mOsm tras 75-90 minutos de isquemia en corazón de cerdo aislado (37). La existencia de este gradiente osmótico puede explicar el edema que aparece al inicio de la isquemia, pero, posteriormente, la mayoría de los productos del metabolismo serían liberados de los miocitos isquémicos al espacio extracelular, lo que suprimiría el gradiente osmótico a través de la membrana celular. La isquemia también interfiere el mantenimiento de los potenciales de membrana que requieren consumo de energía, produciéndose una ganancia neta de iones intracelulares (fundamentalmente sodio y cloro) que se acompaña de desplazamiento de agua hacia el interior de las células. El aumento del contenido total de agua del miocardio que se produce en la isquemia es también, en parte, debido a la existencia de edema intersticial, facilitado a su vez por el aumento de la permeabilidad vascular (16).

1.6. Transtornos de la función contráctil.

La isquemia miocárdica causa una depresión inmediata y marcada de la contractilidad (3, 5, 55, 57, 58), que se produce cuando los niveles de ATP están todavía prácticamente intactos (5, 59).

Allen y cols (55) describen los mecanismos responsables de la disminución de la fuerza de la contracción durante la hipoxia y la isquemia en 3 tipos: 1) Factores metabólicos. Considerados los mas importantes en la disfunción contráctil inicial. En primer lugar el efecto inhibitor del fósforo inorgánico sobre las proteínas contráctiles, y por otro lado la acción de la acidosis que disminuye aún más la capacidad del miocardio para generar tensión. 2) Factores mecánicos. La caída de la presión de perfusión altera la capacidad de contracción-relajación del miocardio afecto. 3) Factores activadores. Se ha descrito que durante la hipoxia con inhibición de la glucólisis, disminuye la duración del potencial de acción y la liberación de calcio por parte del retículo endoplásmico, lo cual puede contribuir a la disminución de la tensión generada.

Dos mecanismos de producción de depresión contráctil durante la isquemia han sido objeto de mayor número de estudios y de controversia (60). Por un lado, se planteó la posibilidad de un fallo en el mecanismo de excitación-contracción como consecuencia de la disminución de la concentración de calcio intracitoplasmático, pero no se ha objetivado tal disminución de la concentración de calcio iónico acompañando a la disfunción contráctil durante la hipoxia (60). Por otro lado,

recientemente se ha descrito que la causa de esta depresión contráctil sería el acúmulo intracelular de metabolitos (58, 60). Mediante técnicas de resonancia magnética nuclear, se ha demostrado que durante la hipoxia miocárdica existe un aumento significativo del contenido tisular de fósforo inorgánico y una disminución de la concentración de creatín-fosfato, que se acompañan de una disminución menos marcada de la concentración de ATP y del pH intracelular (60). La acción del fosfato inorgánico sobre las miofibrillas estaría en relación con la inhibición directa de la formación de puentes (60). También se describe que durante la hipoxia, el acúmulo de fosfato inorgánico y protones reduce la sensibilidad de las miofibrillas al calcio intracitoplasmático, y por tanto su capacidad para generar tensión (58, 60).

El incremento de la concentración de hidrogeniones se acompaña de una alteración de la contractilidad cuyo origen no está aún totalmente aclarado. En relación a este efecto se ha observado que la existencia de acidosis ligera (pH aproximadamente 6.9) puede producir cierta protección (disminuye la liberación de CPK y preserva los depósitos de ATP), probablemente porque reduce el trabajo cardíaco, lo cual disminuye la velocidad de depleción de los depósitos de ATP a un nivel suficiente para mantener la integridad de la membrana celular. Por el contrario, grados más profundos de acidosis resultan deletéreos (53).

A medida que la lesión isquémica progresa, otros mecanismos van añadiéndose al aumento de fósforo inorgánico, incluido el descenso de los niveles de ATP, que al llegar a ser extremadamente bajos en fases avanzadas favorecen la formación de enlaces estables entre los filamentos y la aparición de la contractura isquémica (5, 25, 61-63). Steenbergen y cols (61), en experimentos en corazón aislado

de rata, observaron que la contractura que ocurre en la isquemia venía determinada tanto por la depleción de los depósitos de ATP, como por el aumento de la concentración intracelular de calcio. La aparición de esta contractura isquémica es más precoz en el corazón hipertrófico, que parece presentar una mayor sensibilidad ante el daño isquémico (25).

Durante la oclusión coronaria, el acortamiento sistólico del segmento dependiente de la arteria ocluida, es sustituido por un fenómeno paradójico de abombamiento sistólico (34, 64-68). Esta expansión sistólica se produce tras 1 ó 2 minutos de oclusión coronaria (66, 68) y puede ocasionar una disminución del volumen de eyección efectivo, que es generalmente compensado por un incremento de la contractilidad de los segmentos sanos. Parece existir una buena correlación entre la contracción regional y el flujo subendocárdico por lo que esta contracción segmentaria sería un adecuado marcador de acontecimientos isquémicos agudos (65).

1.7. Alteraciones en las propiedades electrofisiológicas.

Los principales efectos de la isquemia sobre la electrofisiología celular se derivan de las alteraciones iónicas que modifican el potencial de acción de reposo y las corrientes de entrada y de salida, lo que produce cambios en la conducción, la refractariedad y el automatismo (5, 69). Además, la situación anaerobia favorece otros mecanismos capaces de producir alteraciones electrofisiológicas, entre los que destaca la aparición de postpotenciales en relación con el aumento de la concentración citoplasmática de Ca^{++} (5).

1.8. Fragilidad osmótica. Teoría del daño del citoesqueleto.

A diferencia de las células cardíacas normales, que toleran grados muy importantes de edema osmótico sin que se objetive daño celular (21, 24), los miocitos sometidos a isquemia presentan una tolerancia disminuida al edema que se ha descrito como "fragilidad osmótica" (23, 24). Así, cuando los miocitos isquémicos son sometidos a hinchamiento osmótico experimentan daño severo del sarcolema, con liberación de proteínas (enzimas, mioglobina) del citoplasma al espacio extracelular y entrada libre de marcadores extracelulares al espacio intracelular. La aparición de fragilidad osmótica está muy relacionada con la existencia de daño celular irreversible (21, 23, 24).

Estudios con microscopio electrónico (13, 21) y con técnicas de inmunofluorescencia (13, 22), han demostrado que durante la isquemia se produce daño del citoesqueleto. Steenbergen y cols (21) demostraron, en cultivos celulares de miocitos de pollo, que el hinchamiento de las células en combinación con la deplección de fosfatos de alta energía da lugar a la disrupción de la membrana plasmática de los miocitos de forma superponible a la que se observa durante el daño isquémico irreversible. De esta forma, la fragmentación de la membrana parece ser un proceso multifactorial. Existiría una alteración estructural inicial en la membrana celular, en su citoesqueleto o en el anclaje entre ambas estructuras, que se asocia a la deficiencia prolongada de fosfatos de alta energía. Esta alteración inicial hace a la membrana celular susceptible a la tensión mecánica que puede ser debida al edema osmótico. También se ha sugerido que la contractura y la aparición de las bandas de contracción precipitarían la rotura de la membrana plasmática (21).

El citoesqueleto del miocito está compuesto por un complejo sistema de proteínas específicas encargado de transmitir la fuerza contráctil y de mantener la organización de la estructura intra y extracelular (13). Las uniones intercelulares entre los miocitos son más íntimas y sólidas que las que existen entre las demás células del organismo. Ello es debido a que tienen la misión de transmitir la tensión mecánica necesaria para generar el trabajo cardíaco. Además, en su conjunto, han de funcionar como un sincitio que permita la actividad eléctrica sincronizada (29). Estas uniones entre los miocitos se realizan sobre todo a través de los desmosomas y de las uniones "fascia adherens" que están fundamentalmente encargadas del mantenimiento de la estructura del corazón (13, 70). Un tercer tipo, las uniones GAP, presenta sobre todo una importante función eléctrica y metabólica, al permitir el paso de iones y de moléculas pequeñas.

La alfa-actinina es el componente más importante de las bandas Z y de los discos intercalares y va desde los extremos de actina en la banda Z hasta los discos intercalares (13, 24, 70) . La vinculina forma parte de un complejo de proteínas asociado a la membrana y se sitúa específicamente en los lugares de unión de la actina al sarcolema en las uniones llamadas "adherens", tanto laterales como "fascia adherens".

En las células con daño isquémico irreversible la membrana celular se despega de las uniones laterales en la línea Z formándose vesículas subsarcolemales. Steenbergen y cols (21) en su modelo experimental describen que los miocitos sometidos a anoxia y, posteriormente, a hinchamiento osmótico presentan

roturas de la membrana plasmática que se dan sobre todo en la zona en que existe una vesícula subsarcolemal separando el plasmalema de las miofibrillas. Las vesículas subsarcolemales son grandes colecciones de fluido intracelular y se extienden sobre las bandas Z, y aparecen como consecuencia de la desaparición de las proteínas de fijación del citoesqueleto, con separación de los filamentos terminales de la actina del lado interno de los discos intercalares (23). No se aprecian en el miocardio dañado de forma reversible y sí en el sometido a daño isquémico irreversible.

En el miocardio isquémico se ha descrito una pérdida de tinción con inmunofluorescencia para las proteínas vinculina y alfa-actinina del citoesqueleto (21, 23, 24). Steenbergen y cols (22), utilizando anticuerpos frente a la proteína vinculina en preparaciones de miocardio de cerdo, analizaron las modificaciones que se producen en la distribución y localización de la vinculina tras períodos de isquemia variables. Cuando el período de isquemia se prolonga por encima de los 120 minutos se aprecia pérdida progresiva de vinculina, la cual se correlaciona con la aparición de vesículas subsarcolemales y rotura de la membrana plasmática, asociada a un aumento en la permeabilidad a la inulina. Tras 180 minutos de isquemia no existe detección de vinculina en los bordes de los miocitos isquémicos. Cuando la duración del período de isquemia es menor que el requerido para producir disrupción de la membrana plasmática (por ejemplo 60 minutos "in vitro") el patrón de inmunofluorescencia de la vinculina está preservado. Estas observaciones sugieren, según los autores, una asociación entre el daño del citoesqueleto y la disrupción de la membrana plasmática, de forma que la rotura del citoesqueleto de soporte sería responsable del debilitamiento de la membrana plasmática y permitiría su rotura tras el hinchamiento de las células durante la isquemia. Destacan también los autores que esta desintegración de los componentes del

citoesqueleto ocurre durante la fase de isquemia miocárdica sin que sea necesaria la reoxigenación.

Permanece aún sin aclarar cómo la isquemia podría dañar las uniones entre el citoesqueleto y la membrana celular. Algunos autores han propuesto (21-24) que podría deberse a la proteólisis de los componentes del citoesqueleto. En el músculo cardíaco y esquelético se han identificado proteasas dependientes del calcio que son capaces de degradar muchas proteínas del citoesqueleto, incluida la vinculina. Estas proteasas parecen ser similares en ambos tejidos y se han localizado en las bandas Z y en el lado citoplasmático de la membrana plasmática. Se han identificado 2 formas de proteasa; una requiere nivel micromolar y la otra nivel milimolar de calcio para su activación. Steenbergen y cols (22) proponen la hipótesis de que el daño ocurre por la activación de las proteasas endógenas debido al aumento citoplasmático de calcio libre. En los miocitos con déficit de energía se ha demostrado un incremento de la concentración de calcio citoplasmático, aunque la magnitud de este incremento es pequeña (durante la isquemia total el aumento de calcio libre citoplasmático no supera 10^{-4} M; 21) y generalmente, ocurre de forma más tardía que la inhibición de la producción de energía (22). No obstante, la existencia de una proteasa dependiente de concentraciones micromolares de calcio en el lado citoplasmático del sarcolema y la capacidad de esta proteasa para degradar las proteínas del citoesqueleto apoyarían la hipótesis de que la proteólisis es responsable del daño del citoesqueleto durante la isquemia. Probablemente existen también otras clases de enzimas proteolíticas (así se han descrito proteasas que son liberadas por los mastocitos y dañan las uniones GAP) (70) u otros mecanismos aún no conocidos que puedan iniciar el daño celular irreversible (23).

Actualmente se admite que la fisiología celular está regulada por un sistema de fosforilización que sería también responsable de la integridad y dinámica del citoesqueleto de los miocitos. En este sentido, se ha planteado que la disminución de los depósitos de ATP puede reducir el nivel de fosforilización normal de las proteínas tanto reguladoras como estructurales del citoesqueleto, provocando así su lesión en la isquemia (13).

Surge, por ello, la hipótesis de que las células "irreversiblemente dañadas" podrían recuperarse si se lograra evitar la lesión de la membrana en la reperfusión durante el tiempo necesario para permitir su recuperación metabólica (13).

2.- REPERFUSION MIOCARDICA

La restauración del flujo sanguíneo transitoriamente interrumpido se denomina reperfusión. Dependiendo de las circunstancias y, sobre todo, del momento en que se realice, la reperfusión miocárdica puede conducir a la rápida recuperación bioquímica, estructural y funcional del área en riesgo o a su progresivo deterioro, con liberación de enzimas, alteraciones funcionales y grandes cambios morfológicos (5, 7, 10). Cuando esto último ocurre, se dice que se ha producido lesión por reperfusión. Como se ha comentado anteriormente, la caracterización, o incluso la propia existencia de este fenómeno, sigue siendo objeto de controversia.

Jennings y cols (56) analizaron la cronología de la recuperación tras la isquemia del miocardio en perros sometidos a oclusión coronaria de la arteria

circunfleja durante 15 minutos seguidos de períodos variables de reperfusión. Observaron que tras 3 minutos de reperfusión se había reiniciado el metabolismo aerobio y después de 20 minutos el miocardio recuperaba un aspecto normal estudiado con microscopio electrónico (excepto por alguna mitocondria alterada). La elevación de la concentración de potasio se mantenía durante 60 minutos y la dificultad de control del volumen celular y el edema persistían durante aproximadamente 24 horas.

Vinten-Johansen y cols (9), en un modelo canino con oclusión de la arteria descendente anterior durante 1 hora, seguida de reperfusión durante 2 horas, describieron que la reperfusión ampliaba el daño producido por la isquemia. Los autores observaron que tras la reperfusión aumentaba el edema tisular, disminuía la distensibilidad diastólica y los cambios estructurales eran más marcados. Por el contrario, Ganz y cols no objetivaron extensión de la necrosis debida a la reperfusión en su modelo de oclusión coronaria (durante 90-240 minutos) seguida de reperfusión durante 5 minutos. Los autores compararon el tamaño del infarto en el mismo animal en 2 territorios de la arteria descendente anterior, siendo uno de ellos sometido a reperfusión tras la isquemia (17).

Los mecanismos responsables del daño por reperfusión no se conocen totalmente en el momento actual. Sabemos que la pérdida de la integridad funcional y estructural de la membrana durante la reperfusión ocasiona una importante alteración de la homeostasis del calcio y del agua, que constituye en último término el mecanismo responsable de la destrucción del miocito. No existe una única causa que explique la exacerbación del daño isquémico inducido por la reperfusión y probablemente estén involucrados una serie de factores que finalmente determinan el

deterioro de la homeostasis del calcio, con acumulación de calcio intracelular, lo cual activa una cadena de acontecimientos destructivos (7, 8, 11, 31, 71, 72).

Un aspecto importante de la fisiopatología de la reperfusión, es el aumento brusco durante la reperfusión de la concentración intracitoplasmática de Ca^{++} , que desencadena pérdida de los componentes intracelulares, desarrollo de contractura de los miocitos y, posteriormente, destrucción tisular (8, 11, 12, 61, 71-74). Diferentes estudios experimentales han descrito esta sobrecarga de calcio en tres situaciones: 1) En la reintroducción del calcio a una preparación de miocardio tras perfusión libre de calcio (la llamada paradoja del calcio). 2) En la reoxigenación tras un episodio de hipoxia (paradoja del oxígeno). 3) En la reperfusión tras un episodio isquémico. La paradoja del calcio y del oxígeno se han descrito únicamente en laboratorio experimental en preparaciones de miocardio aislado, sin embargo presentan algunas características comunes con la reperfusión, con pérdida del control de la homeostasis del calcio, alteración del flujo transmembrana de iones y sobrecarga de calcio y posterior daño de la membrana y necrosis celular (71), constituyendo así modelos adecuados para el estudio de algunos factores determinantes del daño por reperfusión.

Describiremos a continuación la paradoja del calcio y la paradoja del oxígeno y sus posibles relaciones con la sobrecarga de calcio que ocurre en la reperfusión, así como otros factores capaces de dañar las células miocárdicas durante la reperfusión que agruparemos en: factores mecánicos (entre los que destacan los cambios de la presión osmótica y del pH, el fenómeno de hipercontractura y la

interacción intercelular) y factores bioquímicos (fundamentalmente debidos a la acción de los radicales libres derivados del oxígeno).

2.1. Paradoja del calcio.

La paradoja del calcio puede observarse cuando se somete una preparación de miocardio a perfusión con un medio que carece de calcio (8, 11, 31, 72, 75, 76). Si esta perfusión libre de calcio se mantiene por un período corto, menor de 3 minutos en la mayoría de las preparaciones, la reinstauración de una perfusión con contenido normal de calcio se acompaña de recuperación de la función contráctil y mantenimiento de la viabilidad de la preparación. Sin embargo, si este período se prolonga un poco más, la reinstauración de la perfusión con calcio produce una hipercontractura tan intensa que en un minuto aproximadamente ha desaparecido la estructura miofibrilar, que es sustituida por el entrecruzamiento y solapamiento de los sarcómeros (5, 46). Las mitocondrias contienen grandes cantidades de calcio y en los miocitos aislados son desplazadas hacia la periferia celular, donde son incluidas en vesículas de sarcolemma pediculadas. En los miocitos "in situ" se observa disrupción de los discos intercalares y rotura del sarcolemma (5, 72). Este marcado deterioro ultraestructural se acompaña de una masiva liberación de componentes intracelulares, depleción de fosfatos de alta energía, pérdida de potasio y ganancia de calcio y sodio (76).

El mecanismo responsable de la explosiva destrucción celular que se produce en la paradoja del calcio parece ser la entrada masiva de este ión al restaurarse la perfusión con calcio. Son muchos los mecanismos por los que la perfusión libre

de calcio puede afectar la capacidad del miocito para controlar el flujo transmembrana y la homeostasis del calcio, que incluyen desde modificaciones en el glicocalix, hasta entrada libre de Ca^{++} a través de soluciones de continuidad en el sarcolema y disrupción de los discos intercalares (5, 46, 71, 72). Se ha descrito separación del sarcolema de sus elementos de fijación a nivel de los discos intercalares durante la depleción de calcio (72). Sin embargo, la mayor parte de los autores (5, 11, 55, 71, 76) opina que el mecanismo primario de esta sobrecarga de calcio es la entrada de Na^+ a través de los canales del calcio durante la fase de deprivación. En condiciones normales, el Na^+ , a pesar de estar cargado positivamente y tener un radio atómico menor que el Ca^{++} , no entra en la célula a través de los canales del calcio a favor de su gradiente electroquímico debido, probablemente, a que estos canales están permanentemente ocupados con más de un átomo de Ca^{++} . Parece ser que, durante la deprivación de calcio, esta disminución del calcio extracelular aumenta la permeabilidad del canal al sodio. La entrada de Na^+ aumenta su concentración intracelular y tras reinstaurar la perfusión con calcio se ponen en funcionamiento los intercambiadores $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, produciéndose una rápida entrada de calcio al citoplasma (5, 55). Esta entrada no puede ser absorbida por el retículo sarcoplásmico ni por las mitocondrias, a pesar de la captación de importantes cantidades de Ca^{++} por estas últimas, y la elevación de Ca^{++} citoplasmático activa las fosfolipasas y proteasas e inicia todos los mecanismos en los que este ión actúa como mensajero, produciéndose la hipercontractura y la muerte celular (5, 21, 55, 71, 72).

Naylor y cols (71) describen que en la paradoja del calcio, a diferencia de lo que sucede en la paradoja del oxígeno o durante la reperfusión, la entrada de calcio a la célula sería el acontecimiento primario que desencadenaría la

posterior depleción de los depósitos de ATP (por acúmulo de calcio en la mitocondria que reduce la velocidad de refosforilización del ADP) y, secundariamente la alteración de la homeostasis de los iones. Estos mismos autores (76) han descrito dos fases en la entrada de calcio a la célula que ocurre durante la paradoja del calcio; la primera fase de corta duración, parcialmente sensible a nifedipina y verapamil, que al parecer se produce a través de los canales lentos del calcio y del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, y la segunda fase, más prolongada, insensible a los antagonistas del calcio, que los autores atribuyen a vías no fisiológicas.

2.2. Paradoja del oxígeno

La paradoja del oxígeno consiste en la destrucción celular explosiva que se observa tras la reoxigenación de preparaciones de miocardio previamente anóxicas durante un período prolongado (5, 8, 31, 71, 72, 77). Las alteraciones que se producen en los miocitos son similares a las observadas en la paradoja del calcio, lo cual sugiere que la alteración de la homeostasis del calcio sea el principal desencadenante del daño celular durante la reoxigenación. Sin embargo, el tiempo de deprivación (anoxia) requerido para la manifestación de la paradoja del oxígeno es aproximadamente de 45 minutos, superior al de la paradoja del calcio (72). La mayoría de los autores (8, 11, 71, 72) opina que en la paradoja del oxígeno, así como en la reperfusión (a diferencia de la paradoja del calcio), la sobrecarga de calcio ocurriría como consecuencia de la pérdida de fosfatos de alta energía. Nayler y cols (71) describen que durante la reoxigenación y la reperfusión se ha producido pérdida de los depósitos de ATP por lo que se altera el funcionamiento de las bombas iónicas, aumentando el contenido intracelular de calcio y sodio, y este aumento de calcio

intracelular activa las fosfolipasas y proteasas y se acumula en la mitocondria donde reduce la fosforilización del ADP y aumenta la liberación de H^+ , favoreciendo la acidosis celular. Hearse y cols (72) describen que, en la reoxigenación, la recuperación de la cadena transportadora de electrones desencadenaría la entrada a la mitocondria del calcio que había penetrado en el citoplasma durante la hipoxia. La entrada incontrolada de calcio a la mitocondria desencadena su disfunción y la salida de H^+ . Opie y cols (8, 11) atribuyen parte del daño que experimenta la mitocondria durante la reperusión a la acción de los radicales libres derivados del oxígeno. Algunos autores han señalado que la restauración de la actividad contráctil, secundaria a la recuperación de la fosforilización oxidativa, en presencia de una concentración citoplasmática de calcio elevada (a consecuencia de la deplección de oxígeno previa) puede dar lugar a hipercontractura sin que exista una entrada adicional de calcio desde el exterior (10, 19, 20, 77).

2.3. Sobrecarga de calcio en la reperusión.

Durante la reperusión del miocardio isquémico se ha descrito gran extensión del daño preexistente, con aparición de bandas de contracción, disrupción de las miofibrillas y del sarcolema y depósitos de calcio en el interior de las mitocondrias, en un proceso similar al descrito en las paradojas del calcio y del oxígeno, lo que sugiere que pueda estar en relación con la alteración de la homeostasis del calcio y las consecuencias destructivas de la sobrecarga del calcio (72).

Sin embargo, no se conoce exactamente el origen de esta sobrecarga de calcio que se observa en la reperusión. El calcio puede entrar a la célula

a través de los canales lentos del calcio (11, 71) o intercambiándose por K^+ o H^+ a través de las bombas dependientes de ATP (71). El calcio también aumenta en el citoplasma de los miocitos cuando disminuye su captación por parte del retículo endoplásmico (5, 11, 12). Durante la isquemia se produce un aumento progresivo de la concentración de calcio y sodio dentro de las células (5). Los resultados de varios estudios en diferentes modelos experimentales han sugerido que la ruta más probable de entrada de calcio durante la reoxigenación sería a través del intercambiador Na^+/Ca^{++} , en respuesta a un aumento de la concentración intracelular de Na^+ (12, 55, 62, 77-81).

Las concentraciones intracelulares de Na^+ , Ca^{++} e H^+ están elevadas durante la reoxigenación y de las interrelaciones entre estos iones resultaría un circuito de retroalimentación positivo. El incremento de la concentración intracelular de Na^+ provocaría un aumento de la concentración de Ca^{++} a través del intercambiador Na^+/Ca^{++} . A su vez, este aumento de calcio intracitoplasmático elevaría la concentración de H^+ (a través de varios mecanismos, entre los que se incluyen competencia entre Ca^{++} e H^+ por los puntos de fijación a las proteínas y a la mitocondria, así como activación de la glicolisis anaerobia por parte del calcio con formación de ácido láctico) (55). El incremento de la concentración intracelular de H^+ aumentaría la de Na^+ a través del intercambiador Na^+/H^+ . La activación de este circuito de retroalimentación requiere no sólo concentraciones intracelulares elevadas de los iones (lo que sucedía también antes de la reoxigenación), sino además, funcionamiento de los intercambiadores Na^+/Ca^{++} (los cuales permanecían inhibidos durante la isquemia cuando la concentración de ATP era suficientemente baja) (5, 55, 78). Recientes observaciones sobre el efecto protector del amiloride (un inhibidor del intercambiador

Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$) subrayan la posible importancia de este mecanismo (81, 82). Weiss, Lakatta y cols (82) estudiaron en corazón de rata aislado el efecto del amiloride (0.1 mM) y objetivaron una disminución de las manifestaciones de la ganancia de calcio mediada por sodio en la reoxigenación, con mejoría de la recuperación mecánica y metabólica (mayor preservación de creatín fosfato y ATP, menor depósito de fosfato inorgánico y menor grado de acidosis).

También se ha descrito participación de la mitocondria y del retículo endoplásmico en la alteración del manejo del calcio que ocurre en la reperfusión (83, 84). La recuperación de la función del retículo endoplásmico de los miocitos en la reperfusión es decisiva para el restablecimiento del control de la homeostasis del calcio (77, 85).

En fases avanzadas de la reoxigenación, una vez que se ha iniciado la contractura y la lesión severa, el calcio puede penetrar en la célula a través de defectos en el sarcolema y en los discos intercalares (5, 46, 72).

Diversos estudios experimentales han evidenciado una relación directa entre la concentración de calcio en la reperfusión y la posibilidad de recuperación mecánica del miocardio (62, 71, 78).

2.4. Factores mecánicos.

Como ya se ha comentado, varios autores han descrito que la isquemia puede producir alteraciones inaparentes del sarcolema o de su citoesqueleto

de anclaje que hacen a la célula anormalmente susceptible a la tensión mecánica (12, 21-23). La reperfusión impone una sobrecarga mecánica al sarcolema que puede desencadenar su disrupción y la entrada masiva de calcio (12, 56). Entre los posibles mecanismos implicados, el edema osmótico, la contractura y la interacción intercelular son los más estudiados.

2.4.1. Cambios en la presión osmótica y en el pH. Edema osmótico.

La reperfusión induce edema cuya magnitud depende fundamentalmente de la duración y severidad del episodio isquémico precedente. Durante la isquemia se había producido un aumento de la osmolaridad intra y extracelular por acumulación de metabolitos (5, 7, 16, 21, 31) y durante la reperfusión el lavado brusco del líquido extracelular crea un gradiente osmótico entre el exterior y el interior de la célula la cual normaliza su presión osmótica con mucha más lentitud (12, 16, 21). El agua penetra en las células a favor del gradiente osmótico con el consiguiente aumento del volumen intracelular. Este proceso se ve favorecido por el deficiente control de la homeostasis del agua que presentan las células isquémicas (5, 21). Se ha descrito que el contenido total de agua en el perro tras 15 minutos de oclusión coronaria y 20 minutos de reperfusión era de 400 ml/100 gr de tejido seco (56), y en el cerdo sometido a 48 minutos de oclusión coronaria, seguidos de 30 minutos de reperfusión el contenido total de agua se elevaba hasta 540 ml/100gr (36).

El edema de los miocitos aumenta la tensión sobre el sarcolema y se ha descrito que esto podría producir daño del sarcolema. Sin embargo, se ha

demostrado que el edema por sí solo no rompe la membrana celular (21), y las células pueden tolerar aumentos importantes de su volumen (hasta del 40%) sin que se rompa el sarcolema. La mayoría de los autores piensa hoy que el edema no es suficiente para matar a las células, y que son otros procesos originados durante la isquemia y la reperfusión los responsables del daño que el edema simplemente pondría de manifiesto (16).

Además, el aumento del volumen de los miocitos y, sobre todo, de las células endoteliales comprime el lecho microvascular disminuyendo el riego del territorio reperfundido y favoreciendo el fenómeno de "no reflujo" (16, 31). Este fenómeno se produce cuando la solución de perfusión se introduce en la circulación coronaria tras períodos prolongados de isquemia en condiciones no isovolumétricas. Se manifiesta como una reperfusión "en parches", por interrupción del flujo en los capilares debido a que el edema celular (tanto de miocitos como de células endoteliales) unido al edema tisular, y probablemente al efecto de la contractura del miocardio (11, 86), comprime los capilares. No obstante, puesto que la distensión isovolumétrica durante la isquemia previene la aparición de este fenómeno, parece razonable pensar que la causa desencadenante pertenece más bien al período isquémico. De todas formas, aunque el fenómeno de no reflujo ha sido bien documentado en corazones aislados, su relevancia "in vivo" es aún desconocida (7) y muchos autores consideran que contribuye poco al desarrollo de la muerte celular (3).

Existen datos que sugieren que el fenómeno de edema osmótico puede causar pérdida de miocitos viables y de que su control puede aumentar la masa miocárdica salvada por la reperfusión. Por un lado, se ha observado que la reperfusión

con sustancias hiperosmóticas, fundamentalmente con manitol, puede tener efecto beneficioso con reducción del área de necrosis (12, 36, 37), aunque los resultados de estos trabajos son aún controvertidos (16). Por otro lado, situaciones que producen una disminución del edema miocárdico postreperusión, como el preconditionamiento isquémico (12, 87), también reducen el tamaño del infarto subsiguiente (16, 32, 35). El preconditionamiento isquémico ha demostrado incremento de la cantidad de miocardio salvado, el cual se acompaña de una disminución de la hiperosmolaridad miocárdica. Se plantea, por ello, que el efecto beneficioso del preconditionamiento pueda ser parcialmente debido a la deplección de sustratos y al lavado de metabolitos durante períodos transitorios, lo que evitaría el aumento de la osmolaridad durante el episodio isquémico posterior y el edema durante la fase de reperusión (16).

El edema parece afectar la función contráctil del miocardio, y se ha demostrado un posible efecto beneficioso de la reperusión hiperosmótica sobre el miocardio aturdido en corazón de rata aislado (16, 88). También se describe que la tensión del sarcolema, secundaria al edema, puede condicionar un automatismo anormal en las células, acortando la duración del potencial de acción y el período refractario, lo cual podría facilitar la aparición de arritmias por reentrada (89). Se ha observado que la adición de manitol a la solución de reperusión puede retrasar o reducir las arritmias de reperusión en corazón de rata aislado (89) o en el corazón de cerdo "in situ" (36, 69), aunque este efecto sobre las propiedades electrofisiológicas puede ser también debido a otras acciones del manitol distintas de su acción antiedema.

El edema miocárdico proporciona a la pared ventricular izquierda cierta rigidez que podría, en ocasiones, prevenir la disquinesia temprana y modificar el remodelado ventricular (90).

2.4.2. Hipercontractura. Interacción intercelular.

La recuperación del aporte de oxígeno y sustratos tras períodos prolongados de isquemia o hipoxia miocárdica, desencadena la aparición brusca del fenómeno de hipercontractura y la liberación masiva de enzimas intracelulares por parte de los miocitos. La aparición de este fenómeno requiere relativa preservación de la función mitocondrial y no ocurre si la producción de energía está totalmente abolida (77, 91).

Durante la reperfusión tras un período de isquemia superior a 20 minutos se ha descrito un aumento en el contenido de calcio del miocardio (19, 61, 91) que se acompaña de una sobrecarga intracelular de calcio (8, 71-73), de un incremento en el nivel de sodio de los miocitos (55, 62, 80, 81) y de marcados cambios ultraestructurales que incluyen la formación de bandas de contracción (1, 14, 27, 73). Algunos investigadores sugieren una relación directa entre este aumento de calcio intracelular y el incremento en la tensión generada por las fibras musculares (y, por tanto, la hipercontractura) que se observa durante la reperfusión (19, 61, 92).

Otros autores (91), por el contrario, han sugerido que la aparición de hipercontractura provocaría daño del sarcolema, lo cual facilitaría secundariamente la entrada de calcio a las células. En este sentido, se ha descrito en miocitos aislados

(93), que el desarrollo de la contractura inducida por la reperfusión no se asociaba a un aumento significativo de la concentración de calcio intracelular. Estos autores describieron que el aumento del contenido de calcio intracelular aparece en fases tempranas de la isquemia. En su opinión, durante la isquemia no se desarrollaría la contractura debido a una desensibilización al calcio de los mecanismos contráctiles en esta fase (58, 60, 93). La causa de esta pérdida de sensibilidad al calcio de los mecanismos contráctiles no ha sido completamente aclarada. Se ha postulado que un factor determinante podría ser la acidosis (60, 91, 94), la cual se ha observado que disminuye la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio e inhibe la contractura dependiente del calcio de los miocitos aislados. Asimismo, en preparaciones de fibras musculares ventriculares se ha descrito, durante la reoxigenación, un incremento de la fuerza de contracción generada como respuesta al calcio (58).

El aumento en la captación de Ca^{45} que se observa tras la reinstauración del aporte de oxígeno al miocardio isquémico se debe, para algunos autores (10, 19), a la recuperación de la síntesis de ATP por la fosforilación oxidativa. Quaife y cols (19) describen, en su experimento en cultivos de miocitos de pollo, que la concentración de calcio intracelular aumenta marcadamente durante la hipoxia prolongada con inhibición de la glucólisis, pero que tras la oxigenación esta concentración intracelular de calcio no aumenta, sino que, por el contrario, disminuye ligeramente. Interpretan que la nueva síntesis de ATP durante la reoxigenación puede activar la captación de calcio por el retículo sarcoplásmico y, tal vez, también por la mitocondria provocando una disminución de la concentración intracelular de calcio que coincide con el aumento en la captación celular de este ión (19). Estos autores sugieren que la hipercontractura resulta, al menos en parte, de la formación de puentes cíclicos

en los miofilamentos, inducida por la síntesis de ATP en presencia de niveles altos de calcio intracelular. También, Piper y cols (77) proponen que la hipercontractura que ocurre en la reoxigenación y en la reperfusión se debe a la recuperación de los depósitos energéticos en las miofibrillas, que pueden ser activadas en presencia de un nivel de calcio todavía aumentado al inicio de la reoxigenación.

Vander Heide, Ganote y cols (95, 96) estudian el efecto de la contractura sobre el daño del sarcolema mediante un modelo en corazón de rata, basado en la inducción de la contractura con cafeína (la cual estimula la liberación intracelular de calcio del retículo sarcoplásmico produciendo contractura sin afectación de la función mitocondrial), que presentaba gran similitud con la observada en la paradoja del calcio. Los autores atribuyeron la alteración celular que se observaba en ambos procesos al daño generado por la tensión mecánica, no siendo necesaria, en su opinión, la entrada de calcio desde el exterior para la manifestación de estos fenómenos (96). Sugieren que la lesión fundamental que se produce durante la deplección de calcio es el debilitamiento de los discos intercalares, a nivel de la "fascia adherens". Así pues, la extensión del daño tisular vendrá determinada por la fuerza contráctil producida, independientemente de la cantidad de calcio que activa la contracción (95).

Durante la hipoxia severa se han descrito alteraciones en el sistema de citoesqueleto de los miocitos, con debilitamiento de las uniones de los filamentos de actina con el sarcolema a nivel de la "fascia adherens" de los discos intercalares y de las uniones laterales (Ver apartado: 1.8.Fragilidad osmótica). Durante la hipercontractura que induce la reoxigenación aumentaría la tensión mecánica que se aplica sobre el citoesqueleto alterado, produciéndose daño del sarcolema que permite

la entrada masiva e incontrolada de calcio, así como la liberación de enzimas intracelulares (19, 91, 93).

Estudios recientes sobre la distribución espacial y la geometría del infarto postreperusión (en los que la zona de necrosis es continua aunque de bordes anfractuosos) han demostrado la existencia de una contigüidad entre las células necróticas que sugiere la presencia de una interacción entre los miocitos, la cual determinaría la progresión de la necrosis (29). También se ha demostrado que los miocitos aislados toleran mejor la isquemia y la reoxigenación que aquéllos en contacto con otros miocitos (7, 20, 97, 98) o con un cuerpo sólido (46). Siegmund, Piper y cols (20) observaron que los miocitos aislados experimentan hipercontractura tras la reoxigenación pero mantienen la integridad del sarcolema, aunque presentan disrupciones y distorsiones del citoesqueleto. Los autores atribuyen a las interacciones intercelulares entre los miocitos adyacentes la posibilidad de actuar como factor "llave".

Las distintas observaciones parecen indicar que las íntimas uniones entre miocitos adyacentes pueden amplificar y transmitir la tensión generada por la contractura postreperusión de un miocito a su vecino. Se ha sugerido (5, 12) que la forma más probable de interacción entre los miocitos sería de tipo mecánico. La hipercontracción de un miocito durante la reperusión podría desgarrar el sarcolema de un miocito contiguo isquémico con la consiguiente entrada masiva de calcio e hipercontractura que, a su vez, podría dañar el miocito siguiente (12).

2.5. Lesión por radicales libres derivados del oxígeno.

Entre los mecanismos a los que se ha atribuido el daño por reperfusión, el debido a los radicales libres derivados del oxígeno es, probablemente, el más investigado y el que ha mostrado resultados más controvertidos (31, 38, 99-104).

Los radicales libres son moléculas con un número impar de electrones y, por tanto, con un único electrón en el orbital más externo. El electrón impar confiere a los radicales libres una gran actividad química. En la reacción entre un radical libre y una molécula sin esta propiedad, el primero empareja su electrón impar con otro robado a esta última, produciéndose un nuevo radical libre que, a su vez, puede atacar a otra molécula. Iniciaría así una reacción en cadena que puede prolongarse en miles de pasos y que constituye el mecanismo de lesión celular por radicales libres que se ha descrito en diferentes tejidos (5, 31, 99, 100). El empleo de técnicas de resonancia magnética nuclear ha permitido demostrar que durante la reperfusión miocárdica se liberan grandes cantidades de radicales libres. Esta liberación es máxima durante los primeros minutos de la reperfusión, decayendo luego con rapidez, pero manteniéndose en niveles significativos durante largos períodos de tiempo (5, 12, 99).

En un principio, se concedió gran importancia al sistema xantina/xantín-oxidasa como fuente de radicales libres durante la reperfusión (31, 38). Estos se originarían en el espacio extracelular a partir de la hipoxantina acumulada durante la isquemia, e iniciarían la peroxidación de los fosfolípidos de membrana, dando lugar a una cadena de reacciones (5, 99). La capacidad lesiva de los radicales

libres sobre muchas estructuras celulares y, concretamente, sobre el sarcolema produciendo peroxidación lipídica ha sido ampliamente demostrada (31, 99). Sin embargo, se ha comprobado que, a diferencia del perro y de la rata, algunas especies como el cerdo y el hombre carecen prácticamente de la capacidad para generar xantín-oxidasa (105). Otra fuente, también ampliamente investigada, de radicales libres del oxígeno son los leucocitos. Se ha demostrado que éstos son atraídos y activados por el miocardio reperfundido (38, 39, 106), pero esto sucede horas más tarde que el pico máximo de liberación de radicales libres y que el momento de mayor daño celular por reperfusión (12, 106, 107).

El papel real que los radicales libres derivados del oxígeno desempeñan en el daño por reperfusión no está claro y muchos investigadores piensan que puede ser pequeño (8, 12, 100, 104). Con el objetivo de evaluar este papel, se ha estudiado el efecto de los tratamientos antirradicales libres sobre el tamaño final del infarto postreperfusión. Se han empleado fármacos para inhibir la generación de radicales libres, como alopurinol o deferroxamina (38, 101, 102, 104, 108), y sustancias eliminadoras, como superóxidodismutasa o catalasa (100, 103, 104, 109). El número de estudios experimentales realizados en este sentido es enorme y, sin embargo, los resultados respecto a la posible reducción del tamaño del infarto son contradictorios (8, 12, 31, 100). Parece cada vez más evidente que el pico inicial de radicales libres observado durante la reperfusión, o bien no causa la muerte de una masa apreciable de miocardio viable, o bien no puede ser neutralizado con los tratamientos ensayados hasta el momento (12, 100). Queda por descartar si los radicales posteriormente liberados por los leucocitos desempeñan un papel más relevante (39, 106). Diversos estudios han demostrado, sin embargo, que los radicales libres del oxígeno están íntimamente

implicados en la génesis de las arritmias de reperfusión (69, 109, 110) y se ha sugerido su participación en la disfunción contráctil que ocurre tras períodos cortos de isquemia y en el daño microvascular postreperfusión (39, 100).

2.6. Evolución del daño miocárdico tras la reperfusión.

Las alteraciones ultraestructurales que se observan durante la reperfusión del miocardio isquémico dependen de si éste ha sido o no dañado de forma irreversible.

1) Reperfusión en la fase de daño reversible.

Tras 3 minutos de reperfusión en el miocardio isquémico pero aún viable se objetiva un incremento del volumen de las mitocondrias con dispersión de la cromatina nuclear previamente marginada. Presenta una cantidad de glucógeno sarcoplásmico menor que el tejido control no isquémico y las miofibrillas permanecen relajadas. Después de un período de 20 minutos de reperfusión, la imagen ultraestructural de este tejido es básicamente indistinguible del miocardio no isquémico, excepto por la presencia de alguna mitocondria hinchada o fragmentada. La membrana plasmática se mantiene intacta a pesar de la sobrecarga osmótica que existe al inicio de la reperfusión, lo que parece compatible con la hipótesis de que la integridad de la membrana debe ser mantenida para que puedan sobrevivir los miocitos (27). No obstante, la preservación de la viabilidad celular por parte de la reperfusión no implica recuperación inmediata de la función contráctil o metabólica (1), pues se ha demostrado depresión transitoria de la contracción segmentaria tras períodos de isquemia con daño

reversible, que probablemente está en relación con la disminución de las reservas de los nucleótidos de adenina. La recuperación completa de los depósitos de ATP puede retrasarse hasta 4 días.

2) Reperusión en la fase de daño irreversible.

La reperusión en la fase inicial del daño irreversible produce cambios profundos rápidamente. Los sarcómeros aparecen hipercontraídos y forman bandas densas de contracción. Estas bandas de contracción aparecen tras 1 ó 2 minutos de reperusión y se deben al acortamiento excesivo de los sarcómeros, con pérdida completa de la estructura de las bandas A, I y Z. El sarcolemma está severamente dañado en áreas focales, apreciándose en algunas zonas únicamente los restos del plasmalema, como vesículas adheridas al glicocalix (1, 25, 27). El daño severo del sarcolemma se asocia a sobrecarga masiva de calcio. Este exceso de calcio es parcialmente almacenado en la mitocondria, donde se deposita en forma de cuerpos densos cristalinos en un proceso activo que requiere energía y fosfato inorgánico y que, por tanto, no se produce en miocitos severamente dañados por largos períodos de isquemia. En esta fase se produce hinchamiento explosivo de los miocitos, con vacuolas intracelulares y largas vesículas subsarcolemales.

Cuando la reperusión se realiza tardíamente en la fase de daño irreversible existe también daño vascular y fenómeno de no reflujo, así como hemorragia intramiocárdica (1, 3, 11, 107). Se ha descrito aparición de hemorragia en infartos tras 45 minutos de oclusión coronaria y 30 minutos de reperusión (107), que al parecer viene determinada por la reperusión, pues en los infartos no reperfundidos

no se objetiva hemorragia. La extravasación de células rojas es más abundante en la región media y va disminuyendo hacia endocardio y epicardio (107). La mayor parte de los autores opina que la hemorragia no tiene efecto importante sobre el tamaño del infarto (3, 107). La afectación severa de la microvasculatura parece ser un proceso tardío en la evolución del daño por isquemia y reperfusión (3, 11, 107), aunque se ha descrito también una alteración microvascular funcional en relación a los episodios transitorios de isquemia y reperfusión que se manifiesta como un aumento de la permeabilidad vascular (111).

La reperfusión, además de afectar al tamaño del infarto, tiene otros efectos sobre el tejido miocárdico, derivados de la modificación en la histología y las propiedades de la zona de necrosis (5).

La presencia de edema, hemorragia e hipercontractura hace que las zonas de necrosis postreperfusión sean más rígidas y menos distensibles que las zonas de necrosis tras una oclusión permanente, y pueden producir un deterioro de la distensibilidad mayor que éstas. Por otra parte, la perfusión de la zona necrosada facilita el mantenimiento de una fina capa de células subepicárdicas viables, lo cual favorece el proceso de cicatrización y puede disminuir la incidencia de roturas miocárdicas, aneurismas ventriculares y derrame pericárdico periinfarto (5). Así, se ha observado que la reperfusión tardía, aunque no salve cantidades apreciables de miocardio, previene la distensión de la zona necrosada que se objetiva tras oclusiones coronarias permanentes en ausencia de circulación colateral (4, 5), limitando el efecto del remodelado ventricular izquierdo (90). Esta acción sobre el remodelado ventricular

parece ser la causa de que la permeabilidad tardía de la arteria responsable de un infarto de miocardio sea un factor independiente predictor de supervivencia (4).

2.7. Arritmias de reperfusión.

La reperfusión puede desencadenar arritmias ventriculares, incluidas taquicardia o fibrilación ventriculares (8, 11, 69). Las arritmias de reperfusión tienen distinto mecanismo de producción que las que suceden en la isquemia, pero vienen determinadas por la duración del episodio de isquemia previo (69). Jennings y cols, en sus estudios de reperfusión en perros (1), describen la mayor incidencia de fibrilación ventricular cuando la reperfusión se realizaba en los 15-20 primeros minutos de la isquemia, siendo menor esta incidencia a los 40 minutos y muy escasa a las 3 horas, lo que se relacionaba con la cantidad de miocardio viable y el grado de isquemia reversible al inicio de la reperfusión. La fibrilación ventricular es menos frecuente en pacientes con trombolisis eficaz que en animales de experimentación sometidos a oclusión coronaria y reperfusión, probablemente porque la velocidad en que se produce la reperfusión es más lenta en los pacientes con enfermedad coronaria sometidos a trombolisis (8, 11).

La producción de las arritmias de reperfusión se ha atribuido fundamentalmente a dos mecanismos. Por un lado, se han relacionado con la sobrecarga de calcio que existe en el miocardio durante la reperfusión, que asociada a la recuperación de los depósitos de ATP desencadenaría postpotenciales y arritmias dependientes de calcio (8, 11, 69). En relación a este mecanismo se ha descrito un

efecto antiarrítmico del amiloride y otros inhibidores de la bomba Na^+/H^+ , o de la ryanodina que altera la captación de calcio por el retículo endoplásmico (11).

El otro mecanismo posiblemente responsable de la producción de arritmias de reperfusión depende de los radicales libres derivados del oxígeno (8, 69), habiéndose objetivado disminución en la incidencia de arritmias de reperfusión en relación al tratamiento con agentes anti-radicales libres (8, 69, 109). El efecto arritmogénico de los radicales libres en estas circunstancias se atribuye a alteraciones de la membrana celular con cambios en las corrientes eléctricas que alteran el potencial de acción y que, probablemente, también favorecen el efecto arritmogénico del calcio (8). Existen datos experimentales recientes (69, 110) que sugieren diferencias en la incidencia y probablemente en el mecanismo de producción entre la extrasistolia ventricular y la fibrilación ventricular que se producen durante la reperfusión. Parece demostrado el papel desencadenante de la reoxigenación en la producción de ectopia ventricular (y su incidencia disminuyó en tratamientos con agentes anti-radicales libres o con perfusión hipóxica durante la reperfusión) y, sin embargo, la influencia de la reoxigenación sobre la fibrilación ventricular en estas circunstancias es menos evidente (y su incidencia no se redujo con los citados tratamientos). Esto puede relacionarse con la presentación clínica de las arritmias de reperfusión, pues la extrasistolia ventricular y el ritmo idioventricular acelerado aparecen de forma precoz en el 60-80% de los pacientes con reperfusión eficaz, mientras que la fibrilación ventricular ocurre súbitamente y es poco frecuente, entre un 0-13% en diferentes series, a pesar de la permeabilización de la arteria (69, 110). Otros factores se han descrito como posibles desencadenantes de fibrilación ventricular en relación a variaciones en la concentración

de AMP cíclico, aumento de niveles de potasio extracelular o estimulación de receptores adrenérgicos (69).

A largo plazo, parece existir una mejoría de la estabilidad eléctrica del corazón en los pacientes que presentaban permeabilidad de la arteria responsable del infarto. La trombolisis disminuiría la incidencia de potenciales tardíos y de fibrilación ventricular primaria, y la realización de reperfusión miocárdica en una fase tardía para lograr reducir el tamaño del infarto podría, no obstante, disminuir la incidencia de arritmias ventriculares. Este efecto protector de la reperfusión tardía frente a las arritmias ventriculares se debe, probablemente, al mantenimiento de islotes celulares en el borde entre tejido viable y necrótico, a efectos sobre el remodelado o a la disminución en la incidencia de aneurismas ventriculares postinfarto (4).

2.8. Disfunción contráctil postisquémica: miocardio aturdido.

El aturdimiento miocárdico se ha definido como la disfunción mecánica que persiste tras la reperfusión del miocardio isquémico en ausencia de daño miocárdico irreversible (3, 8, 57, 112, 113). La severidad de esta disfunción viene determinada por la severidad y duración del episodio isquémico previo (112) y afecta tanto a la función sistólica como a la diastólica (113). La recuperación de la función contráctil transitoriamente alterada se produce en un período de tiempo variable, generalmente de 1 a 3 semanas. El miocardio aturdido presenta una respuesta positiva a la estimulación inotropa con dopamina, isoproterenol, calcio o epinefrina (8).

La causa de esta disfunción contráctil transitoria no es totalmente conocida y se han sugerido varios mecanismos de producción: déficit de los depósitos de ATP por insuficiente producción en las mitocondrias, alteración en la capacidad de utilizar energía en las miofibrillas, trastornos en la respuesta simpática del miocardio, defecto de perfusión miocárdica, alteración de la matriz colágena extracelular y disminución de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio (112). Sin embargo, más recientemente, la mayoría de los autores atribuye la producción de esta contusión miocárdica a tres mecanismos que probablemente actuarían en combinación: generación de radicales libres derivados del oxígeno, sobrecarga de calcio y desacoplamiento excitación-contracción debido a disfunción del retículo endoplásmico (3, 112, 113). En opinión de algunos autores (39), los leucocitos desempeñan un papel muy importante en la producción del aturdimiento miocárdico, por su capacidad de producir radicales libres, daño microvascular y reacción inflamatoria.

2.9. Precondicionamiento isquémico.

Los períodos breves y transitorios de isquemia miocárdica tienen un paradójico efecto protector frente a un posterior episodio isquémico prolongado (32-35). Este efecto cardioprotector, que se ha denominado precondicionamiento isquémico, se acompaña de una reducción en la utilización de fosfatos de alta energía y en el índice de glicolisis anaerobia, con disminución de la liberación de ácido láctico y otros catabolitos (32). En estas circunstancias, el miocardio que ha sido dañado de forma reversible presenta una mayor tolerancia ante un episodio de isquemia posterior, con retraso en la aparición de la necrosis celular (35), reducción de la acidosis y menor incidencia de arritmias ventriculares (33).

La causa de esta protección que produce el preconditionamiento no es conocida; se han planteado varios mecanismos, como el aumento de la circulación colateral (32-34), la deplección de glucógeno y nucleótidos de adenina con reducción de la producción de catabolitos deletéreos, la disminución de la actividad de enzimas proteolíticas secundaria a la reducción de la acidosis, la deplección de los depósitos de catecolaminas que atenúa la estimulación alfa y beta adrenérgica (34), el mantenimiento de los mecanismos de transporte de sodio que impiden su acumulación intracelular y reducen la posterior sobrecarga de calcio (114) o el aumento en el miocardio de las llamadas proteínas de "heat shock" que presentan un efecto protector (11). Algunas observaciones sugieren que la activación de los receptores alfa 1 de la adenosina proporcionan un efecto protector similar al preconditionamiento (115). También se ha planteado si los radicales libres derivados del oxígeno pueden tener un papel en la producción del preconditionamiento isquémico (35). Algunos autores intentaron analizar si la disfunción contráctil transitoria postisquémica, con la consiguiente reducción en el consumo de oxígeno, podría ser el origen del preconditionamiento, pero observaron que el efecto protector del preconditionamiento desaparece antes de que se recupere la función contráctil (32), y que el aumento de la tolerancia a la isquemia era independiente de los cambios en la demanda de oxígeno que se asocian al aturdimiento miocárdico (35). Sin embargo, se ha descrito que el preconditionamiento aportaba protección frente a la contusión miocárdica (33).

3.- ESTRATEGIAS TERAPEUTICAS.

El mayor conocimiento de los fenómenos relacionados con el proceso de isquemia y reperfusión ha dado lugar a varias líneas de investigación de posibles opciones terapéuticas que pretenden, por un lado, disminuir el daño isquémico y, por otro lado, prevenir el daño por reperfusión.

3.1. Estrategias terapéuticas para disminuir el daño isquémico.

3.1.1 Durante isquemia regional.

La reperfusión es la medida terapéutica más eficaz en el tratamiento de los pacientes con infarto agudo de miocardio. La fibrinólisis ha logrado disminuir sensiblemente la mortalidad en este grupo de pacientes debido no sólo a su capacidad para limitar el tamaño de la necrosis, sino también a que disminuye el riesgo de rotura cardíaca o arritmias graves y atenúa el efecto del remodelado ventricular izquierdo. El efecto beneficioso de la reperfusión es más acentuado cuanto más precozmente se logra, pero los intentos de acortar este tiempo de isquemia previo a la reperfusión chocan con difíciles problemas logísticos. En este sentido se han creado programas de fibrinólisis prehospitalaria que se encuentran todavía, en nuestro medio, en vías de realización. En la actualidad, en un 20-30% de los pacientes no se logra recanalizar la arteria y un 10-15% de los casos de reperfusión eficaz sufren reoclusión precoz. En el grupo de pacientes con shock cardiogénico secundario a infarto agudo de miocardio la eficacia del tratamiento fibrinolítico es aún menor. La recanalización

mecánica con angioplastia directa resulta un método alternativo de reperfusión en determinadas circunstancias (5, 48).

Una vez iniciada la secuencia del daño isquémico resulta difícil su tratamiento con drogas con potencial acción protectora, pues el área en riesgo permanece "aislada" y no se logra, en general, alcanzar concentraciones miocárdicas adecuadas de las sustancias. Mediante la retroperfusión desde el seno coronario es posible que estos tratamientos alcancen el área en riesgo, pero su aplicación precisa técnicas sofisticadas y no se emplea habitualmente. Los tratamientos que se han planteado como posibles protectores frente al daño isquémico han sido fundamentalmente: los agentes anti-radicales libres, los antagonistas de los canales del calcio y la hipotermia. En general, en la práctica clínica, el tratamiento de estos pacientes con isquemia regional va dirigido a disminuir el trabajo cardíaco mediante el control de la tensión parietal y la frecuencia cardíaca.

3.1.2. Estrategias terapéuticas durante isquemia global.

La importancia de obtener métodos que puedan limitar el daño producido por la isquemia global adquiere especial relevancia en dos situaciones: durante la cirugía cardíaca con circulación extracorpórea y en la preservación del corazón para trasplante.

En general, los métodos de protección frente a la isquemia global pretenden disminuir el consumo de oxígeno mediante el empleo de técnicas cardiopléjicas, habitualmente con solución hiperpotasémica en hipotermia. Sin embargo,

la protección que ofrecen estos métodos no es completa, y estudios clínicos y experimentales han mostrado alteración funcional y metabólica secundaria al daño por isquemia y reperfusión en estas circunstancias.

3.2. Estrategias terapéuticas para prevenir el daño por reperfusión.

La demostración experimental de que la actuación sobre las condiciones en las que se realiza la reperfusión (presión osmótica, temperatura, pH) puede modificar el efecto final de la misma, no sólo plantea una nueva posibilidad de tratamiento destinado a atenuar la lesión por reperfusión, sino que modifica además el concepto de daño isquémico irreversible. Según estos hallazgos, el destino final del miocito vendría determinado por su estado al inicio de la reperfusión, pero también por las condiciones en que se realiza esta reperfusión.

Se han planteado varias posibilidades de tratamiento frente al daño por reperfusión, entre las que destacan: la prevención de la sobrecarga de calcio, la actuación sobre los radicales libres derivados del oxígeno y el tratamiento del edema postreperfusión.

3.2.1. Prevención de la sobrecarga de calcio.

Durante la reperfusión existe un aumento de la concentración intracitoplasmática de calcio a la que algunos autores han atribuido un papel determinante en la producción del daño por reperfusión. Se ha intentado atenuar esta sobrecarga de calcio mediante el empleo de fármacos antagonistas de los canales del

calcio o mediante la reducción transitoria de la concentración de calcio durante la reperfusión.

A. Fármacos antagonistas de los canales del calcio.

Diversos estudios experimentales (116-120) han mostrado un efecto beneficioso del tratamiento con los fármacos antagonistas de los canales del calcio durante la isquemia y la reperfusión, aunque los resultados más favorables corresponden al tratamiento profiláctico o durante la fase de isquemia. Los ensayos clínicos diseñados para analizar la utilidad de estos fármacos durante el infarto agudo de miocardio no han obtenido resultados positivos (121-123), demostrando además un empeoramiento de los datos de insuficiencia cardíaca de los pacientes con disfunción ventricular izquierda sometidos a este tratamiento.

B. Perfusión hipocalcémica.

La reducción transitoria de la concentración de calcio pretendería evitar el daño producido por la sobrecarga de calcio durante la reperfusión (42, 116, 124-128), manteniendo, sin embargo, niveles de calcio suficientes para evitar la aparición de la paradoja del calcio. La mayoría de los autores han observado una mejoría en la protección del miocardio mediante el empleo de dosis bajas de calcio en la solución cardiopléjica durante la reperfusión.

3.2.2. Actuación sobre los radicales libres derivados del oxígeno.

Han sido diseñados diferentes estudios para valorar el efecto de los tratamientos anti-radicales libres sobre el tamaño final del infarto postreperusión. Se han empleado fármacos para inhibir la generación de radicales libres como alopurinol o deferoxamina (38, 101, 102, 104, 108) y sustancias eliminadoras como superóxido-dismutasa o catalasa (100, 103, 104). A pesar de la gran cantidad de estudios realizados, los resultados respecto a la posible reducción del tamaño del infarto son todavía contradictorios (8, 12, 31, 100). Se ha descrito un papel beneficioso de estas sustancias en el control de las arritmias de reperusión, en la disfunción contráctil postisquémica y en el daño microvascular postreperusión.

3.2.3. Tratamiento del edema postreperusión.

La reperusión con sustancias hiperosmóticas, fundamentalmente con manitol, puede tener efectos beneficiosos con reducción del área de necrosis (12, 36, 37), aunque los resultados de estos trabajos son aún controvertidos (16).

3.3. Utilidad de la inhibición de la contractilidad en la prevención del daño miocárdico por isquemia y reperusión.

La inhibición transitoria de la contractilidad es potenciamente muy útil para limitar los efectos nocivos de la isquemia y la reperusión. Durante la isquemia, la inhibición de la contractilidad disminuye el consumo de oxígeno asociado a la actividad contráctil residual, especialmente durante las fases tempranas del proceso.

La limitación del consumo de ATP y la disminución de la producción de catabolitos puede prolongar la viabilidad del miocardio. Durante la reperfusión, la inhibición contráctil sería potencialmente capaz de prevenir la hipercontractura que sucede en las células metabólicamente competentes y causa su destrucción.

Por todo ello, la investigación de métodos capaces de controlar adecuadamente la contractilidad ha constituido un objetivo prioritario en la lucha contra el daño por isquemia y reperfusión, especialmente durante la cirugía con circulación extracorpórea, situación en la que el soporte externo del flujo sistémico hace más fácil la utilización de esta estrategia.

Sin embargo, la inhibición contráctil no es un objetivo fácil de alcanzar. Un fármaco ideal para conseguir esta inhibición de la contractilidad debería poseer las siguientes propiedades:

- Ser capaz de inhibir de forma completa la contractilidad y prevenir el rigor y la contractura que suceden en el miocardio durante la isquemia y la reperfusión.

- Tener un efecto sobre la contractilidad dependiente de la concentración.

- Actuar de forma rápida, en segundos.

- Actuar de forma completa y rápidamente reversible.

- No alterar de forma importante las propiedades del miocardio a las concentraciones capaces de inhibir la contractilidad.

- Poder ser administrada regionalmente.

- No poseer efectos sobre el miocardio no isquémico.
- No tener efectos tóxicos extracardíacos.

Ningún agente conocido cumple todos estos requisitos. Sin embargo, la 2,3 butanodiona monoxima o diacetil monoxima (BDM) presenta propiedades que la hacen potencialmente útil como inhibidor de la contractilidad. De hecho, estudios previos han demostrado que la BDM podría cumplir los requisitos anteriormente expuestos, a excepción de los dos últimos.

Este trabajo orienta sus objetivos a la evaluación de la BDM como agente inhibidor de la contractilidad durante la isquemia y la reperfusión secundaria a una oclusión coronaria transitoria. El principal reto de esta aplicación es la consecución de una cardioplejia controlada y selectiva del área miocárdica sometida a isquemia y reperfusión, que permita al miocardio no isquémico continuar manteniendo la circulación sistémica.

II. OBJETIVOS

II. OBJETIVOS

El objetivo fundamental de este estudio fue valorar la posibilidad de inhibir de forma reversible y selectiva la contractilidad en un segmento de miocardio, mediante la infusión intracoronaria de 2,3 butanodiona-monoxima.

Otros objetivos del estudio incluyeron:

-Valorar la posible influencia de la concentración de calcio extracelular en la acción de la BDM sobre la contractilidad.

-Analizar los cambios que la oclusión coronaria y la reperfusión producen sobre la contracción segmentaria en un modelo sin circulación colateral.

-Evaluar el efecto de la BDM sobre estos cambios de la contracción segmentaria que ocurren durante la isquemia y la reperfusión.

El estudio se realizó sobre un modelo porcino "in vivo" que carece de circulación colateral importante al igual que sucede en la especie humana. Se empleó un sistema de ligadura atraumática de la arteria coronaria descendente anterior

que permitía su oclusión transitoria. La infusión de las soluciones se realizó de forma selectiva mediante cateterismo de la arteria descendente anterior. El análisis de la contractilidad segmentaria se realizó mediante la técnica de ultrasonidos a través de la implantación de microcristales piezoeléctricos en el miocardio ventricular izquierdo.

III. MATERIAL Y METODOS

III. MATERIAL Y METODOS

1.-MODELO EXPERIMENTAL.

1.1. Animales.

Este estudio se realizó sobre un total de 26 cerdos de raza "Large White" con un peso medio de 33.23 ± 3.15 kg., de los cuales el 61% eran machos.

1.2. Procedimiento quirúrgico.

Los animales permanecieron en ayunas durante las 12 horas previas a la cirugía. Aproximadamente 30 minutos antes de su paso a quirófano, recibieron medicación preanestésica con diazepam (0.15 mg/kg) y azaperona (5 mg/kg) vía subcutánea.

A continuación fueron trasladados al quirófano donde se procedió a canalizar la vena marginal de la oreja, con un catéter abbocath (20G ABBOT). Esta línea venosa se mantuvo con suero salino al 0.9% y se empleó para la administración de medicación anestésica. La anestesia se realizó con tiopental sódico vía intravenosa. La dosis empleada para inducción anestésica fue de 10 mg/kg. El mantenimiento se

logró mediante dosis adicionales de 100-200 mg, administradas lentamente por vía intravenosa, en la cantidad mínima necesaria para inhibir los movimientos y la respiración espontánea.

Posteriormente, se procedió a intubación orotraqueal con laringoscopio de pala recta y tubo endotraqueal (número 6-8). La ventilación mecánica se mantuvo mediante respirador volumétrico (Boyle Modular, Medishield). Los parámetros de concentración de oxígeno, frecuencia respiratoria y volumen minuto se adaptaron según gasometrías arteriales seriadas para mantener de forma estable valores de pCO₂ entre 37-44 mmHg y de pH entre 7.37-7.43 (Autoanalizador de gases modelo AVL Gas Check 938 C. Schatzmann).

El acceso al corazón se logró mediante esternotomía media (con esternotomo de LEBSCHÉ) y pericardiotomía en "T" invertida, lo cual permitió un fácil abordaje de la salida de los grandes vasos y de la superficie anteroapical del corazón, con el trayecto de la arteria coronaria descendente anterior. Se procedió a disección roma de esta arteria en su segmento medio. A continuación se rodeó con un filamento Ti-Crown 2-0, cuyos dos extremos se introdujeron a través de una porción de 20-25 mm. de un tubo de Nelaton fino, formando así una lazada. De esta forma se conseguía la oclusión atraumática de la arteria, tensando la lazada mediante una pinza colocada distalmente en el tubo Nelaton. La pared de la arteria se protegió situando sobre el vaso, en el punto de presión, otra porción del mismo material. La reperfusión se conseguía fácilmente, disminuyendo la tensión de la lazada, tras abrir la pinza y desplazar el tubo elástico (**figura 1**)

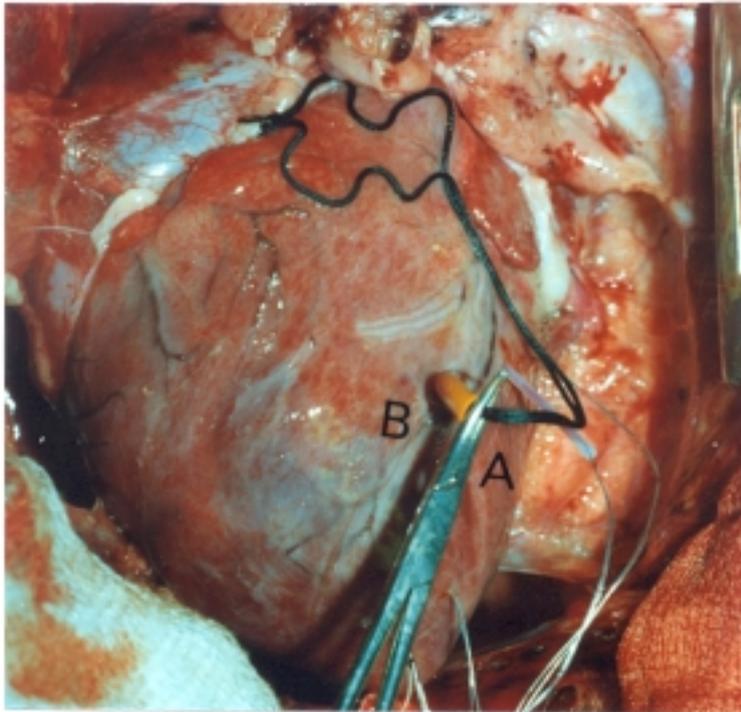


Figura 1: Sistema de ligadura atraumática de la arteria coronaria descendente anterior (A). Distalmente podemos observar el relieve que produce el extremo del catéter de infusión intracoronaria (B).

1.3.INSTRUMENTACION.

1.3.1.Colocación de catéteres para monitorización hemodinámica.

Tras disecar la arteria y la vena femorales derechas, se introdujeron sendos catéteres tipo TYGON 5F, situando sus extremos distales en la aorta abdominal y en la porción superior de la vena cava inferior, respectivamente. La vía arterial se conectó a un sistema de monitorización de presión, empleándose la vía venosa central para infusión de medicamentos y sueros.

En cinco de los animales se insertó un catéter abbocath (14G ABBOT) a través de ápex, hasta el interior de la cavidad ventricular izquierda, que se conectó a un sistema de monitorización de presión.

1.3.2.Cateterismo de la arteria interventricular anterior.

En la región cervical anterior se realizó una incisión longitudinal, paralela a la tráquea, unos 4 cm. a la derecha de la línea media, que permitió el acceso a la arteria carótida común derecha. Tras la disección roma del vaso se realizó una arteriotomía longitudinal de aproximadamente 3 mm. por la cual se colocó un catéter guía Judkins 8F para coronaria derecha, conectado a una válvula antirreflujo (USCI). Este catéter se fue introduciendo lentamente a lo largo de la aorta ascendente, con su extremo orientado ligeramente hacia la izquierda y delante, al tiempo que se palpaba la pared izquierda de la raíz aórtica, situando el dedo índice izquierdo entre la arteria pulmonar y la orejuela izquierda.

Con ayuda de la palpación del extremo distal del catéter a través de la pared aórtica se lograba, mediante pequeños movimientos para orientarlo, cateterizar el tronco principal de la arteria coronaria izquierda y, de igual forma, el origen de la arteria descendente anterior. A continuación, se pasó a través del catéter guía un catéter Rentrop 4F para infusión intracoronaria (USCI), cuyo extremo se dirigió hacia la porción distal de la arteria descendente anterior bajo inspección visual. Posteriormente, el catéter guía se retiró del tronco de la coronaria izquierda, situándolo en la luz de la raíz aórtica. El catéter Rentrop se dejó colocado con su extremo 5 mm. distal al lugar en que se había realizado la disección de la arteria coronaria descendente anterior (**figura 2**).

Durante el procedimiento de cateterismo selectivo, se puso especial cuidado para evitar una excesiva presión sobre el tronco de la coronaria izquierda o el tracto de salida del ventrículo izquierdo. Se mantuvo una vigilancia continua del trazado electrocardiográfico, de la presión aórtica y, especialmente, del registro de la función segmentaria, siendo inmediatamente retirados los catéteres si se observaba alteración electrocardiográfica, descenso importante de la presión arterial o anomalía en la contracción en las áreas miocárdicas monitorizadas

Los animales recibieron heparina sódica (160 UI/Kg) y lidocaína (1 mg/Kg), administradas ambas en dosis única intravenosa, inmediatamente antes de iniciar las maniobras de cateterismo de la arteria descendente anterior.

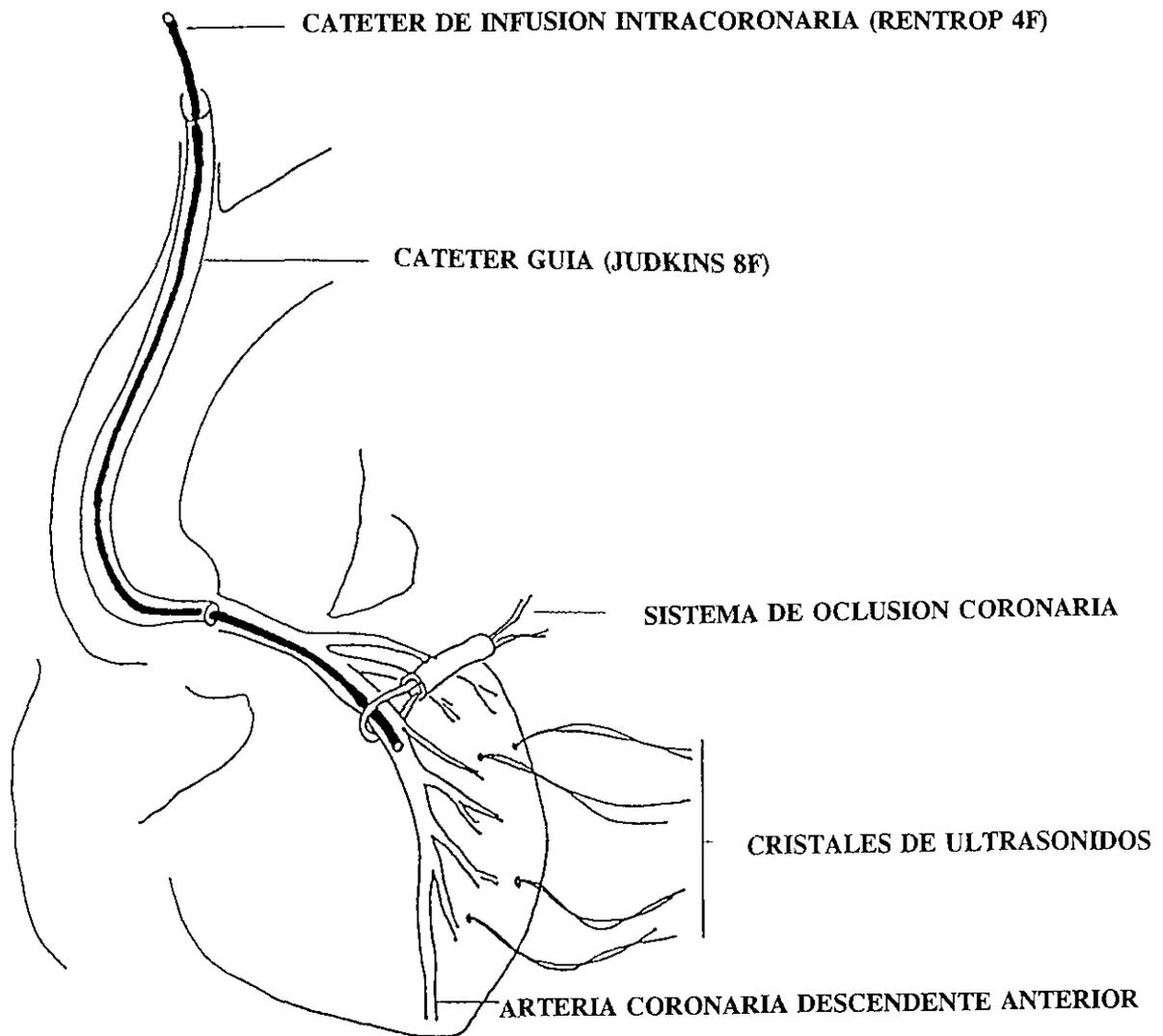


Figura 2: Cateterismo selectivo de la arteria coronaria descendente anterior (DA). Se representa también el sistema de oclusión coronaria atraumática y la colocación de las parejas de cristales de ultrasonidos en el segmento dependiente de la DA y en el segmento control.

La infusión intracoronaria se realizó conectando el extremo proximal del catéter Rentrop a una jeringa colocada en una bomba de infusión tipo HARVARD P-975, que se programó a 3, 6 ó 9 ml/min de acuerdo con el protocolo.

1.3.3. Implantación de cristales piezoeléctricos.

Insertamos en todos los animales pequeños cristales piezoeléctricos de 1 mm. de diámetro (6 MHz) que con ayuda de pinzas colocamos cerca del subendocardio, a través de pequeñas incisiones epicárdicas. Se situaron sobre una línea perpendicular al eje largo del ventrículo izquierdo, dispuestos en parejas, con sus superficies enfrentadas y una separación entre ambos de 1-2 cm. La contracción segmentaria era monitorizada en cada animal colocando dos parejas de cristales de ultrasonidos, una en el miocardio dependiente de la arteria coronaria descendente anterior que iba a ser ocluida (segmento isquémico) o infundida, y otra en el miocardio-control en la pared posterolateral del ventrículo izquierdo (segmento control). Ver **figura 2.**

2.-MONITORIZACION.

2.1. Hemodinámica y electrocardiográfica.

Durante la estancia del animal en el quirófano, se mantuvo monitorización electrocardiográfica continua en una derivación (generalmente DII) en que fuera adecuadamente visualizada la actividad auricular y ventricular, por medio de un módulo de ECG HEWLETT-PACKARD, modelo 8811D.

Mantuvimos monitorización continua de la curva de presión aórtica y, en cinco animales también de la presión ventricular izquierda, mediante cápsulas de cuarzo (HEWLETT-PACKARD 1290A) conectadas a un polígrafo (HEWLETT-PACKARD 78308A), estableciendo como nivel cero de referencia la aurícula derecha media. Tanto el electrocardiograma como las curvas de presión aórtica y ventricular izquierda eran visualizadas de forma continua en la pantalla del polígrafo. De esta última presión ventricular izquierda se pudo obtener, a través de un amplificador HEWLETT-PACKARD, modelo 8802A, la curva de la Dp/dt del ventrículo izquierdo.

El polígrafo se conectó a una registradora de 16 canales de chorro de tinta (SIEMENS ELEMA AB), que permitió registro continuo y simultáneo de una derivación del ECG de superficie, de las presiones aórtica y ventricular izquierda, de la Dp/dt del ventrículo izquierdo y de las medidas de función regional de ambos segmentos, isquémico y control (ver apartado 2.2. Contracción segmentaria).

Figura 3.

La velocidad básica de registro fue de 10 mm./s. que se aumentó a 25, 50 ó 100 mm./s. cuando fue necesario para la correcta interpretación de los trazados. En general se registró a 50 mm./s. durante varios segundos en los siguientes períodos: previo a la oclusión coronaria, antes de iniciar la infusión intracoronaria, prerreperusión, y a los 3, 5 y 30 minutos postreperusión, para permitir mediciones adecuadas de ambos segmentos.

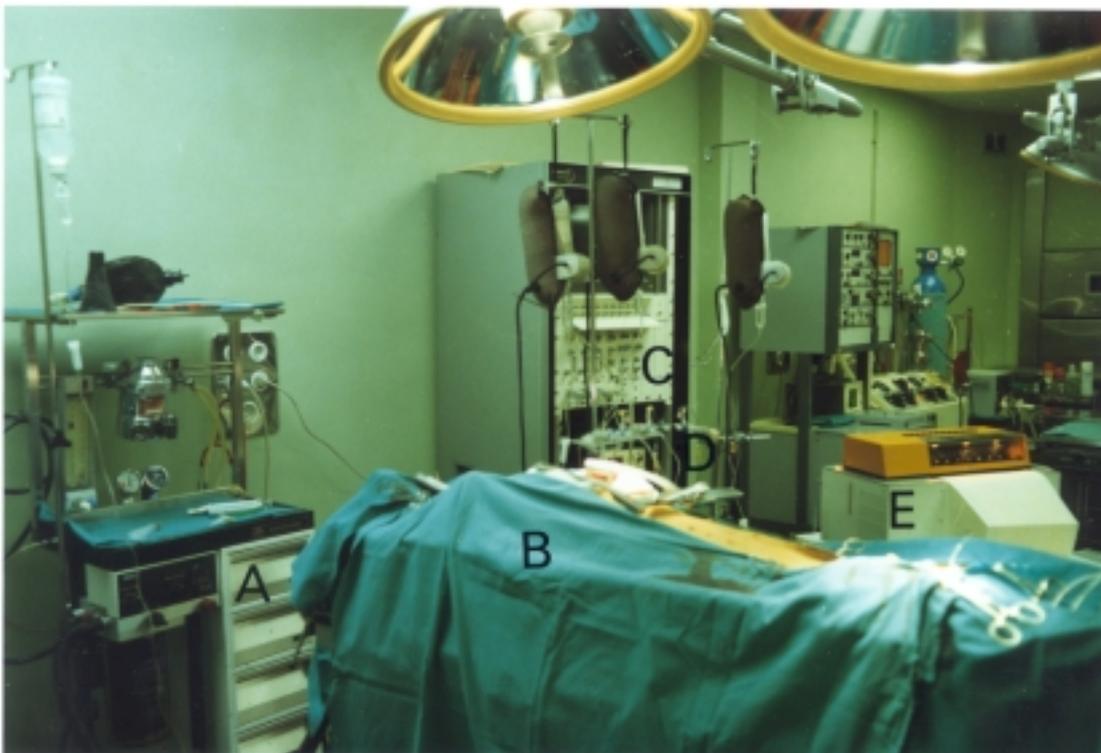


Figura 3: Quirófano durante el procedimiento: A: Respirador.
B: Animal sobre la mesa de quirófano. C: Polígrafo. D: Transductores de presión.
E: Registradora.

Los animales que sufrieron fibrilación ventricular durante el procedimiento fueron tratados con cardioversión eléctrica. Aquéllos que en un tiempo menor de dos minutos no recuperaron ritmo cardíaco hemodinámicamente eficaz o bien requirieron más de tres choques, fueron excluidos del experimento.

2.2. Contracción segmentaria. Cristales piezoeléctricos.

Obtuvimos mediciones continuas de las dimensiones de los dos pequeños segmentos de miocardio (control e isquémico) de forma simultánea mediante la utilización de microcristales piezoeléctricos (SCHUESSLER, Ultrasonic Dimension System). **Figura 4.**

Los cristales piezoeléctricos tienen la propiedad de modificar su forma al ser estimulados por cambios de voltaje, transmitiendo su deformación al medio en forma de onda de presión u onda de ultrasonidos (emisión). De forma similar, al ser estimulados (en recepción) por ondas de ultrasonidos generan cambios de voltaje. El método está basado en la medida del llamado "tiempo de tránsito" del ultrasonido. Un cristal es excitado por un pulso de 200 v. durante 0.2 microsegundos; el pulso de ultrasonido resultante viaja a través del miocardio hacia el cristal opuesto, en un tiempo proporcional a la separación entre los cristales. El módulo analizador genera un voltaje proporcional al "tiempo de tránsito", que indica la distancia entre los cristales en cada instante. La frecuencia de repetición de pulsos es de 1 KHz para lograr una medición prácticamente continua de las dimensiones de los segmentos de miocardio que corresponden a la línea entre cada pareja de cristales.

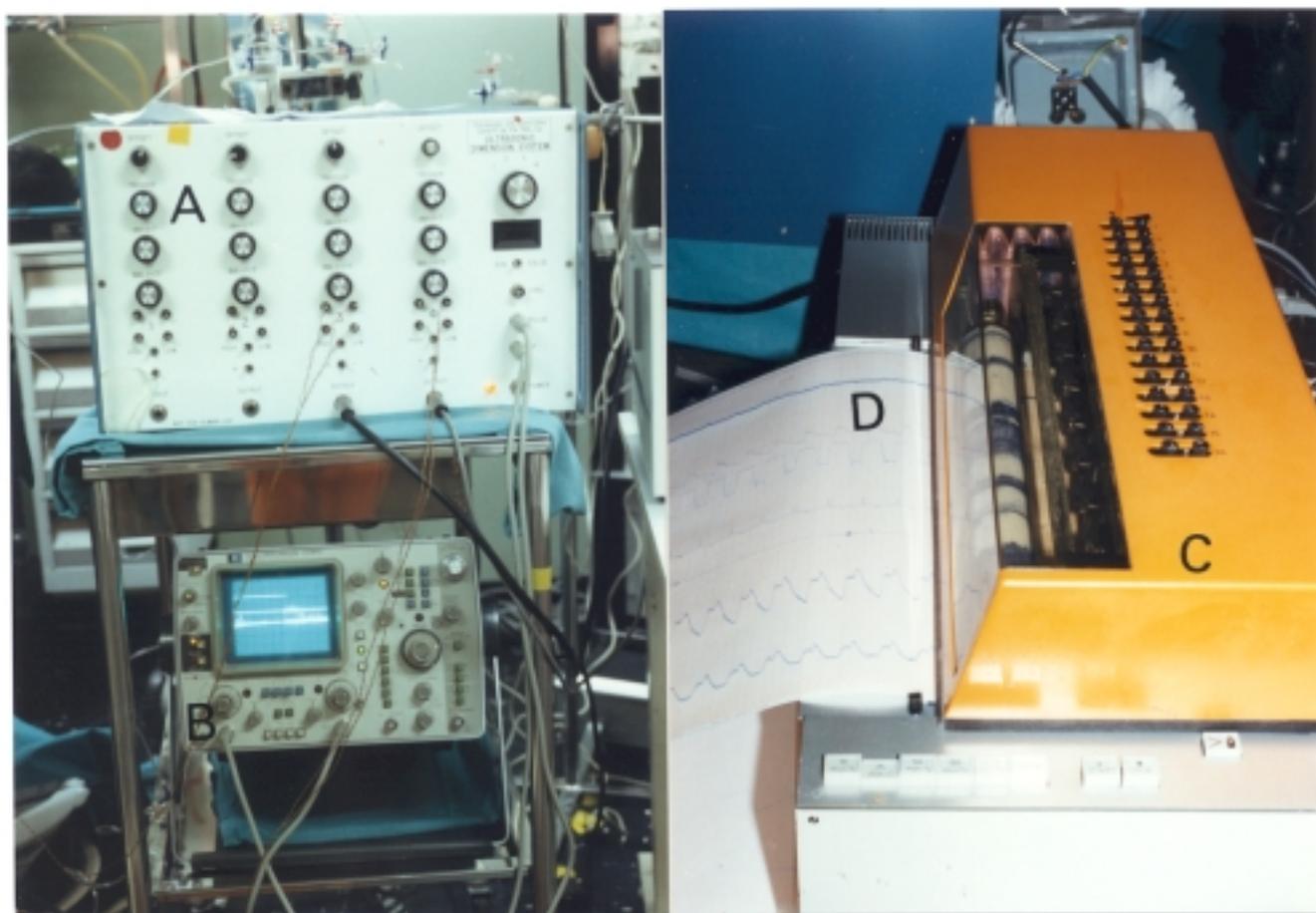


Figura 4: Equipo de registro de ultrasonidos. A: Sistema de microsonometría. B: Osciloscopio. C: Registradora. D: Registro simultáneo correspondiente a ECG, presiones y contracción segmentaria.

De esta forma, tras emitirse un pulso de ultrasonidos, el generador inicia una producción de voltaje que aumenta progresivamente con el tiempo. Cuando el módulo analizador detecta el pulso recibido, el valor del voltaje en ese instante se toma como medida de la distancia entre los dos cristales y el generador de voltaje se sitúa en cero hasta la aparición del siguiente pulso.

Los pulsos de ultrasonidos constan de varias ondas y resulta inevitable la existencia de un cierto nivel de "ruido". Por ello, el módulo analizador debe ser capaz de reconocer la primera onda representativa del pulso y, de esta forma, medir siempre el "tiempo de tránsito" con referencia a esa misma onda. Para lograrlo, se deben ajustar los controles del equipo de ultrasonidos con ayuda de un osciloscopio sincronizado con la emisión de cada pulso (el cual permite visualizar simultáneamente la señal recibida y la medición que el sistema realiza del "tiempo de tránsito").

Así pues, para obtener una medición exacta y fiable de las dimensiones de los segmentos se deben ajustar los controles de emisión y los de análisis del pulso de ultrasonidos (recepción). Entre los primeros, los más importantes son el nivel de energía y la polaridad y, entre los segundos, el umbral de amplitud, la zona de supresión y el balance. Se definen de la siguiente forma:

1.- CONTROLES DE EMISION.

Nivel de energía: amplitud del pulso de la onda de ultrasonidos.

Polaridad: sentido de la primera deflexión del pulso de ultrasonidos (positiva o negativa).

2.- CONTROLES DE RECEPCION.

Umbral: amplitud mínima de la onda del pulso de ultrasonidos recibida que da lugar a interrupción en la generación de voltaje.

Zona de supresión: intervalo mínimo a partir de la emisión del pulso en el que cualquier cambio de potencial es ignorado y no puede provocar interrupción en la generación de voltaje.

Balance: función de corrección de la atenuación que pueda sufrir el pulso de ultrasonidos al separarse los cristales. Similar a la compensación de la ganancia en el tiempo.

Los "tiempos de tránsito" se traducen en medidas de longitud (mm) conociendo la velocidad de propagación de la onda de ultrasonidos a través del miocardio (1570 m/s.). De esta forma, 1 microsegundo corresponde aproximadamente a 1.5 mm.

La representación en un sistema de coordenadas de la separación entre los cristales respecto al tiempo (distancia/tiempo) da lugar a una curva que permite analizar distancias y velocidades entre los cristales en cada momento. Los trazados se calibran mediante registro de "tiempos de tránsito" conocidos, generados

por el equipo. Para detectar y corregir cualquier posible deriva, se repite la calibración al finalizar cada registro.

Las mediciones se realizaron sobre papel de registro continuo, simultáneamente con una derivación del ECG de superficie y las presiones aórtica y ventricular izquierda, como ya se ha comentado anteriormente. Las variaciones debidas a la respiración fueron mínimas en esta preparación.

Los principales accidentes morfológicos de la curva que representa la longitud segmentaria del ventrículo izquierdo aparecen en la **figura 5**.

Las longitudes telediastólica y telesistólica son fácilmente identificables en los registros de ambos segmentos en los períodos de oclusión coronaria, preoclusión y postoclusión. La telediástole (TD) corresponde al punto de inicio del acortamiento durante la contracción isovolumétrica, inmediatamente después de la onda "A" (coincidiendo con el inicio del ascenso rápido de la curva de presión ventricular izquierda).

La telesístole (TS) se identifica por una pequeña muesca en la curva de acortamiento, que corresponde al cierre de la válvula aórtica al inicio de la relajación isovolumétrica (coincide con la onda dicrota de la curva de presión aórtica).

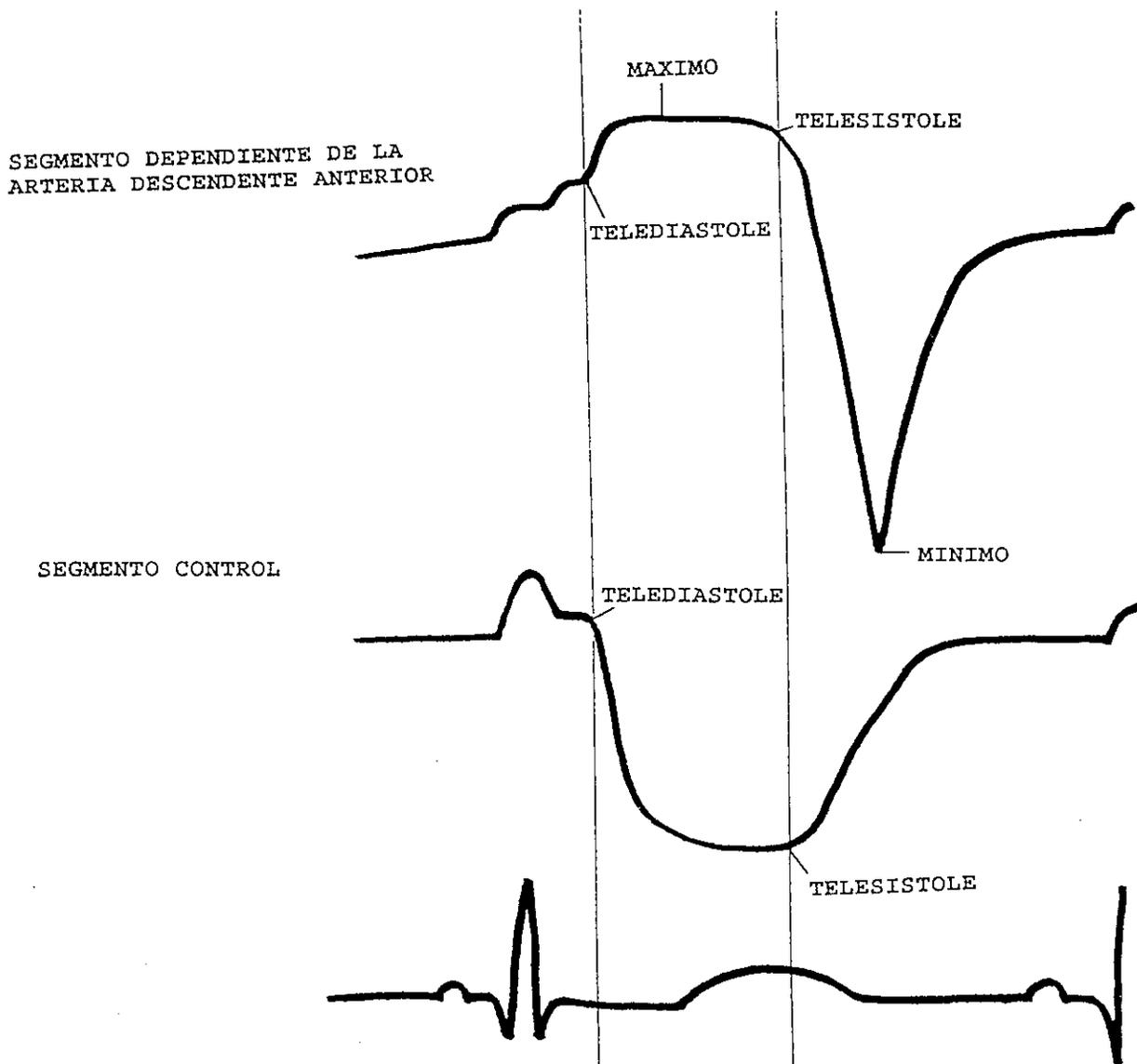


Figura 5: Esquema ilustrativo del método seguido para identificar los distintos parámetros analizados en las curvas de longitud segmentaria obtenidas mediante cristales piezoeléctricos. En presencia de inhibición contráctil por isquemia o inducida por BDM, estos parámetros se definieron por referencia a la curva del miocardio control. Ver explicación en el texto.

La fracción de acortamiento (FA) se define a partir de las mediciones de la longitud telediastólica (LTD) y la longitud telesistólica (LTS):

$$FA (\%): \frac{LTD - LTS}{LTD} \times 100$$

El acortamiento sistólico en el segmento isquémico durante la oclusión coronaria es sustituido por un fenómeno paradójico de abombamiento holosistólico, que parece corresponder a un movimiento pasivo determinado por la pérdida de capacidad contráctil del segmento isquémico y por los cambios de tensión en el interior de la cavidad ventricular izquierda (34, 64-67, 117).

La telesístole, en el registro de ambos segmentos en situación basal y en el control durante la oclusión coronaria, aparece como el punto de menor amplitud de la señal. En el período de oclusión, en el segmento isquémico, la telesístole corresponde al inicio del acortamiento durante la relajación isovolumétrica y marca el final de la expansión sistólica.

También se midieron las longitudes máxima (L max) y mínima (L min) en el segmento isquémico cuando éstas no coincidieron con las fases de telediástole y telesístole (en situación de contracción segmentaria alterada). Se define el "porcentaje de abombamiento" como:

$$\% \text{ ABOMBAMIENTO: } \frac{L \text{ max} - LTD}{LTD} \times 100$$

3.-SOLUCIONES PARA INFUSION INTRACORONARIA.

Las soluciones para infusión intracoronaria deben cumplir requisitos más estrictos que las empleadas vía sistémica. Es necesaria una solución fisiológica (normosmótica, normoiónica y normooncótica) puesto que se utilizará como medio de perfusión coronaria antes de la reperfusión.

Las soluciones se preparaban 30 minutos antes de su utilización y se mantenían en baño a 37°C. (Termostato Electrónico Selecta 121523). En los primeros experimentos, se comprobó, mediante la utilización de filtros Millipore, la ausencia de partículas o microburbujas.

3.1.Solución control.

Se prepara a partir de una solución de Ringer lactato a la que se añaden 50 gr./l. de albúmina bovina (Boehringer Mannheim Laboratories) para lograr una presión oncótica fisiológica (16 mm. Hg.) La disolución de la albúmina se lograba mediante inmersión del recipiente que contiene la preparación en un baño de ultrasonidos (Ultrasonic Cleaner, Branson B 220).

El pH se equilibraba a 7 mediante la adición de NaOH 0.1 M. Considerando la acidosis tisular del miocardio isquémico en el momento de la reperfusión, empleamos una solución acidótica con el fin de evitar la posible interferencia sobre nuestros resultados de una normalización brusca del pH extracelular. La

concentración fisiológica de calcio iónico (1.3 mM) se consiguió añadiendo cloruro cálcico.

Antes de cada experimento, se tomaron muestras de las soluciones para comprobar las concentraciones iónicas (**Tabla 1**), la osmolaridad, la presión oncótica (que era aproximadamente de 19 mm Hg), y la concentración de calcio total. La osmolaridad fue algo mayor en las soluciones a las que añadimos BDM, de 322 ± 17 mOsm, frente a 264 ± 14 mOsm de la solución control. La concentración de calcio total estaba elevada en la solución "BDM" con concentración de calcio corregida, para lograr una concentración de calcio iónico similar a la de la solución control (15.2 ± 3.27 mM). Los equipos empleados para estas determinaciones fueron: Osmómetro Fiske Osmometer, Oncómetro Boehringer Ingelheim BMT 921, Autoanalizador Stat Profile Nova Biomedical, Calcímetro Corning Calcium Analyzer 940 Izaasa.

3.2. Solución "BDM" (2,3-butanodiona monoxima).

Realizada a partir de la solución control a la que se añade 2', 3'-butanodiona monoxima (Laboratorios Scharlau, Madrid) inmediatamente antes de la infusión, para lograr una concentración de 6 gr./l. (54.3 mM). Empleamos balanza de precisión Mettler H31 AR. Los estudios analíticos realizados permiten comprobar que la adición de BDM a la solución provoca una disminución de la concentración de calcio iónico hasta valores que en nuestra preparación fueron de 0.5 ± 0.02 mM.

Con objeto de analizar la interacción entre BDM y calcio iónico se preparan otras dos soluciones a partir de las previas:

TABLA 1

Composición de las soluciones empleadas en las distintas fases del experimento

	pH	Na ⁺	K ⁺	Ca ⁺⁺
SOLUCION CONTROL	6.65±0.04	136.7±0.86	5.44±0.08	1.41±0.05
SOLUCION BDM	6.71±0.02	137.6±0.84	5.07±0.06	0.49±0.02
SOLUCION CONTROL CON Ca DISMINUIDO	6.95±0.04	138.0±3.33	4.53±0.19	0.66±0.03
SOLUCION BDM CON Ca AUMENTADO	6.78±0.02	140.0±1.96	4.76±0.10	1.04±0.05

MEDIA±SEM

3.3.Solución control modificada, con concentración de calcio iónico disminuida.

En esta solución se disminuyó la concentración de calcio iónico de la solución control hasta valores similares a los de la solución "BDM" (ver **tabla 1**); con ello se intentaba valorar un posible efecto independiente producido por la baja concentración de calcio iónico, secundario a las propiedades quelantes de la BDM.

3.4.Solución "BDM" modificada, con concentración de calcio iónico corregida.

Esta solución se preparó a partir de la solución "BDM", a la que se añadió cloruro cálcico para lograr una concentración de calcio iónico similar a la de la solución control (ver **tabla 1**), con el objeto de corregir el efecto quelante de la BDM sobre el calcio.

4.-PROTOCOLO DE ESTUDIO.

Este estudio se realizó sobre un total de 26 animales a los que se sometió a diferentes protocolos experimentales diseñados específicamente para responder a cada uno de los objetivos planteados. Básicamente, estos protocolos fueron diseñados para analizar la función contráctil regional durante la infusión intracoronaria de distintas soluciones en las que se había modificado la concentración de calcio libre y/o añadido BDM, así como durante la oclusión coronaria y la reperfusión.

Para analizar los cambios en la contracción segmentaria producidos por estas maniobras se emplearon diversos controles como referencia: 1.-La función miocárdica previa a la infusión u oclusión coronaria. 2.-La función del miocardio control. 3.-El efecto de una solución placebo (en el caso de infusiones intracoronarias con BDM y/o concentración de calcio iónico modificada). La oclusión coronaria permitió comprobar la correcta colocación de los cristales, así como tener una referencia de la severidad de los cambios producidos.

En todos los animales se aplicó el procedimiento quirúrgico previamente descrito (1.2). Se colocaron catéteres para monitorización hemodinámica con vías centrales venosa y arterial. En 5 animales se colocó un catéter a través de ápex en el interior de la cavidad ventricular izquierda para monitorización de la presión del ventrículo izquierdo (1.3.1). En todos se realizó cateterismo de la arteria descendente anterior (1.3.2) y se implantaron cristales piezoeléctricos en el miocardio ventricular izquierdo (1.3.3). Fueron sometidos durante todo el procedimiento a monitorización hemodinámica y electrocardiográfica (2.1), así como de la contracción segmentaria (2.2).

En algunos animales se aplicaron sucesivamente varios protocolos de estudio con distintas soluciones intracoronarias tras comprobar la completa y rápida normalización, en un período menor de 3 minutos, de todos los parámetros estudiados al cesar la infusión de las distintas soluciones. Las infusiones consecutivas en el mismo animal se separaron por un intervalo de tiempo mayor de diez minutos. El orden de infusión no fue seleccionado. La oclusión coronaria se realizó siempre en último lugar para evitar la interferencia de posibles alteraciones persistentes

de la función miocárdica ("miocardio aturdido"). Sin embargo, pudimos comprobar recuperación completa en 5 minutos tras un período de oclusión coronaria de 5 minutos.

Consideramos los experimentos en 3 grupos de estudio:

4.1. Efecto de la infusión intracoronaria sin isquemia.

4.1.1. Estudio del efecto del calcio extracelular sobre la contracción segmentaria.

4.1.2. Estudio del efecto de la infusión de BDM sobre la contracción segmentaria.

4.1.3. Estudio del efecto de la interacción entre el calcio extracelular y la BDM sobre la contracción segmentaria.

4.2. Efecto de la oclusión coronaria transitoria sobre la contracción segmentaria.

4.3. Efecto de la infusión intracoronaria durante la isquemia y la reperfusión.

4.1.Efecto de la infusión intracoronaria sin isquemia.

4.1.1.Estudio del efecto del calcio extracelular sobre la contracción segmentaria.

Para este estudio realizamos infusión intracoronaria de la solución control (ver composición en **tabla 1**) durante 5 minutos a una velocidad de infusión de 9 ml/min. Este experimento se realizó en 6 animales.

Los resultados previos se compararon con los obtenidos durante la infusión intracoronaria de la solución control modificada, con concentración de calcio iónico disminuida (ver composición en **tabla 1**). En este caso, los animales recibieron durante 5 minutos infusión intracoronaria, a través del catéter Rentrop, de la solución control modificada a una velocidad de infusión de 9 ml/min. Este experimento se realizó en 8 animales.

4.1.2. Estudio del efecto de la infusión de BDM sobre la contracción segmentaria.

Se analizó el efecto sobre la contracción segmentaria de la infusión intracoronaria de la solución "BDM" (ver composición en **tabla 1**) durante 5 minutos, a una velocidad de infusión de 9 ml/min y se comparó con la infusión de la solución control a la misma velocidad durante igual período de tiempo. Esto se realizó de forma secuencial en el mismo animal en 10 casos. En un subgrupo de 4 animales se evaluó la respuesta a dosis variables de BDM, disminuyendo la velocidad de infusión a 6 ml/min y a 3 ml/min durante períodos de tiempo de 8 y 10 minutos, respectivamente.

4.1.3. Estudio del efecto de la interacción entre el calcio extracelular y la BDM sobre la contracción segmentaria.

Se analizó el efecto sobre la contracción segmentaria de la infusión intracoronaria de la solución "BDM" modificada, con concentración de calcio iónico aumentada (ver composición en **Tabla 1**), durante 5 minutos, a una velocidad de infusión de 9 ml/min en 8 animales y se comparó con la infusión de la solución BDM a la misma velocidad durante igual período de tiempo. Esto se realizó de forma secuencial en el mismo animal en 8 casos.

4.2.Efecto de la oclusión coronaria transitoria sobre la contracción segmentaria.

En 17 animales se realizó una oclusión coronaria transitoria durante 5 minutos seguida de reperfusión.

4.3. Efecto de la infusión intracoronaria durante la isquemia y la reperfusión.

Los animales, en este caso, fueron sometidos a un protocolo que consistió en oclusión de la arteria descendente anterior durante 51 minutos seguida de reperfusión, que se lograba mediante la liberación de la lazada del sistema de oclusión atraumática. Se inició infusión intracoronaria de la solución control o BDM durante los 3 últimos minutos de oclusión coronaria y se mantuvo durante 33 minutos durante la reperfusión. La velocidad de infusión fue de 9 ml/min durante los 6 primeros minutos (3 minutos durante oclusión coronaria y 3 minutos durante reperfusión), luego se disminuyó progresivamente, manteniéndola a 6 ml/min durante 10 minutos y a 3 ml/min

durante 20 minutos (**Figura 6**). El experimento se realizó en 16 animales, con infusión de la solución control en 8 animales e infusión de la solución "BDM" en otros 8 casos. Ninguno de estos animales había recibido previamente otras infusiones intracoronarias.

5.-ANALISIS ESTADISTICO.

El análisis estadístico se realizó con la ayuda de un "paquete" estadístico disponible en el mercado (SPSS/PC, V 4.0; Chicago, Illinois, USA). La existencia de diferencias entre varios grupos se investigó mediante análisis de la varianza (ANOVA), después de comprobar la ausencia de desviaciones de los datos respecto a la distribución normal. Las comparaciones individuales se realizaron mediante la prueba de Duncan, pero únicamente después de haber excluido la hipótesis de homogeneidad mediante el ANOVA. Cuando se consideraron solamente dos grupos, las comparaciones se realizaron mediante la prueba de la t de Student. En caso de desviación significativa de los datos respecto a la distribución normal se utilizó la prueba de Kruskal-Wallis para comparaciones entre varios grupos y la de Wilcoxon para dos grupos. Los cambios en los parámetros fisiológicos a lo largo del experimento se realizaron mediante análisis de varianza de dos vías. El nivel de significación, para todas las pruebas de hipótesis, se fijó en $p < 0.05$. Todos los datos se expresaron como media \pm error típico de la media.

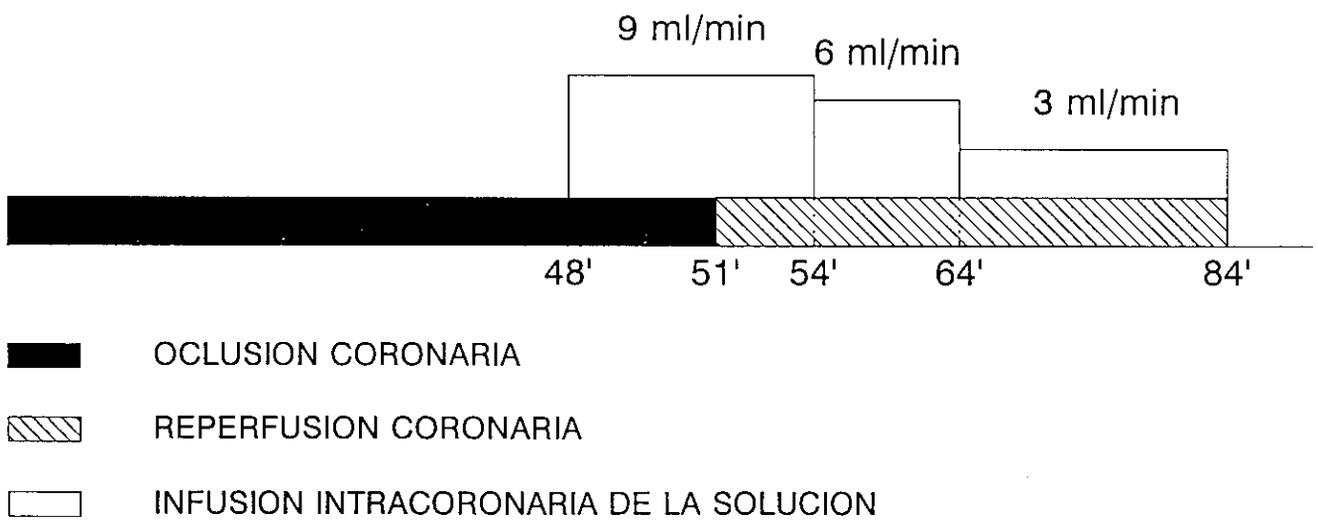


Figura 6: Protocolo de infusión intracoronaria durante las fases de isquemia y de reperfusión.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1.-EFECTO DE LA INFUSION INTRACORONARIA SIN ISQUEMIA

1.1.Estudio del efecto del calcio extracelular sobre la contracción segmentaria.

1.1.1.Infusión intracoronaria de la solución control.

A.-Datos hemodinámicos.

La presión sistólica arterial basal en nuestro modelo fue 111 ± 12 mm Hg, similar a los valores fisiológicos en la especie humana. La infusión intracoronaria de la solución control no se acompañó de modificaciones valorables en la presión aórtica o en la frecuencia cardíaca en ninguno de los animales (**Tabla 2**).

B.-Contracción segmentaria.

En el análisis de la contracción segmentaria en la fase previa a la infusión intracoronaria de la solución control, la longitud telediástolica (LTD) en el segmento de miocardio dependiente de la arteria descendente anterior distal (ADAD) fue de 11.82 ± 0.91 mm, siendo la LTD en el segmento control de 9.4 ± 0.94 mm.

TABLA 2

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la solución control

n = 6	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
PREINFUSION	111 ± 12	47.0 ± 6.0	81 ± 9
1 MIN. INFUSION	121 ± 14	48.2 ± 6.0	82 ± 9
5 MIN. INFUSION	114 ± 12	49.2 ± 7.8	82 ± 9
POSTINFUSION	112 ± 9	49.4 ± 6.0	81 ± 10

Cambios no significativos

La fracción de acortamiento (FA) previa a la infusión intracoronaria de la solución control en la zona de miocardio dependiente de la arteria descendente anterior distal fue de $21.12 \pm 2.06\%$, dentro de límites fisiológicos. En el segmento control la FA antes de la infusión fue inferior ($12.43 \pm 1.61\%$) debido a la colocación de estos microcristales cerca de la base del ventrículo izquierdo.

La infusión de la solución control no modificó la longitud telediastólica ni la fracción de acortamiento en el segmento dependiente de la arteria descendente anterior distal en ninguno de los animales (**Tabla 3**). Tampoco se observaron cambios en los parámetros de contracción segmentaria correspondientes al segmento de miocardio control.

C.-Arritmias.

No se registraron arritmias durante los 5 minutos de infusión de la solución control.

1.1.2. Infusión intracoronaria de la solución control modificada, con concentración de calcio iónico disminuida.

A.-Parámetros hemodinámicos.

La situación hemodinámica previa a esta infusión fue similar a la situación previa a la infusión de la solución control (PAS 102 ± 7 mm Hg, PAD 52.9 ± 2.0 mm Hg, FC 93 ± 9 lpm).

TABLA 3

Efecto de la infusión intracoronaria de la solución control sobre la contracción segmentaria del VI

n = 6	SEGMENTO DEPENDIENTE DE DA		SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	LTD(mm)	FA(%)
PREINFUSION	11.82±0.91	21.12±2.06	9.40±0.94	12.43±1.61
1 MIN. INFUSION	12.14±1.01	21.15±1.53	10.74±1.50	14.13±1.78
5 MIN. INFUSION	11.94±1.09	21.22±2.32	10.72±1.51	15.07±1.96
POSTINFUSION	11.92±1.09	23.35±1.75	10.72±1.50	15.42±1.99

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

Cambios no significativos.

Al igual que sucedía con la solución control, la infusión de la solución control modificada, con concentración de calcio iónico disminuida, no produjo cambios en la frecuencia cardíaca ni en la presión arterial como se observa en la **Tabla 4**.

B.-Contracción segmentaria.

No se apreciaron cambios en la longitud telediastólica ni en la fracción de acortamiento en ninguno de los dos segmentos (segmento control y segmento distal a la infusión) durante la infusión de la solución control modificada, con concentración de calcio iónico disminuida (**Tabla 5**).

En la **figura 7** representamos simultáneamente LTD y FA durante la infusión intracoronaria de las soluciones control y control modificada y observamos un comportamiento de la contracción segmentaria similar en ambos casos con ausencia de cambios valorables en estos parámetros.

C.-Arritmias.

No se produjeron arritmias durante la infusión de la solución control modificada.

TABLA 4

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la solución control modificada (con concentración de calcio iónico corregida)

n = 8	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
PREINFUSION	102 ± 7	52.9 ± 2.0	93 ± 9
1 MIN. INFUSION	101 ± 7	53.1 ± 3.5	90 ± 9
5 MIN. INFUSION	96 ± 11	58.3 ± 1.8	94 ± 9
POSTINFUSION	109 ± 6	59.1 ± 2.9	93 ± 11

Cambios no significativos.

TABLA 5

Efecto de la infusión intracoronaria de la solución control modificada sobre la contracción segmentaria del VI

n = 8	SEGMENTO DEPENDIENTE DE DA		SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	LTD(mm)	FA(%)
PREINFUSION	11.15±0.82	20.49±2.15	10.74±0.73	16.74±2.22
1 MIN. INFUSION	11.33±0.94	22.21±2.28	10.81±0.80	17.30±2.13
5 MIN. INFUSION	11.45±0.87	21.69±2.10	10.71±0.72	16.62±1.94
POSTINFUSION	11.36±0.93	20.35±2.26	10.81±0.82	15.50±1.42

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

Cambios no significativos.

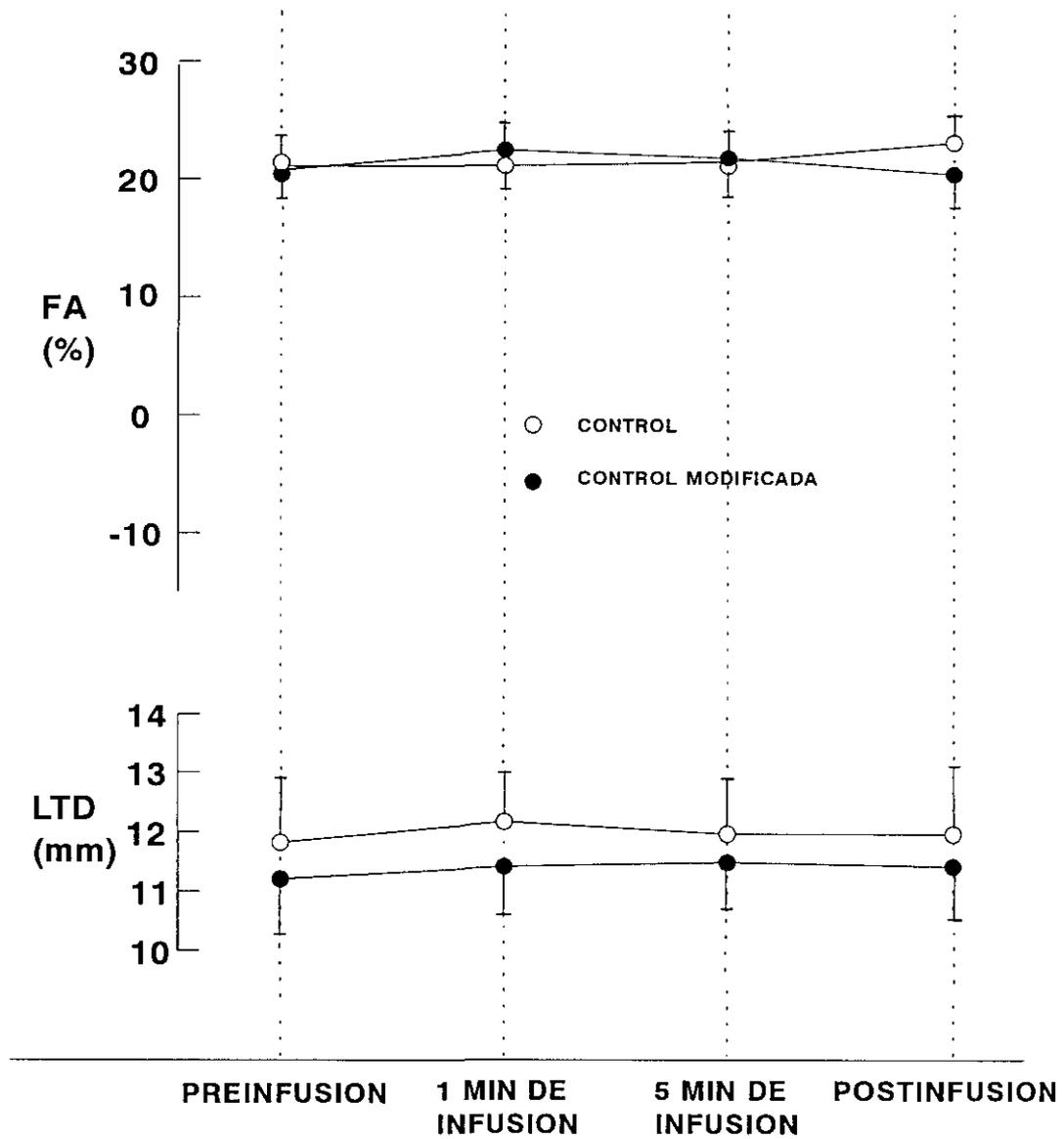


Figura 7: Efecto de la infusión intracoronaria de la solución control vs solución control modificada sobre el segmento dependiente de la arteria descendente anterior.

1.2. Estudio del efecto de la infusión de BDM sobre la contracción segmentaria.

1.2.1. Infusión intracoronaria de la solución "BDM" a una velocidad de infusión de 9 ml/min.

A esta velocidad de infusión, equivalente al 50-70% del flujo basal, la solución "BDM" produjo alteraciones hemodinámicas y de la contracción en todos los animales.

A.-Parámetros hemodinámicos.

La infusión de la solución "BDM" produjo un aumento discreto pero estadísticamente significativo de la frecuencia cardíaca (de 88 ± 6 lpm antes de la infusión a 96 ± 6 lpm a los 5 minutos de iniciada ésta, $p < 0.05$. **Tabla 6**). También se comprobó una ligera pero significativa disminución en la presión arterial sistólica (de 97 ± 3 mm Hg antes de la infusión a 91 ± 3 mm Hg a los 5 minutos de iniciada ésta, $p < 0.05$). Los cambios en la frecuencia cardíaca y en la presión arterial sistólica que ocurren durante la infusión de la solución "BDM" son rápidamente reversibles al cesar esta infusión, con valores similares a los basales a los 3 minutos de retirada la infusión.

B.-Contracción segmentaria.

Durante la infusión de la solución "BDM" no se objetivaron cambios en la longitud telediástolica ni en la fracción de acortamiento del segmento

TABLA 6

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la solución BDM. Velocidad de infusión: 9ml/min

n = 10	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
PREINFUSION	97±3	49.8±3.4	88±6
1 MIN. INFUSION	95±3	51.3±3.0	91±6
5 MIN. INFUSION	91±3 *	47.5±3.6	96±6 *
POSTINFUSION	97±5	50.9±3.3	94±6

* p<0.05 comparado con los valores basales.

control. Por el contrario, en el segmento dependiente de la arteria descendente anterior apareció supresión prácticamente completa del acortamiento sistólico (**Tabla 7**). La fracción de acortamiento disminuyó desde 21.76 ± 1.52 % en situación basal, a 4.41 ± 2.56 % tras 1 minuto de infusión y hasta 1.32 ± 0.9 % tras 5 minutos de infusión. Estos valores eran significativamente distintos tanto de los valores basales como de los correspondientes en el grupo control ($p < 0.05$). La infusión de BDM produjo también un aumento en la longitud telediastólica del 10 % (desde 11.7 ± 0.67 mm antes de la infusión a 12.86 ± 0.69 mm tras 1 minuto de infusión y a 12.36 ± 0.68 mm a los 5 minutos de infusión). Estos valores fueron significativamente distintos de los valores basales ($p < 0.05$). La longitud máxima fue de 13.77 ± 0.83 mm tras 1 minuto de infusión y de 13.03 ± 0.76 mm tras 5 minutos de infusión.

Estos cambios en la contracción segmentaria asociados a la infusión de BDM aparecieron pocos segundos después del inicio de la infusión y alcanzaron un nivel próximo a su máxima expresión en el primer minuto, progresando mínimamente durante los 4 minutos siguientes. El efecto de la BDM sobre la función contráctil regional fue rápidamente reversible, con parámetros de contracción segmentaria similares a los basales a los 3 minutos aproximadamente tras cesar la infusión.

C.-Arritmias.

No se detectaron arritmias durante la infusión de BDM a una velocidad de infusión de 9 ml/min.

TABLA 7

**Efecto de la infusión intracoronaria de la solución BDM sobre la
contracción segmentaria del VI.**

Velocidad de infusión: 9 ml/min.

n = 10	SEGMENTO DEPENDIENTE DE DA				SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	MAX	MIN	LTD(mm)	FA(%)
PREINFUSION	11.70±0.67	21.76±1.52	———	———	10.37±0.69	15.79±1.56
1 MIN. INFUSION	12.86±0.69 *	4.41±2.56 *	13.77±0.83 *	10.93±0.54	10.73±0.85	16.81±1.71
5 MIN. INFUSION	12.36±0.68 *	1.32±0.90 *	13.03±0.76	10.28±0.49	10.02±0.56	16.86±5.20
POSTINFUSION	11.70±0.69	22.00±2.12	———	———	10.27±0.87	16.37±1.74

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. MAX: Longitud máxima. MIN: Longitud mínima. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

* $p < 0.05$ comparado con los valores basales.

1.2.2. Infusión intracoronaria de la solución "BDM" a dosis decrecientes.

En 4 animales se realizó infusión de BDM a dosis decrecientes, con objeto de valorar una posible relación dosis-respuesta en el efecto de la BDM sobre la contracción segmentaria.

A.-Parámetros hemodinámicos.

La infusión de BDM produce, como hemos comentado anteriormente, discreta disminución de la presión arterial sistólica, así como un ligero aumento en la frecuencia cardíaca. No se evidenciaron cambios significativos en estos parámetros hemodinámicos en relación a la disminución progresiva de la velocidad de infusión de BDM en 4 animales (**tabla 8**).

B.-Contracción segmentaria.

El efecto sobre la contracción segmentaria (valorada en longitud telediastólica y fracción de acortamiento) de la infusión de la solución "BDM" a dosis decrecientes queda reflejado en la **tabla 9** y en la **figura 8**. Se observó una clara relación dosis-respuesta en el efecto de la BDM sobre la contracción segmentaria en el segmento distal a la arteria descendente anterior. En los 4 animales en los que se realizó infusión de BDM a dosis decrecientes la longitud telediastólica media basal fue 12.6 ± 2 mm y la fracción de acortamiento media basal 25.8 ± 1.9 %. La FA descendió hasta 1.1 ± 1.8 % durante la infusión de BDM a 9 ml/min. Cuando la velocidad de infusión disminuyó de 9 ml/min a 6 ml/min la FA pasó a ser de 11.2 ± 4 % (se incrementó

TABLA 8

**Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de BDM
a dosis decrecientes**

n = 4	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
BASAL	95 ± 5	47 ± 7	87 ± 16
INFUSION 9ml/min	89 ± 4	43 ± 6	93 ± 14
INFUSION 6ml/min	92 ± 8	45 ± 6	92 ± 12
INFUSION 3ml/min	93 ± 9	49 ± 8	99 ± 12
POSTINFUSION	101 ± 8	50 ± 7	97 ± 11

Cambios no significativos.

TABLA 9

Efecto de la infusión intracoronaria de la solución BDM a dosis decrecientes sobre la contracción segmentaria del VI

n = 4	SEGMENTO DEPENDIENTE DE DA		SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	LTD(mm)	FA(%)
BASAL	12.6±2.0	25.8±1.9	10.3±0.94	17.4±2.1
INFUSION 9ml/min	13.2±1.5	1.1±1.8 *	11.0±0.92	16.5±1.6
INFUSION 6ml/min	13.0±1.5	11.2±4.0 *	10.9±0.90	17.7±2.4
INFUSION 3ml/min	12.8±1.6	16.5±5.1 *	11.1±0.93	17.2±2.5
POSTINFUSION	12.4±1.7	25.0±4.0	11.0±0.90	16.6±2.7

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

* $p < 0.05$ comparado con los valores basales.

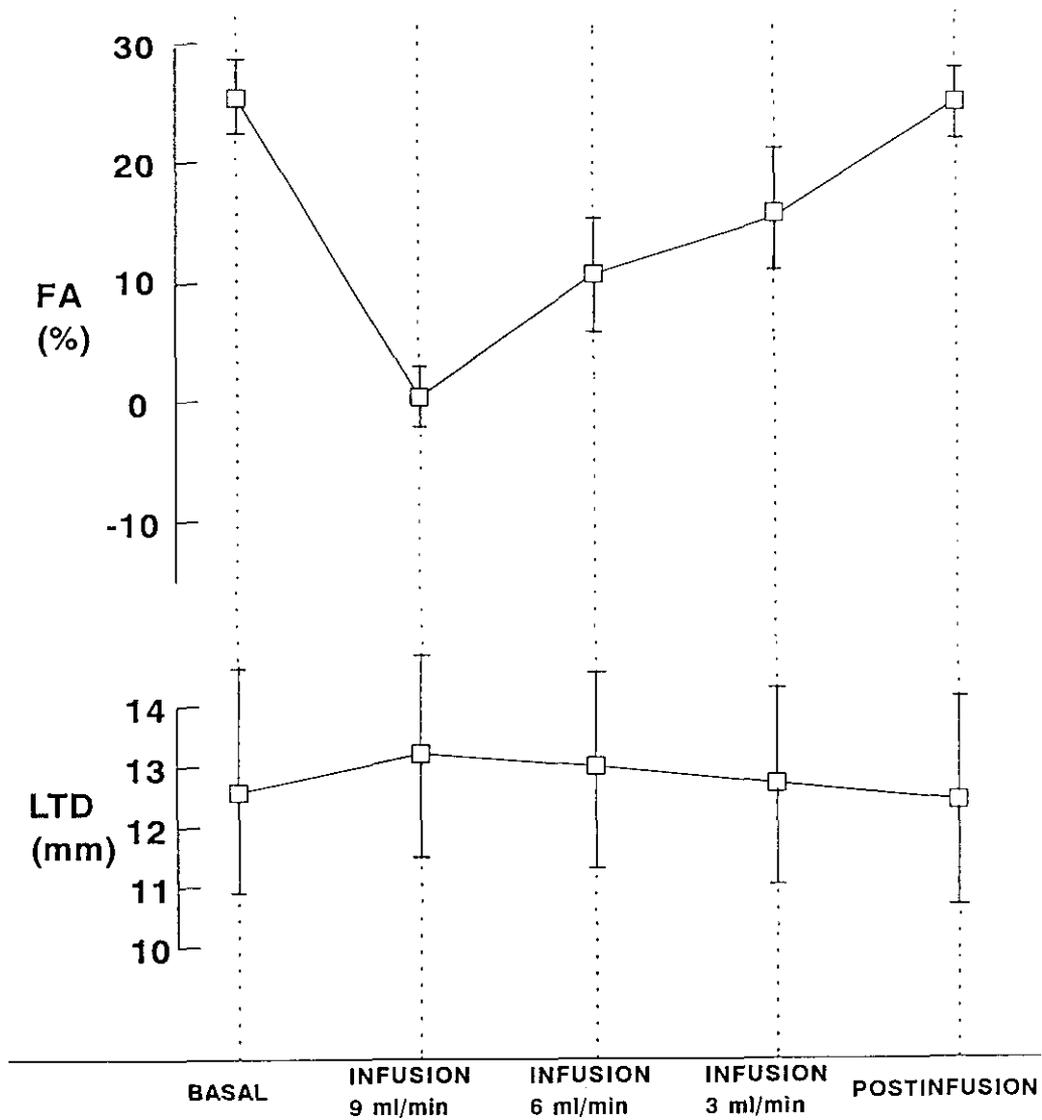


Figura 8: Efecto de la infusión intracoronaria de la solución BDM a dosis decrecientes sobre el segmento dependiente de la arteria descendente anterior.

hasta alcanzar el 43% del valor basal). El descenso en la velocidad de infusión hasta 3 ml/min se asoció a un aumento del 21 % de la fracción de acortamiento, que alcanzó 16.5 ± 5.1 %. Se observaron valores de la FA superponibles a los basales a los 3 minutos aproximadamente tras cesar la infusión de BDM. La LTD fue de 13.2 ± 1.5 mm a la velocidad de infusión de 9 ml/min, de 13 ± 1.5 mm a 6 ml/min y de 12.8 ± 1.6 mm a 3 ml/min. Así pues, se observó también una progresiva recuperación en la longitud telediastólica a medida que disminuyó la velocidad de infusión. Nuevamente, pudimos comprobar la ausencia de efecto de la BDM sobre la contracción segmentaria del segmento control.

C.-Arritmias.

No se registraron arritmias durante la infusión de BDM a diferentes dosis.

1.3. Estudio del efecto de la interacción entre el calcio extracelular y la BDM sobre la contracción segmentaria. Infusión de la solución "BDM" modificada, con concentración de calcio iónico corregida.

A.-Parámetros hemodinámicos.

Los cambios hemodinámicos producidos durante los 5 minutos de infusión de solución "BDM" modificada, con concentración de calcio iónico aumentada (**tabla 10**), son similares a los que induce la infusión de la solución "BDM". Ocurre discreta disminución de la presión arterial tanto sistólica (de 100 ± 4 mm Hg en

TABLA 10

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la
solución BDM modificada
(con concentración de calcio iónico corregida)

n = 8	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
PREINFUSION	100±4	55.5±2.6	100± 9
1 MIN. INFUSION	95±4	54.0±3.0	105± 9*
5 MIN. INFUSION	93±4 *	51.0±3.1 *	111± 9*
POSTINFUSION	98±4	52.3±2.1	112±11

* p<0.05 comparado con los valores basales.

situación basal a 93 ± 4 mm Hg tras 5 minutos de infusión; $p < 0.05$) como diastólica (de 55.5 ± 2.6 mm Hg en situación basal hasta 51.0 ± 3.1 mm Hg tras 5 minutos de infusión; $p < 0.05$) y ligero aumento de la frecuencia cardíaca (de 100 ± 9 lpm en situación basal a 105 ± 9 lpm tras 1 minuto de infusión y hasta 110 ± 9 lpm tras 5 minutos de infusión; $p < 0.05$).

B.-Contracción segmentaria.

De la misma forma, la infusión de la solución "BDM" modificada produjo cambios en la contracción segmentaria superponibles a los que ocurren durante la infusión de la solución "BDM". No se observaron cambios en los parámetros de contracción segmentaria del segmento control. Sin embargo, en el segmento dependiente de la arteria descendente anterior distal aparece supresión prácticamente completa del acortamiento sistólico (**Tabla 11**). La fracción de acortamiento en el segmento dependiente de la arteria descendente anterior distal disminuyó desde 16.78 ± 1.11 % en situación basal a 1.9 ± 1.22 % tras 1 minuto de infusión y hasta 1.25 ± 1.49 % tras 5 minutos de infusión ($p < 0.05$). La infusión de la solución "BDM" modificada con concentración de calcio iónico aumentada también produjo un incremento de la LTD (de 10.68 ± 0.36 mm en situación basal a 11.5 ± 0.4 mm tras 1 minuto de infusión y a 11.55 ± 0.42 mm tras 5 minutos de infusión; $p < 0.05$). La longitud máxima alcanzó valores de 12.25 ± 0.4 mm tras 1 minuto de infusión y de 12.15 ± 0.33 mm tras 5 minutos de infusión. También en este caso el efecto de la BDM sobre la contracción segmentaria fue rápidamente reversible, con parámetros similares a los basales a los 3 minutos aproximadamente tras cesar la infusión de la solución.

TABLA 11

Efecto de la infusión intracoronaria de la solución BDM modificada (con concentración de calcio iónico corregida) sobre la contracción segmentaria del VI

n = 8	SEGMENTO DEPENDIENTE DE DA				SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	MAX	MIN	LTD(mm)	FA(%)
PREINFUSION	10.68±0.36	16.78±1.11	—	—	10.20±1.09	15.02±2.32
1 MIN. INFUSION	11.50±0.40 *	1.90±1.22 *	12.25±0.40 *	9.95±0.44	10.21±1.08	14.76±2.41
5 MIN. INFUSION	11.55±0.42 *	1.25±1.49 *	12.15±0.33	9.94±0.40	10.21±1.09	15.44±2.29
POSTINFUSION	10.48±0.43	14.91±1.44	—	—	10.04±1.12	15.06±2.18

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. MAX: Longitud máxima. MIN: Longitud mínima. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

* $p < 0.05$ comparado con los valores basales.

En la **figura 9** representamos los parámetros de contracción segmentaria durante la infusión de las soluciones "BDM" y "BDM" modificada, observándose un comportamiento similar en ambos casos.

C.-Arritmias.

No se detectaron arritmias durante la infusión de la solución BDM modificada, con concentración de calcio iónico corregida.

2.-EFECTO DE LA OCLUSION CORONARIA.

A.-Datos hemodinámicos.

La situación hemodinámica previa a la oclusión coronaria fue similar a la de los otros experimentos (**Tabla 12**).

La oclusión selectiva a nivel de la arteria descendente anterior distal produjo una ligera pero significativa disminución de la presión arterial tanto sistólica (de 101 ± 5 mm Hg en situación basal a 93 ± 4 mm Hg tras 5 minutos de oclusión; $p < 0.05$) como diastólica (de 50.1 ± 2.8 mm Hg en situación basal a 47.9 ± 2.2 mm Hg tras 5 minutos de oclusión; $p < 0.05$). Se produjo también un aumento discreto de la frecuencia cardíaca (de 100 ± 6 lpm preoclusión a 103 ± 6 lpm tras 5 minutos de oclusión coronaria) que no alcanzó significación estadística.

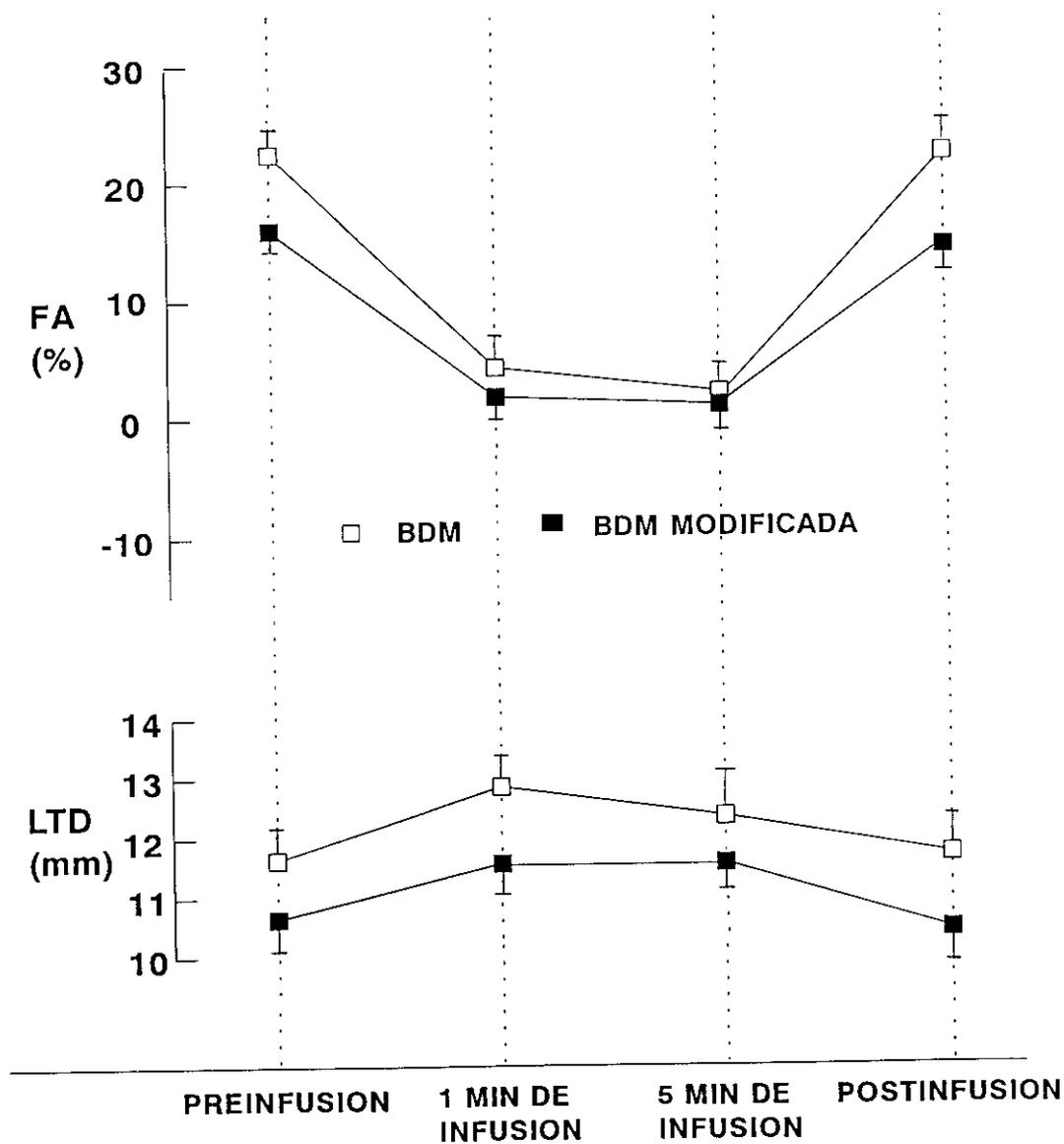


Figura 9: Efecto de la infusión intracoronaria de las soluciones BDM y BDM modificada sobre el segmento dependiente de la arteria descendente anterior.

TABLA 12

Datos hemodinámicos durante la oclusión coronaria

n = 17	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
PREOCLUSION	101 ± 5	50.1 ± 2.8	100 ± 6
5 MIN. OCLUSION	93 ± 4 *	47.9 ± 2.2 *	103 ± 6

* p < 0.05 comparado con los valores basales.

En conjunto, los cambios hemodinámicos que produjo la oclusión coronaria fueron superponibles a los observados tras infusión intracoronaria selectiva de la solución "BDM".

B.-Contracción segmentaria.

Durante la oclusión selectiva a nivel de la arteria descendente anterior distal no se observaron cambios en la longitud telediástolica ni en la fracción de acortamiento del segmento control (**Tabla 13**). Sin embargo, en el segmento dependiente de la arteria descendente anterior se suprimió el acortamiento sistólico y la fracción de acortamiento disminuyó desde $20.53 \pm 1.75 \%$ en situación basal a $-0.26 \pm 0.41 \%$ tras 5 minutos de oclusión coronaria. Estos valores fueron significativamente distintos, tanto de los valores basales como de los correspondientes en el grupo control ($p < 0.05$). La oclusión coronaria produjo también un aumento significativo en la longitud telediástolica del segmento isquémico, desde 11.53 ± 0.47 mm en situación basal hasta 13.01 ± 0.53 mm tras 5 minutos de oclusión ($p < 0.05$ tanto respecto a los valores basales como respecto a los correspondientes en el grupo control). La longitud máxima en el segmento isquémico tras 5 minutos de oclusión coronaria fue de 13.54 ± 0.56 mm.

Estos cambios que produce la oclusión coronaria selectiva de la arteria descendente anterior sobre la contracción segmentaria del territorio de miocardio dependiente de esta arteria son similares a los observados tras infusión intracoronaria de BDM sin oclusión coronaria.

TABLA 13
Efecto de la oclusión coronaria
sobre la contracción segmentaria del VI

n = 17	SEGMENTO ISQUEMICO				SEGMENTO CONTROL	
	LTD(mm)	FA(%)	MAX	MIN	LTD(mm)	FA(%)
PREOCCLUSION	11.53±0.47	20.53±1.75	————	————	10.51±0.57	15.21±1.23
5 MIN. OCLUSION	13.01±0.53 *	-0.26±0.41 *	13.54±0.56 *	10.95±0.50	10.98±0.70	16.26±1.17

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. MAX: Longitud máxima. MIN: Longitud mínima.

* p<0.05 comparado con los valores basales.

C.-Arritmias.

No se registraron arritmias durante los 5 minutos de oclusión coronaria sin infusión.

3.-EFECTO DE LA INFUSION INTRACORONARIA DURANTE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSION.

3.1.Datos hemodinámicos.

Los datos hemodinámicos correspondientes a los 16 animales en los que se realizó infusión intracoronaria de las soluciones control y "BDM" durante los períodos de oclusión coronaria y reperfusión aparecen en las **tablas 14 y 15**. En conjunto, la situación hemodinámica permaneció estable a lo largo del experimento, no objetivándose diferencias entre ambos grupos de tratamiento. La oclusión coronaria no produjo cambios importantes en la presión arterial ni en la frecuencia cardíaca en el conjunto de los animales. Tampoco se observaron variaciones hemodinámicas en los 3 minutos de infusión durante oclusión coronaria. Sin embargo, en la fase de reperfusión se aprecia una oscilación en la presión arterial en relación con las arritmias de reperfusión.

La infusión intracoronaria se acompañó de extrasistolia ventricular frecuente, de densidad similar en ambos grupos de tratamiento. Se produjo fibrilación ventricular en 7 animales en la fase de infusión intracoronaria durante oclusión y reperfusión, de los cuales 5 pertenecían al grupo BDM y 2 al grupo control.

TABLA 14

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la solución control en las fases de isquemia y reperfusión

n = 8	PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA	
	Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)		
BASAL	93±5	47±4	87± 9	
OCLUSION CORONARIA	101±6	52±4	104± 9	
INFUSION INTRACORONARIA	Oclusión coronaria	93±8	49±5	109± 8
	Reperusión precoz	89±8	48±5	126±10
	Reperusión tardía	93±8	51±6	110± 8

TABLA 15

Datos hemodinámicos durante la infusión intracoronaria de la solución BDM en las fases de isquemia y reperfusión

n = 8		PRESION ARTERIAL		FRECUENCIA CARDIACA
		Sistólica (mm Hg)	Diastólica (mm Hg)	
BASAL		106±11	58±15	91± 8
OCLUSION CORONARIA		101±14	52± 6	107± 8
INFUSION INTRACORONARIA	Oclusión coronaria	96±16	59± 7	109± 8
	Reperusión precoz	90±16	51± 6	122±10
	Reperusión tardía	94± 9	54± 7	136±10

3.2. Contracción segmentaria.

Los parámetros de contracción segmentaria (longitud telediastólica y fracción de acortamiento) correspondientes al segmento control no mostraron cambios apreciables durante las maniobras de oclusión coronaria y reperfusión (**Tabla 16**).

3.2.1. Efecto de la infusión intracoronaria sobre la contracción segmentaria durante la isquemia.

En el segmento dependiente de la arteria descendente anterior distal durante oclusión coronaria se produjo un aumento en la longitud telediastólica desde 11.6 ± 1.4 mm en situación basal hasta 12.8 ± 1.7 mm ($p < 0.05$) en el grupo control (**tabla 17 y figura 10**). En los animales del grupo BDM la longitud telediastólica en el segmento isquémico aumentaba desde 12.4 ± 0.7 mm en situación basal a 13.5 ± 1.0 mm ($p < 0.05$). Se suprimió el acortamiento sistólico con aparición de expansión sistólica. Así, durante oclusión coronaria la fracción de acortamiento disminuyó en el grupo control desde 27.5 ± 0.7 % en situación basal a -1.8 ± 1.0 % y en el grupo BDM desde 24.8 ± 2.2 % en situación basal a -1.2 ± 0.7 %.

La infusión intracoronaria de las soluciones (control y BDM) durante este período de oclusión coronaria no produjo cambios en los parámetros de contracción segmentaria, que fueron superponibles a los valores previos a la infusión.

TABLA 16

Efecto de la infusión intracoronaria sobre la contracción segmentaria del segmento control durante isquemia y reperfusión

	GRUPO CONTROL (n=8)		GRUPO BDM (n=8)		
	LTD(mm)	FA(%)	LTD(mm)	FA(%)	
BASAL	12.5±1.0	21.0±2.0	10.0±0.7	16.3±3.4	
OCLUSION CORONARIA	12.4±0.9	21.4±2.3	10.3±0.6	19.1±1.9	
INFUSION INTRACORONARIA	Oclusión coronaria	12.4±0.9	21.9±2.1	10.4±0.6	19.0±2.0
	Reperfusión precoz	11.9±0.8	18.7±2.6	10.2±0.8	20.6±2.2
	Reperfusión tardía	12.6±1.1	21.1±2.2	11.1±1.4	18.5±1.3

Cambios no significativos.

TABLA 17

Efecto de la infusión intracoronaria sobre la contracción segmentaria del segmento dependiente de la DA distal durante isquemia y reperusión

	GRUPO CONTROL (n=8)		GRUPO BDM (n=8)	
	LTD(mm)	FA(%)	LTD(mm)	FA(%)
BASAL	11.6±1.4	27.5±0.7	12.4±0.7	24.8±2.2
OCCLUSION CORONARIA	12.8±1.7 *	-1.8±1.0 *	13.5±1.0 *	-1.2±0.7 *
INFUSION INTRACORONARIA	Oclusión coronaria	12.8±1.8	13.6±1.1	0.0±1.1
	Reperusión precoz	11.6±1.5 *	11.1±1.1 *	-12.7±4.5 *
	Reperusión tardía	10.3±1.6 *	12.3±1.0 *	-1.6±1.3 *

LTD: Longitud telediastólica. FA: Fracción de acortamiento. DA: Arteria coronaria descendente anterior.

* p<0.05 comparado con los valores basales.

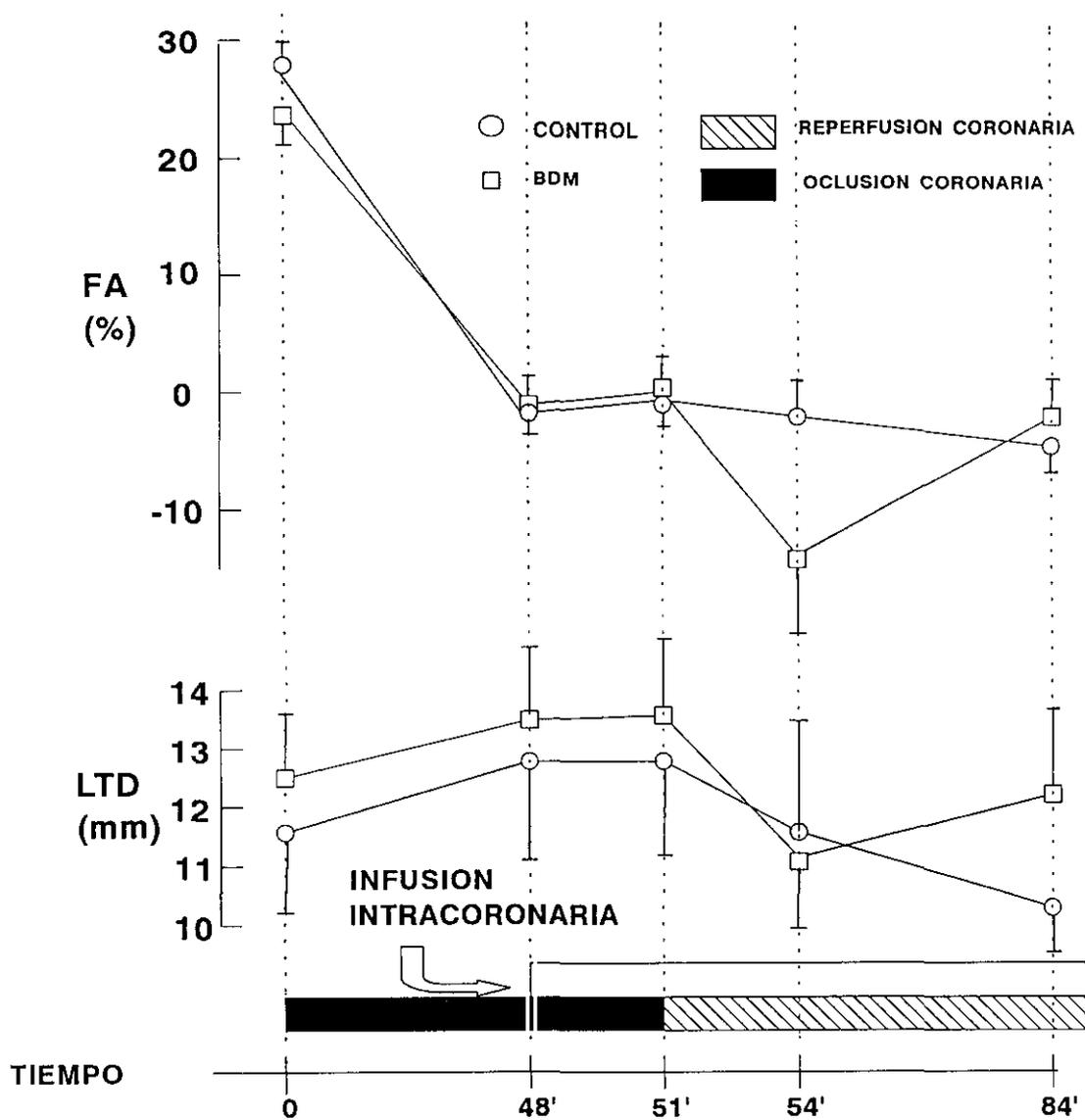


Figura 10: Efecto de la infusión intracoronaria de la solución BDM vs solución control sobre el segmento dependiente de la arteria descendente anterior durante isquemia y reperfusion.

3.2.2.Efecto de la infusión intracoronaria sobre la contracción segmentaria durante la reperfusión. (Tabla 17, figura 10).

A.-Fase precoz de la reperfusión.

La infusión intracoronaria de la solución BDM en el segmento isquémico en fase de reperfusión precoz se acompañó de disminución de la longitud telediastólica (desde 13.6 ± 1.1 mm hasta 11.1 ± 1.1 mm; $p < 0.05$ respecto a valores previos). La disminución en la LTD en el grupo tratado con BDM durante la fase precoz de la reperfusión fue el doble que la asociada a la infusión de la solución control (en el grupo control la longitud telediastólica disminuyó de 12.8 ± 1.8 mm a 11.6 ± 1.5 mm; $p < 0.05$). Estos cambios en la longitud telediastólica se acompañaron de un notable aumento del abombamiento sistólico. Así, la expansión sistólica alcanzó el 12.7 ± 4.5 %, 7 veces mayor que el 1.5 ± 1.4 % observado en el grupo control ($p < 0.05$). Comparado con el abombamiento durante la oclusión coronaria la BDM aumenta 4 veces más este abombamiento durante la fase precoz de la reperfusión ($p < 0.05$), no apareciendo diferencias significativas en el grupo control.

B.-Fase tardía de la reperfusión.

En el segmento isquémico en el grupo tratado con BDM durante la fase tardía de la reperfusión se observó un marcado aumento en la LTD desde 11.1 ± 1.1 mm hasta 12.3 ± 1.0 mm ($p < 0.05$) así como una disminución del abombamiento sistólico (desde -12.7 ± 4.5 % a -1.6 ± 1.3 %; $p < 0.05$).

Por el contrario, el grupo control mostró una disminución en la LTD en el segmento isquémico en la fase de reperfusión tardía (desde 11.6 ± 1.5 mm hasta 10.3 ± 1.6 mm; $p < 0.05$). Así pues, tras 30 minutos de reperfusión, la LTD era mayor en el grupo tratado con BDM (12.3 ± 1.0 mm) respecto al grupo control (10.3 ± 1.6 mm), como se observa en la **figura 10**. No se produjeron cambios significativos en la fracción de acortamiento en el grupo control durante la reperfusión tardía.

3.3. Arritmias.

Durante el período de isquemia previo a la infusión intracoronaria de las soluciones no se registraron arritmias de densidad significativa.

La infusión intracoronaria de las soluciones durante la fase de oclusión produjo extrasistolia ventricular de densidad significativa, con una distribución aparentemente similar en ambos grupos de tratamiento (control y BDM).

En todos los animales se registraron arritmias de reperfusión, con mayor frecuencia en forma de extrasistolia ventricular de densidad significativa, que se acompañaron de un ligero descenso en la presión arterial. La distribución de este tipo de arritmias fue similar en ambos grupos. En la fase de infusión intracoronaria durante la oclusión y la reperfusión se produjo fibrilación ventricular en 7 animales, de los cuales 5 pertenecían al grupo tratado con solución BDM y 2 al grupo tratado con solución control.

V. DISCUSSION

V. DISCUSION

Este estudio fue diseñado con la finalidad de valorar la posibilidad de inhibir de forma controlada la contracción miocárdica regional mediante la infusión intracoronaria selectiva de diacetilmonoxima, un potente y específico inhibidor de la contracción.

El hallazgo fundamental del estudio es la demostración de que la infusión intracoronaria selectiva de 2,3 butanodiona monoxima (BDM) es capaz de producir inhibición reversible de la contractilidad en el segmento de miocardio correspondiente. El grado de inhibición de la contractilidad depende de la concentración de BDM en el miocardio, que a su vez está determinada por la velocidad de la infusión. La inhibición contráctil se produce a los pocos segundos del comienzo de la infusión y las modificaciones de la velocidad de infusión se acompañan rápidamente de cambios en el grado de inhibición contráctil. La interrupción de la infusión permite la rápida restauración de la actividad contráctil.

La infusión intracoronaria de BDM permitió, pues, obtener un sistema de "cardioplejia regional" selectiva y rápidamente reversible. En nuestro modelo experimental el efecto inhibidor de la contractilidad que produce la BDM es independiente del descenso de la concentración de calcio iónico causado por la capacidad quelante de la droga y no se ve influenciado por la variación, dentro de ciertos límites,

de la concentración de calcio extracelular. A una velocidad de infusión adecuada es posible conseguir una inhibición completa de la función contráctil similar a la obtenida durante la oclusión coronaria aguda.

Los resultados de este trabajo demuestran también, los cambios que se producen en la función contráctil regional durante la oclusión coronaria y la reperfusión en un modelo porcino sin circulación colateral. En este aspecto, los resultados mostraron un comportamiento similar al descrito en el modelo canino durante la oclusión coronaria y una rápida y drástica disminución de la longitud telediastólica durante los primeros minutos de reperfusión. La infusión de BDM produce un aumento del abombamiento sistólico durante la reperfusión, junto a una menor reducción de la longitud telediastólica al final del período de infusión. En presencia de isquemia, la infusión de BDM se acompaña de una mayor vulnerabilidad eléctrica y de un aumento de la incidencia de fibrilación ventricular.

1.- ESTUDIOS PREVIOS SOBRE PROTECCION MIOCARDICA

Existen estudios que han valorado la posibilidad de inhibir la contractilidad miocárdica fundamentalmente con dos objetivos, por un lado para *disminuir el consumo de oxígeno*, y por otro lado para *disminuir el daño postreperfusión*.

Algunos estudios previos han permitido cuantificar la contribución de la actividad contráctil al consumo energético del miocardio en diversas situaciones

(129). La contracción consume aproximadamente el 60-70% de la energía almacenada en forma de fosfatos de alta energía. Este ATP es empleado no sólo para su hidrólisis en las cabezas de miosina, sino también para la captación de calcio por parte del retículo sarcoplásmico y en las bombas intercambiadoras de iones. El ATP que es hidrolizado en la ATPasa miofibrilar para permitir la interacción actina-miosina (en el proceso de acoplamiento, desplazamiento y desactivación) puede suponer hasta el 95 % del ATP hidrolizado en situaciones hemodinámicas determinadas, por ejemplo durante el esfuerzo.

El conocimiento de estos hechos ha promovido el interés por el desarrollo de técnicas de inhibición de la contractilidad que permitan aumentar la tolerancia del miocardio a la isquemia. La imposibilidad de realizar esta inhibición de forma segmentaria ha hecho que hasta el momento, estas estrategias sólo se han podido aplicar durante circulación extracorpórea.

Experimentos recientes han demostrado que el daño del sarcolema es uno de los mecanismos más importantes de necrosis miocárdica postreperfusión. Se ha demostrado que durante la isquemia se produce daño del citoesqueleto (13, 21, 22) y, posteriormente, la reperfusión impone una sobrecarga mecánica al sarcolema previamente debilitado por la isquemia que puede causar su disrupción y la entrada masiva de calcio (12, 56). Los factores responsables de este daño mecánico del sarcolema durante la reperfusión serían: el edema osmótico (5, 7, 21, 31), la hipercontractura (75, 95, 97) y la interacción intercelular (12, 20, 29).

En este sentido, se ha planteado la posibilidad de inhibir la contractilidad con el objetivo de disminuir el daño mecánico por hipercontractura que se produce en la reperfusión (19, 20, 73-75, 91, 130).

Describiremos a continuación algunos de los métodos empleados en las técnicas de cardioplejia y cardioprotección. Comentaremos también, la aplicación de estas técnicas en la preservación del corazón del donante antes del trasplante.

1.1.-Fibrilación ventricular.

Inicialmente se empleó la fibrilación ventricular como método de inhibición global de la contractilidad (131). Esta aplicación se basaba en la hipótesis de que la parada cardíaca que se produce durante fibrilación ventricular anularía el trabajo de bomba cardíaco, lo cual se acompañaría de un consumo de oxígeno mínimo. Estudios posteriores han desestimado esta hipótesis tras comprobar que durante la fibrilación ventricular existen contracciones miocárdicas irregulares asociadas a un incremento de la tensión de la pared ventricular que condiciona un aumento del consumo de oxígeno, predispone a la aparición de daño isquémico y limita la viabilidad del miocardio tras la reperfusión (28, 131-133).

Hearse y cols, en su modelo de corazón aislado de rata (131), observaron que la parada cardíaca en fibrilación ventricular (30 minutos) producía deplección de ATP y creatín-fosfato (CP) y se acompañaba de pobre recuperación funcional. En su opinión, esta disminución de los depósitos de energía se debería a un incremento en su utilización debido a la actividad electromecánica mantenida y a una

reducción en la producción secundaria a la isquemia subendocárdica que induce la fibrilación. Así, se ha calculado que el consumo de oxígeno del corazón fibrilando a 22° C es aproximadamente de 2 ml/100 gr/min, sensiblemente más alto que el consumo de oxígeno del corazón parado a esa temperatura, de 0.3 ml/100 gr/min (132). Además, la técnica tendría el inconveniente de no poder ser empleada de forma regional. Consecuentemente, el empleo de la fibrilación ventricular como método para cardioplejia durante circulación extracorpórea resultó muy limitado durante varios años.

Sin embargo, estudios clínicos más recientes han obtenido resultados positivos respecto a la protección miocárdica durante la cirugía cardíaca mediante el empleo combinado de hipotermia y parada cardíaca en fibrilación ventricular (134, 135), planteándose la posible utilidad de esta técnica de protección miocárdica durante la cirugía en un grupo de pacientes de riesgo por presentar isquemia aguda preoperatoria (angina inestable, infarto agudo de miocardio o complicación de ACTP). Greene y cols (136), en un modelo porcino con oclusión transitoria de la arteria descendente anterior previa a la cirugía, compararon el efecto protector de la parada cardíaca con hipotermia y solución cardiopléjica hiperpotasémica respecto a otro grupo en que la parada cardíaca se logró con fibrilación ventricular en situación de hipotermia (sin clampaje aórtico). Los resultados confirmaron que la parada cardíaca mediante fibrilación ventricular e hipotermia resultaba un método seguro y eficaz de protección miocárdica en este modelo porcino sin circulación colateral. No obstante, no obtuvieron mejoría en los resultados con esta técnica respecto a los obtenidos mediante cardioplejia habitual con solución hiperpotasémica. Estos autores plantean la posible utilidad de este método de parada cardíaca provocada mediante fibrilación

ventricular en aquellos pacientes con calcificación severa aórtica en los cuales el riesgo de embolismo por clampaje aórtico sería muy alto.

1.2.-Hipotermia.

El descenso de la temperatura produce cambios profundos en el funcionamiento celular, los cuales provocan disminución en el consumo de oxígeno. La cardioplejia a bajas temperaturas, seguida de clampaje aórtico da lugar a una situación de isquemia global en la cual la utilización de fosfatos de alta energía está reducida por la hipotermia para permitir la recuperación en la fase de reperfusión (133). Numerosos estudios han confirmado que la hipotermia tiene un marcado efecto protector sobre el daño celular producido por la isquemia y la reperfusión (72, 131, 137-140). Este efecto protector está relacionado con el grado de hipotermia, aunque esta relación no es lineal (137). La hipotermia, en distintos grados, ha sido ampliamente empleada durante circulación extracorpórea y en la preservación del corazón para trasplante.

El empleo de la cardioplejia fría durante la cirugía cardiovascular tiene como misión reducir las necesidades de oxígeno durante el período de isquemia que produce el clampaje aórtico a niveles tan bajos que los depósitos de energía del miocardio sean suficientes para mantener la estructura celular y las bombas iónicas de membrana responsables de los gradientes de Na^+ , K^+ , Ca^{++} y Mg^{++} y así preservar la viabilidad y función de las células. Durante el clampaje aórtico la energía disponible en el miocardio deriva fundamentalmente del metabolismo anaerobio y, por ello, las demandas han de reducirse para adaptarse a la poca energía disponible (51).

Mecanismos de acción de la hipotermia

A pesar de su empleo habitual, los mecanismos celulares responsables del efecto protector de la hipotermia permanecen aún incompletamente definidos, persistiendo cierta controversia respecto a la interpretación de estos mecanismos (138, 139). Se ha propuesto que la hipotermia ejerce su efecto beneficioso debido, por un lado, a su capacidad para reducir el metabolismo celular y así preservar los depósitos de ATP (139, 141) y, por otro lado, a que mantiene la homeostasis de los iones durante la isquemia (138). Los efectos de la hipotermia son complejos, pues son el resultado de acciones, a veces opuestas, sobre distintas estructuras celulares, y el efecto global es diferente para distintas magnitudes de disminución de la temperatura.

El mantenimiento de la contracción emplea aproximadamente el 75% del total de la producción de ATP de la célula miocárdica. Así pues, el cese de la contracción que produce la isquemia provoca un ahorro muy importante de energía, independientemente de la hipotermia (139). Los miocitos pueden sobrevivir a una reducción en los depósitos de ATP del 30-40% del nivel basal, pero si se agota la reserva de fosfatos de alta energía es imposible la recuperación en la fase de reperfusión (141). El efecto de "ahorro de ATP" que produce la hipotermia puede estar en relación con la disminución de la velocidad de aquellas reacciones enzimáticas que requieren ATP que aún persistan en los miocitos isquémicos.

Navas y cols (138), en un estudio realizado en células ventriculares aisladas de embrión de pollo, describieron que las células en hipotermia presentaban un mayor contenido de ATP al final de la hipoxia que las células sometidas a hipoxia

a 37° C, lo que confirmaría el efecto ahorrador de ATP de la hipotermia. Observaron, además, que las células sometidas a hipotermia durante la reoxigenación aumentaban más su contenido en calcio que las sometidas a hipoxia en situación de normotermia. Asimismo, objetivaron un aumento significativo del contenido en sodio de las células que han sufrido hipoxia en condiciones de hipotermia respecto a las células tras una situación de hipoxia y normotermia. Los autores interpretaron que el mecanismo productor más probable de la sobrecarga de calcio tras incubación en hipotermia sería el aumento del contenido celular de sodio que provoca la entrada de calcio a la célula a través del intercambiador sodio-calcio. Así, el efecto protector de la hipotermia sobre las células hipóxicas sería independiente de una acción directa sobre la homeostasis del calcio.

Ferrari y cols (139), en un modelo experimental de corazón de conejo aislado, describieron que la hipotermia reducía significativamente la sobrecarga intracelular de calcio que ocurre durante la isquemia y, sobre todo, durante la reperfusión. Se ha demostrado que las membranas celulares experimentan una transición desde una fase más líquida a otra fase menos líquida a medida que se reduce la temperatura (72). Estos autores (139) especulan con la hipótesis de que la protección miocárdica que produce la hipotermia durante la isquemia podría ser consecuencia de esta transición de fase debida a la temperatura, que afectaría a múltiples funciones de membrana, incluido el transporte de calcio. Esta transición de fase que se produce durante la hipotermia podría beneficiar al miocardio por mantener la homeostasis del calcio y reducir directamente el acúmulo de calcio intracelular e intramitocondrial. En el experimento de Ferrari y cols, en contraposición al estudio de Navas y cols (138), la disminución de la temperatura desde 37° C a 22° C durante la isquemia no previno

de forma significativa la deplección de ATP tras el período isquémico, pero redujo el acúmulo celular y mitocondrial de calcio, manteniendo la función de las mitocondrias.

La hipotermia puede limitar la disfunción miocárdica y la necrosis debidas a la paradoja del calcio y a la paradoja del oxígeno (72, 138). Este efecto beneficioso aparece cuando la hipotermia es aplicada durante la fase de deplección de calcio u oxígeno, pero no si se aplica exclusivamente durante la fase de repleción (72). La protección frente a la paradoja del calcio y del oxígeno ocurre por debajo de una temperatura umbral de 33-36^o C, lo cual sugiere para algunos autores (72, 137) que esta protección sea consecuencia de los cambios en la fluidez de la membrana dependientes de la temperatura que afectarían a los sistemas transportadores de calcio. Van der Heide y cols describieron que el descenso de la temperatura (por debajo de 22^o C) durante el período de perfusión libre de calcio retrasaba el debilitamiento de las uniones de los discos intercalares que se observan en la paradoja del calcio (95).

Los efectos de la hipotermia sobre la sensibilidad de las miofibrillas al calcio no son conocidos. Es posible que la hipotermia pueda alterar directamente la sensibilidad de las miofibrillas al calcio, además de hacerlo de forma indirecta a través de la alteración del pH celular (138).

En estudios realizados en corazones latiendo, se describe un efecto inotrope positivo de la hipotermia (142, 143) que se ha atribuido al incremento de la entrada de calcio a las células durante el potencial de acción. Al parecer, la hipotermia aumenta la duración del potencial de acción y el contenido intracelular de sodio lo cual facilita la entrada de calcio a través de los canales del calcio y del intercambiador

$\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, y este aumento del contenido citoplasmático de calcio sería responsable del efecto inotrope positivo de la hipotermia.

Efectos adversos de la hipotermia

Existen datos que sugieren que la aplicación de la hipotermia sobre el miocardio puede tener efectos nocivos (132, 143-146). Se ha descrito que la hipotermia puede alterar la homeostasis de los iones, favoreciendo la producción de edema y sobrecarga de calcio de las células como consecuencia de la interferencia con la función de los sistemas enzimáticos celulares. También se ha observado desnaturalización de las proteínas, importantes desviaciones del pH celular, alteración de la utilización de la glucosa y de la generación de ATP y disminución de la liberación de oxígeno a los tejidos. Estos efectos parecen estar relacionados con la disminución de la fluidez de la membrana celular que afectaría su función de transporte. Además, la hipotermia puede tener efectos indeseables sobre la electrofisiología cardíaca y sobre la función endotelial.

Buckberg y cols (132), en estudios realizados en perros con objeto de valorar los efectos de la hipotermia sobre el flujo coronario y el consumo de oxígeno, describieron que la hipotermia reducía la distensibilidad diastólica y actuaba sobre los determinantes del flujo subendocárdico haciendo al ventrículo más vulnerable ante el daño isquémico. No obstante, en el estudio de Buckberg y cols, se observó que la hipotermia disminuía las necesidades de oxígeno del ventrículo izquierdo, sobre todo porque disminuía la frecuencia cardíaca, a pesar de que las necesidades de oxígeno por latido aumentaban en la hipotermia, presumiblemente por su efecto inotrope positivo.

Rebeyca y cols (143) observaron que el enfriamiento rápido previo a la cardioplejia producía contractura miocárdica que atribuyeron al acúmulo de calcio que se ha descrito con hipotermia en el corazón latiendo. La contractura se asociaba a un incremento del daño miocárdico y al deterioro de la función contráctil. Aoki y cols (145), en estudios realizados en corazón de cordero recién nacido, observaron que la solución cardiopléjica muy fría (con temperatura inferior a 4^o C) tenía un efecto perjudicial sobre la recuperación funcional tras la isquemia en corazón de neonato, probablemente porque producía daño del endotelio coronario.

La hipotermia parece prolongar la duración del potencial de acción y, probablemente, la aparición de gradientes intramiocárdicos de temperatura puede producir dispersión de la duración del potencial de acción, favoreciendo el desarrollo de arritmias ventriculares malignas (147). Wakide y cols (148), en su estudio en perros con retroperfusión de cardioplejia fría, observaron que esta técnica producía escasos gradientes de temperatura intramiocárdica, lo cual se asociaba a ausencia de arritmias ventriculares malignas. Se han descrito con frecuencia alteraciones de la conducción asociadas a los métodos de cardioplejia fría. Flack y cols (149) estudiaron el efecto de la temperatura sobre los trastornos de la conducción y observaron que la cardioplejia en situación de normotermia se asociaba a una disminución significativa de la incidencia intra y postoperatoria de estos trastornos. La incidencia de arritmias supraventriculares fue similar en ambos tipos de cardioplejia.

El empleo reciente de la cardioplejia sanguínea ha planteado nuevas controversias respecto a la utilización de la hipotermia asociada a la cardioplejia, pues existen datos que sugieren que la cardioplejia sanguínea en hipotermia puede ser inadecuada para la protección miocárdica (146, 150). El posible efecto perjudicial de esta asociación se atribuye a que la hipotermia desplaza hacia la izquierda la curva de disociación de la hemoglobina, dificultando la liberación de oxígeno a los tejidos y, además, aumenta la viscosidad de la sangre y favorece la agregación plaquetaria. Holman y cols (151), en un estudio experimental realizado en cerdos, analizaron la disociación del oxígeno de la hemoglobina en cardioplejia hipotérmica con sangre. Estos autores describieron que el oxígeno es capaz de disociarse de la hemoglobina en estas circunstancias, aunque sólo el oxígeno que estaba disuelto en la solución era extraído por el miocardio.

Basados en estos problemas asociados a la hipotermia como técnica de protección miocárdica, algunos autores (144, 146) han cuestionado su empleo habitual. Lichtenstein y cols proponen que si la cardioplejia sanguínea logra parada cardíaca aerobia, sería menos necesaria la hipotermia para disminuir el consumo de oxígeno (144).

Utilización de la hipotermia en la preservación cardíaca durante la cirugía con circulación extracorpórea.

A una temperatura de 10-20° C, el consumo de oxígeno en el corazón parado mediante métodos químicos es menor del 5% del valor normal (28) y

permite mantener la situación de parada cardíaca durante períodos prolongados sin que se produzca daño miocárdico permanente.

La inducción rápida de hipotermia miocárdica se realiza adecuadamente mediante la infusión de una solución cardiopléjica fría en la raíz aórtica tras la realización del clampaje aórtico. En la práctica generalmente se infunde una solución de sangre o cristaloides de aproximadamente 1.2 litros a 4° C durante un período de tiempo entre 3 y 5 minutos para situar la temperatura del miocardio por debajo de 10 ó 12° C (28, 140).

No parece necesario reducir la temperatura de la solución cardiopléjica muy por debajo de los 10° C, puesto que los descensos adicionales en la temperatura de la solución (por ejemplo entre 5 y 10° C) no producen diferencias importantes en las necesidades de oxígeno durante el intervalo entre las inyecciones de la solución cardiopléjica (152). Las necesidades de oxígeno en el corazón parado a 20° C son extremadamente bajas, de 0.3 ml/100 gr/min (en el corazón normal latiendo son de 9 ml/100 gr/min), y se reducen sólo a 0.15 ml/100 gr/min a 10° C (51, 132, 146, 152). El requerimiento de oxígeno del corazón fibrilando o latiendo a 20° C es de 2 ó 3 ml/100 gr/min, respectivamente (51, 132). Se ha descrito daño miocárdico (51) y daño endotelial coronario (145) asociado al frío cuando la temperatura descendía por debajo de los 4° C. Los efectos adversos observados durante el enfriamiento marcado, se han atribuido a inhibición de la ATPasa Na⁺/K⁺ que desencadena alteración de la homeostasis iónica (140).

Ocasionalmente, cuando existe hipertrofia ventricular importante, obstrucción coronaria o gran desarrollo de circulación colateral no coronaria, es preciso emplear un volumen mayor de la solución cardiopléjica para producir la hipotermia miocárdica deseada. La solución es reinfundida periódicamente cada 30 ó 40 minutos para mantener el grado adecuado de hipotermia (28).

La infusión de solución cardiopléjica fría puede acompañarse del empleo de hipotermia tópica, especialmente en casos en que es previsible que existan problemas en la distribución de la solución (por ejemplo en pacientes con enfermedad coronaria severa). La hipotermia tópica tiene efecto protector porque disminuye la actividad metabólica, el consumo de oxígeno y los procesos degradativos (137). Esta habitualmente se realiza mediante la infusión continua de suero salino a 4° C, a una velocidad de infusión de 50-100 ml/min en el interior de la cavidad pericárdica alrededor del corazón (28, 152).

Hipotermia durante la reperfusión.

Mertzdorff y cols (40) estudiaron, en corazón aislado de rata, el efecto sobre la preservación miocárdica de las variaciones de la temperatura en el período inicial de la reperfusión. Observaron que la reperfusión inicial en condiciones de hipotermia tuvo un efecto deletéreo sobre la integridad celular y la recuperación funcional del miocardio preservado. El mecanismo por el cual la hipotermia durante la fase inicial de la reperfusión puede resultar perjudicial es desconocido. Los estudios de Rousou y cols realizados en cerdos (153), indicaban que la hipotermia durante la reperfusión se asociaba a niveles de ATP inferiores respecto a los de reperfusión en

situación de normotermia durante igual período de tiempo. Estos autores sugerían que la hipotermia podía inhibir la regeneración celular de fosfatos de alta energía o aumentar su utilización. También Kempsford y cols (154), en estudios en corazón de rata aislado, describieron que la hipotermia durante la reperfusión no mejoraba la recuperación funcional tras un período de isquemia normotérmica.

La hipotermia desplaza la curva de disociación de la hemoglobina hacia la izquierda reduciendo la liberación tisular de oxígeno, lo cual puede ser perjudicial. Además, la hipotermia durante la fase de reperfusión puede reducir la velocidad de otros procesos metabólicos y reparativos necesarios para la recuperación de la función celular tras la isquemia, como el transporte de iones, la reducción del edema celular o la reparación de las organelas dañadas (40).

Sin embargo, Okada y cols (41) describieron, en células aisladas de ventrículo de rata, que el enfriamiento rápido (10-30 segundos) durante la fase inicial de la reperfusión aceleraba la recuperación de la contractura anóxica, mejorando la función contráctil. Los autores atribuyen este efecto beneficioso a la salida rápida de calcio a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$, lo cual liberaría a las mitocondrias de la sobrecarga de calcio y les permitiría recuperar la capacidad de sintetizar ATP.

1.3.-Agentes farmacológicos con acción inotropa negativa.

1.3.1.-Potasio.

La detención rápida de la función cardíaca tiene como objetivo disminuir la depleción de energía que produce el trabajo electromecánico durante la isquemia. La cardioplejia se introdujo como técnica de protección miocárdica en cirugía cardíaca a partir de la década de los setenta (49, 146, 155, 156).

La parada cardíaca provocada mediante el empleo de solución de potasio es la técnica cardiopléjica más ampliamente empleada (28, 51, 156). La concentración alta de potasio en el espacio extracelular reduce el gradiente transmembrana de potasio, bloquea la entrada inicial de sodio y despolariza la célula, eliminando así el coste energético que supone el mantenimiento de las bombas de membrana (28, 51). Hearse y cols (131), en su modelo en corazón aislado de rata, observaron que la parada cardíaca (30 minutos) producida por la perfusión de solución de potasio en hipotermia no disminuía los depósitos de ATP y CP. Tani y cols (128), en corazones aislados de rata, estudiaron el efecto de la infusión de solución hiperpotasémica durante la reperfusión, y describieron atenuación del daño por reperfusión que, en su opinión, se debía a la disminución de la entrada de calcio a las células a través de una acción sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$.

Una infusión fría inicial que contenga una alta concentración de potasio produce asistolia rápidamente. La detención global del corazón ocurre generalmente en 30 segundos, pero puede retrasarse 1 ó 2 minutos en pacientes con

enfermedad coronaria por mala distribución de la solución cardiopléjica por detrás de la arteria estenosada u ocluida (152). La eficacia cardioprotectora de la solución cardiopléjica ha sido, en general, adecuada en la mayoría de las series en que se ha empleado una dosis de potasio de 15-20 mM/l (28). A veces son precisas concentraciones más altas de potasio (25-30 mEq/l) para producir asistolia, pero no para mantenerla. La elevación de la concentración de potasio por encima de 30 mEq/l no es necesaria para la inducción de la cardioplejia y puede producir efectos nocivos por hiperkaliemia sistémica (152). Además, las concentraciones altas de potasio pueden asociarse a contractura y otras formas de daño miocárdico (28). En general, durante las infusiones posteriores la concentración de potasio se puede reducir a 8-10 mEq/l puesto que la hipotermia, en perfusión, o tópica o ambas, potencia la efectividad de la dosis cardiopléjica de potasio (152).

Solución cardiopléjica de cristaloides o solución con sangre.

Las soluciones más ampliamente empleadas como vehículo para la cardioplejia farmacológica pueden agruparse en dos tipos, según utilicen sangre o cristaloides (146, 150, 157-159). La eficacia de ambas modalidades ha sido documentada clínica y experimentalmente. La cardioplejia en los procedimientos de cirugía cardíaca se ha realizado durante varios años con solución de cristaloides; sin embargo, actualmente la mayoría de los autores plantea la superioridad de la cardioplejia sanguínea (157-159).

Catinella y cols (157) diseñaron un estudio experimental en perros para comparar la efectividad de los dos tipos de vehículos para cardioplejia con potasio.

Sus resultados sugerían que la cardioplejia con sangre ofrecía varias ventajas para la protección miocárdica durante períodos prolongados de clampaje aórtico. Según estos autores, las soluciones cardioplégicas sin sangre, aunque parecen aportar una adecuada protección miocárdica, permiten la persistencia de una deplección significativa de los depósitos de fosfatos de alta energía del miocardio, debido a un ininterrumpido metabolismo anaerobio. Por el contrario, la cardioplejia sanguínea mostraba preservación prácticamente completa de los depósitos miocárdicos de ATP. Según estos autores, ello sería debido a que la sangre proporciona al miocito niveles de sustratos y oxígeno adecuados y, así, un desplazamiento hacia el metabolismo aerobio, durante el período de inyección de cardioplejia sanguínea, que permitiría mantener la síntesis de ATP miocárdico.

La cardioplejia con sangre presenta varias ventajas (146, 158, 159): tiene capacidad de transportar y liberar oxígeno, produce menor hemodilución que la solución con cristaloides, aporta una presión oncótica adecuada disminuyendo la producción de edema, proporciona la capacidad de buffer de las proteínas sanguíneas, posee efectos reológicos beneficiosos sobre la microvasculatura por su contenido en hematíes, los cuales contienen además agentes anti-radicales libres. Se describe también con la cardioplejia sanguínea una acción protectora frente al daño por reperfusión. Algunos autores (159) proponen que esta técnica estaría especialmente indicada en pacientes con reserva energética disminuida; así pacientes con shock cardiogénico, hipertrofia ventricular izquierda o enfermedad coronaria severa con antecedentes de infartos previos.

Vía de administración de cardioplejia

La vía de administración anterógrada logra, en general, la distribución adecuada de la solución cardiopléjica. Sin embargo, en algunos casos, fundamentalmente en pacientes con insuficiencia aórtica y lesiones muy severas u oclusiones coronarias, la distribución de la cardioplejia resulta inadecuada por medio de esta vía anterógrada. Por ello se diseñó la técnica de infusión vía retrógrada que ha demostrado ser un método seguro y eficaz, presentando en la actualidad (sola o en combinación con la técnica anterógrada) amplias indicaciones (150, 152, 159-164).

La técnica de infusión retrógrada se ha desarrollado con buenos resultados tanto a través de seno coronario (161), como a través de la aurícula derecha (165). Esta vía de administración retrógrada muestra algunas ventajas (159): evita la canulación coronaria directa durante reemplazo aórtico, evita la aortotomía en pacientes con insuficiencia aórtica y distribuye adecuadamente la cardioplejia en el territorio en riesgo por detrás de la arteria obstruida. Se han descrito también desventajas asociadas a esta técnica retrógrada: puede producir barotrauma y rotura de seno coronario si se emplea presión elevada en el balón (se describe edema y hemorragia con presiones por encima de los 50 mm Hg) y presenta cierta complejidad técnica que puede retrasar la parada cardíaca. La cardioplejia retrógrada desde aurícula derecha requiere mayor volumen para replecionar la aurícula derecha, el ventrículo derecho y la arteria pulmonar proximal lo cual puede producir problemas por sobrecarga de volumen e hiperpotasemia. Se ha planteado que la técnica retrógrada logra menor infusión y protección en septo y ventrículo derecho respecto a la técnica anterógrada. No obstante, Menasche y cols (161) describen adecuada protección del ventrículo derecho en

cardioplejia retrógrada desde seno coronario si se tiene cuidado para no obstruir con el balón la desembocadura en el seno coronario de las venas terminales que vienen del ventrículo derecho. También se han publicado resultados que objetivan una adecuada recuperación del ventrículo derecho tras cardioplejia retrógrada desde la aurícula derecha (159, 165).

Técnicas de cardioplejia durante isquemia regional

Los pacientes con síndromes coronarios agudos (angina inestable refractaria, infarto agudo de miocardio, procedimientos fallidos y complicados de ACTP) suponen un subgrupo de mayor riesgo perioperatorio para cirugía de revascularización, que además ha mostrado resultados desfavorables con las técnicas habituales de cardioplejia. Varios autores han intentado diseñar métodos especiales que logren mejorar la protección frente al daño por isquemia y reperfusión en este subgrupo de pacientes con isquemia regional preoperatoria (148, 166-169).

Allen, Buckberg y cols (166) estudiaron en perros el efecto de una reperfusión controlada tras isquemia regional. Los autores observaron recuperación del miocardio tras un período de oclusión coronaria de hasta 6 horas si se lograban las condiciones adecuadas para la reperfusión. En opinión de los autores, estas condiciones adecuadas para la reperfusión fueron: descompresión completa del corazón para evitar el consumo de oxígeno producido por el desarrollo de la tensión de la pared miocárdica, ligera presión de reperfusión (50 mm Hg), cardioplejia regional para reducir al mínimo las demandas de oxígeno, normotermia para facilitar los procesos reparativos celulares y reperfusión prolongada (20 minutos). La solución de reperfusión constaba de los

siguientes componentes: sangre para proporcionar oxígeno y sustratos, potasio como agente cardiopléjico, sustancias precursoras del ciclo de Krebs (glutamato, aspartato), baja concentración de calcio, diltiazem, sustancia buffer, glucosa para crear una solución hiperosmolaridad que atenúe el edema y coenzima Q-10 como estabilizador de membrana y agente anti-radical libre. Tras un período de oclusión coronaria de 6 horas, la reperfusión en estas condiciones lograba recuperación del acortamiento sistólico, mayores índices de flujo postisquemia, menor edema y mejoría estructural respecto a la obtenida con reperfusión con sangre en corazón latiendo tras intervalos menores de isquemia (2-4 horas). Proponen la posible utilización de esta técnica tanto en el quirófano como en la sala de hemodinámica.

Misare y cols (163), en un modelo experimental en cerdos a los que realizan oclusión coronaria de arteria descendente anterior seguida de cardioplejia con sangre en normotermia (para intentar reproducir la situación de cardioplejia sobre miocardio con isquemia regional), compararon los resultados de la administración anterógrada respecto de la retrógrada. Los autores describieron deterioro de la función contráctil global y segmentaria en el grupo sometido a la técnica anterógrada, mientras que la vía retrógrada lograba adecuada protección de la función contráctil. No obstante, observaron también estos autores, una pérdida de la distensibilidad diastólica que atribuyen a edema microvascular y extracelular causado por la perfusión en seno *coronario*.

La necesidad de acceder al miocardio distal a la oclusión coronaria ha dado lugar al desarrollo de técnicas de retroperfusión que puedan ser realizadas por vía percutánea. Destacan la perfusión retrógrada sincronizada (PRS)

desde seno coronario (148) y la oclusión transitoria de seno coronario controlada por presión (PICSO) (167). La retroperfusión desde seno venoso en normotermia ha sido empleada como soporte para ACTP (169), en el infarto agudo de miocardio y en el tratamiento de pacientes con angina inestable (168).

Wakide, Corday y cols (148), en perros con oclusión coronaria de arteria descendente anterior, valoraron el efecto sobre la distribución de la temperatura y sobre el tamaño del infarto de su método de retroperfusión diastólica sincronizada desde seno coronario, empleando sangre arterial autóloga fría (15° C). Los autores obtuvieron reducción moderada y uniforme de la temperatura tanto en la región isquémica como en la no isquémica (con pequeños gradientes intramiocárdicos de temperatura). Esto se asociaba a una reducción de un 65% del tamaño del infarto comparado con los tratados con retroperfusión normotérmica y de un 90% comparado con los no tratados. Plantean la utilización de esta técnica en pacientes con oclusión coronaria aguda generalmente tras procedimientos fallidos de ACTP, pudiendo iniciarse su aplicación por acceso percutáneo en la sala de hemodinámica.

La técnica de oclusión transitoria de seno coronario controlada por presión (PICSO), redistribuye la sangre de las venas coronarias mediante cambios en el gradiente de presión a través del sistema venoso coronario (167). Se ha ensayado la infusión de sustancias en este sistema de retroinfusión (estreptokinasa, procainamida, agentes anti-radicales libres). Lazar y cols (167), en cerdos con oclusión coronaria de una arteria diagonal y aplicación de PICSO para la reperfusión (añadiendo L-glutamato), objetivaron disminución del tamaño del infarto en estas condiciones. Proponen también el empleo de esta técnica en la sala de hemodinámica (a través de

vena yugular o femoral hasta seno coronario) pudiendo ser empleada para la retroinfusión de fármacos (antiarrítmicos, inotropos, trombolíticos) y posteriormente en el quirófano para iniciar la cardioplejia retrógrada.

1.3.2.-Betabloqueantes.

Existen abundantes datos experimentales sobre el efecto protector de los betabloqueantes durante la isquemia y la reperfusión (8, 53, 170-172). Así, experimentos animales han demostrado que el propranolol puede disminuir la extensión del daño isquémico y el tamaño del infarto de miocardio (170, 173). Nayler y cols, en su modelo de corazón de conejo aislado, describieron que el uso profiláctico de propranolol protegía a la mitocondria del daño causado por la hipoxia (174). Los autores valoraron también el efecto de este pretratamiento (durante los 4 ó 5 días previos) con propranolol sobre la isquemia y la reperfusión (172) y observaron protección frente a la isquemia y frente a la deplección de depósitos de ATP y la capacidad de utilizar oxígeno por parte de la mitocondria durante la reperfusión. Observaron, asimismo, una reducción de la sobrecarga tisular y mitocondrial de calcio, y una mejoría de la capacidad de generar tensión en sístole. Los autores atribuyeron este efecto beneficioso del tratamiento con propranolol a que contrarrestaba el efecto del incremento de catecolaminas que ocurre durante las fases iniciales de la deprivación de oxígeno (que acelera la degradación de ATP) y a sus propiedades estabilizantes de membrana. Se describió también, en este modelo en corazón de conejo aislado (53), que el propranolol disminuía la liberación de CPK.

Algunos autores han intentado evaluar la acción de los betabloqueantes sobre la contracción regional en el segmento isquémico (64, 66, 175). Theroux y cols, en experimentos en perros sometidos a oclusión coronaria de la arteria coronaria descendente anterior (64) o circunfleja (66), observaron que la administración intravenosa de propranolol redujo a la mitad la depresión del acortamiento sistólico producido por la oclusión coronaria en el segmento marginal (definen el segmento marginal como aquel que se localiza junto a la zona de cianosis, que presenta cambios menores en el segmento ST). Sin embargo, este efecto inotrope negativo del propranolol afectó también a la contractilidad en el resto de los segmentos de miocardio, produciendo disminución de la función cardíaca global (66). Asimismo, Smith y cols (175), en experimentos en perros sometidos a oclusión coronaria de la arteria descendente anterior, observaron que el propranolol deprimía la función contráctil tanto en el miocardio isquémico como en el normal, mientras que el verapamil en el mismo modelo disminuía la contractilidad del segmento isquémico sin afectar al miocardio normal. Este efecto depresor de la contractilidad del miocardio normal puede contribuir a la aparición de episodios de insuficiencia cardíaca en pacientes con función contráctil global deprimida, tratados con betabloqueantes en la fase aguda del infarto de miocardio.

Ensayos clínicos recientes realizados con betabloqueantes en la fase aguda del infarto de miocardio han objetivado un efecto beneficioso con mejoría del pronóstico en estos pacientes (176-181). Los betabloqueantes han demostrado disminución de la mortalidad postinfarto (176, 177), que se ha atribuido a la disminución del tamaño del infarto (178) y del riesgo de reinfarto (179), así como a un efecto profiláctico frente a las arritmias ventriculares graves en el postinfarto (180). El estudio

TIMI II (181) valoró el efecto de la adición de betabloqueantes al tratamiento trombolítico, concluyendo que esta combinación mejoraba los resultados de la trombolisis en relación a la incidencia de isquemia recurrente y reinfarto, aunque no se demostró reducción de la mortalidad global.

Así pues, el efecto inotropeo negativo y cardioprotector de los betabloqueantes confiere a estos agentes propiedades potencialmente útiles para la protección durante la cardioplejia. Estudios experimentales han demostrado mejoría en la cardioprotección que proporciona la cardioplejia con potasio en hipotermia mediante la adición de betabloqueantes (182); sin embargo, su uso en las soluciones cardiopléjicas habitualmente empleadas no se ha generalizado (51).

1.3.3.-Antagonistas de los canales del calcio.

Los fármacos antagonistas de los canales del calcio poseen una acción inotropa negativa que se ha atribuido a su capacidad de disminuir el flujo lento de entrada de calcio durante la fase "plateau" del potencial de acción (53, 183), y también se han sugerido otros efectos como la inhibición de la formación de puentes (184). En estudios realizados con verapamil, en situación de déficit de oxígeno, se ha observado preservación de la función mitocondrial y de los niveles de ATP y CP por acción de este fármaco (53, 120, 183). Nayler y cols, en estudios realizados en corazón de rata aislado (76), observaron que la nifedipina y el verapamil aportaban protección frente a la paradoja del calcio, porque disminuían la entrada de calcio que ocurre en la fase precoz.

Esta función depresora de la contractilidad unida a otros posibles efectos beneficiosos durante la isquemia y la reperfusión plantea a los antagonistas de los canales del calcio como fármacos adecuados para protección miocárdica durante la isquemia. En estudios experimentales se ha analizado la posibilidad de emplear los antagonistas del calcio como agentes cardiopléjicos; así Yamamoto y cols (185), en experimentos realizados en corazón de rata aislado, tras comprobar que el verapamil era capaz de producir parada cardíaca en situación de normotermia, emplearon este fármaco (en dosis 0.5 mg/litro) como alternativa a la solución cardiopléjica habitual. Los autores observaron que la cardioplejia con verapamil en situación de normotermia proporcionaba protección al miocardio frente al daño isquémico, pero esta protección fue menor que la producida con la solución cardiopléjica habitualmente empleada en su laboratorio (solución cardiopléjica del Hospital de St. Thomas). Por su parte, Standeven y cols (186), en estudios experimentales en perros, emplearon diltiazem como agente cardiopléjico con solución sanguínea en hipotermia, no encontrando mejoría respecto a la solución cardiopléjica con potasio. Así pues, el empleo de los antagonistas de los canales del calcio como agentes cardiopléjicos no ha mostrado mejoría respecto a la cardioplejia con potasio por lo que su uso no se ha generalizado.

Sin embargo, numerosos estudios experimentales han demostrado mejoría de la preservación miocárdica mediante la adición de antagonistas del calcio a la solución cardiopléjica habitual, con alta concentración de potasio (61, 71, 127, 183, 185-188). Clark y cols (188) realizaron un ensayo clínico con adición de nifedipina a la solución cardiopléjica y observaron un descenso en los niveles de CPK y mejoría en la función contráctil tras la cirugía de revascularización en los tratados con nifedipina añadida a la cardioplejia. Asimismo, se ha descrito que el empleo de estos fármacos an-

tes del clampaje aórtico producía mejoría de la protección miocárdica que aportaba la cardioplejia posterior (con potasio en situación de hipotermia) en cirugía cardíaca con circulación extracorpórea (189, 190).

Combinación de hipotermia y antagonistas de los canales del calcio.

Algunos autores han señalado que el efecto protector que añaden los antagonistas del calcio a la solución cardiopléjica desaparece en situación de hipotermia (185, 187). Hearse y cols, en estudios en su modelo en corazón de rata aislado (187), intentaron caracterizar la dependencia respecto a la temperatura de la acción del verapamil y describen ausencia de efecto protector añadido del fármaco por debajo de los 27-29° C. Los autores plantean la posible explicación de que ambos métodos de protección, hipotermia y antagonistas del calcio, desarrollen su acción de forma similar, siendo sus efectos superponibles.

Nayler y cols (140), en estudios en corazón de conejo aislado, describieron que la adición de nifedipina a la hipotermia incrementaba el efecto protector si la temperatura se encontraba entre 27 y 37° C o por debajo de los 5° C. A temperaturas entre los 12 y los 24° C, los autores no encontraban efecto sobreañadido producido por la nifedipina.

Empleo de los antagonistas de los canales del calcio en situación de isquemia regional.

Respecto a la posibilidad de emplear los antagonistas del calcio en técnicas de cardioplejia regional, Allen y cols (127), en un modelo "in vivo", con perros sometidos a isquemia regional, emplearon una solución cardiopléjica sanguínea, marcadamente hipocalcémica, a la cual añadieron diltiazem (300 microgramos/Kg), obteniendo mejoría de la recuperación del miocardio superior a la de la cardioplejia con solución normocalcémica sin diltiazem.

Smith y cols (175), en experimentos en perros con oclusión coronaria de arteria descendente anterior, estudiaron el efecto del verapamil sobre la contractilidad regional (mediante sistema de ultrasonidos) y observaron depresión selectiva de la función contráctil en el segmento isquémico, con preservación de la contractilidad del resto de los segmentos. En relación a este aspecto, se planteaba la posible aplicación de fármacos antagonistas del calcio durante técnicas de revascularización mediante angioplastia (183, 191), con resultados no concluyentes.

Efectos protectores de los antagonistas de los canales del calcio durante la isquemia y la reperfusión.

Los estudios experimentales que analizan la acción de los antagonistas del calcio sobre la recuperación del miocardio tras la isquemia y la reperfusión encuentran efectos beneficiosos con el empleo de estos fármacos (116-120). Higginson y cols (117) en estudios experimentales realizados en perros con infusión

intracoronaria de diltiazem durante la isquemia, describieron mejoría en la recuperación del miocardio (con disminución del tamaño del infarto y mejoría de la función sistólica) en los animales tratados con diltiazem, respecto a los que tuvieron reperfusión sin esta infusión. Ferrari y cols (116) estudiaron, en un modelo de corazón de conejo aislado, el efecto de la administración de nifedipina y encontraron que ejercía un efecto protector si era administrada durante la isquemia, pero no si se administraba durante la fase de reperfusión. También se ha demostrado que el pretratamiento con diltiazem lograba disminución del tamaño del infarto tras 1 hora de oclusión coronaria en cerdos, pero este efecto beneficioso desaparecía si la duración de la oclusión era de 2 horas (192), lo que sugiere según estos autores, que el diltiazem retrasaba pero no prevenía la producción del infarto completo. Por otra parte, la eficacia de estos agentes depende del modelo experimental, de la duración de la isquemia y de la reperfusión y de la vía de administración (118).

Lange y cols (120), en experimentos realizados en perros sometidos a isquemia y reperfusión, describieron que el tratamiento con verapamil inmediatamente antes y durante 15 minutos de isquemia produjo preservación de los depósitos de ATP y disminuyó el acúmulo de productos de degradación (inosina e hipoxantina). Los autores especulan con la posibilidad de que esto sea debido a la preservación de las mitocondrias, a la disminución del acúmulo de calcio y a la disminución de los requerimientos de oxígeno.

Sin embargo, los ensayos clínicos que han valorado la utilización de los antagonistas del calcio durante el IAM no han demostrado hasta el momento resultados favorables (118, 121-123), pues no han objetivado disminución del tamaño

del infarto ni de la mortalidad. Además, estudios recientes han demostrado un empeoramiento de la insuficiencia cardíaca en pacientes con disfunción ventricular izquierda tratados con antagonistas del calcio (118, 123, 193). Por todo ello, no se considera, en general, indicado el uso sistemático de estos fármacos en pacientes con infarto de miocardio.

Soluciones con concentraciones variables de calcio.

Basados en el hallazgo del aumento de calcio citoplasmático que se observa durante la reperfusión y al que se ha atribuido la producción de daño por reperfusión, algunos autores han investigado la posibilidad de proporcionar protección al miocardio mediante la disminución de la concentración de calcio del fluido extracelular (42, 116, 124-128). Esta reducción transitoria de la concentración de calcio pretende evitar el daño producido por la sobrecarga de calcio que se observa durante la reperfusión, pero los niveles de calcio han de ser suficientemente altos para evitar la aparición de la llamada paradoja del calcio. Aunque los resultados publicados respecto a la acción de dosis bajas de calcio no son uniformes, probablemente debido a diferencias entre las distintas especies y en las condiciones de investigación, la mayoría de los autores han observado una mejoría en la protección del miocardio empleando dosis bajas de calcio en la solución cardiopléjica durante la reperfusión (124-126, 128).

Schreur y cols (42) en corazones aislados de rata sometidos a episodios de isquemia transitoria en situación de normotermia, valoraron el efecto producido por la aplicación de dosis variables de calcio (0.1-1.3 mM) durante reperfusión temprana. De acuerdo con sus resultados, el grupo que obtuvo mejor

recuperación metabólica fue el tratado con una dosis de calcio de 0.3 mM. El grupo tratado con dosis 0.1 mM tuvo una mayor deplección de los depósitos de ATP, que los autores atribuyeron al desarrollo de la paradoja del calcio.

1.3.4.-Etanol.

Existe evidencia, obtenida tanto en estudios experimentales como en ensayos clínicos en humanos, de que el etanol deprime la contractilidad del miocardio (194-198). Sin embargo, el mecanismo por el cual el alcohol produce este efecto inotrope negativo no ha sido aún completamente aclarado.

Danzinger y cols (196, 197) en experimentos en miocitos ventriculares de rata aislados, analizaron el efecto depresor de la función contráctil producido por dosis variables de etanol. Los autores describen una acción múltiple del etanol; así, con concentraciones de 0.10-0.15% (similar a los niveles en sangre en humanos durante intoxicación etílica aguda) el etanol producía depresión de la contractilidad debida a una disminución de la sensibilidad de las miofibrillas al calcio. Tras el empleo de concentraciones mayores de etanol (5%), la depresión de la contractilidad que observaron fue mayor, por acción también sobre la dinámica del calcio, con deplección de calcio del retículo endoplásmico y disminución en las elevaciones transitorias de calcio.

Wikman-Coffelt y cols (198) emplearon etanol y piruvato en una solución cardiopléjica para almacenamiento de corazón de rata durante 24 horas. Los autores observaron parada cardíaca inmediata con etanol 4%, así como mejoría de la

preservación de la función cardíaca tras almacenamiento prolongado en esta solución, comparado con la solución cardiopléjica habitual (que empleaba potasio 20 mM como agente cardiopléjico).

1.3.5. Otros agentes con acción inotropa negativa.

Otros agentes con acción depresora de la contractilidad miocárdica han sido empleados como fármacos cardiopléjicos con efecto protector sobre el miocardio durante la situación de isquemia global; como la procaína y el magnesio. La adenosina tiene un múltiple efecto protector sobre la isquemia miocárdica, presenta además acción inotropa negativa y es capaz de producir cardioplejia.

Los anestésicos locales producen parada cardíaca por bloqueo de los canales de sodio del sarcolema, habiéndose empleado en varias soluciones la procaína como agente cardiopléjico. Además, se atribuye a estos agentes un efecto protector frente al daño isquémico por inhibición del flujo transmembrana de calcio y un efecto estabilizador de membrana responsable de la disminución de la incidencia de arritmias en la fase de reperfusión. No obstante, en la actualidad su uso es controvertido (28, 51, 137).

El magnesio (a una concentración aproximada de 15 mEq/litro) provoca parada cardíaca por bloqueo completo de los canales del calcio que, al parecer, se asocia a una menor sobrecarga de calcio y a una más lenta deplección de los depósitos de ATP que la parada cardíaca provocada por potasio. Estas acciones han

motivado su uso como agente cardiopléjico y cardioprotector solo o en combinación (28, 51, 116, 137).

La marcada capacidad protectora de la adenosina, tanto endógena como exógena, frente al daño miocárdico por isquemia y reperfusión se produce por su acción a varios niveles. La adenosina incrementa el aporte de oxígeno porque produce vasodilatación coronaria y también logra disminución de la demanda de oxígeno por acción inotropa, cronotropa y dromotropa negativas. Durante la isquemia, activa la vía glicolítica y proporciona sustrato para el ciclo de las purinas, limita el daño vascular porque inhibe la liberación de radicales libres de los neutrófilos y previene la agregación plaquetaria y la formación de microtrombos. El efecto sostenido de la adenosina a largo plazo estimula la angiogénesis coronaria. Estas acciones protectoras se han confirmado en múltiples trabajos que demuestran que el tratamiento con adenosina es capaz de disminuir el tamaño del infarto, atenúa el daño por isquemia regional y global y tiene un efecto beneficioso sobre el miocardio contundido (115).

Además de todos estos efectos, la adenosina presenta efecto inotropeo negativo sobre la aurícula. Aunque no muestra acción directa sobre el músculo ventricular, es capaz de atenuar el incremento de la contractilidad mediado por estímulo beta-adrenérgico. La adenosina puede producir parada cardíaca (porque activa la corriente de salida de potasio e hiperpolariza la membrana) y se ha empleado sola o combinada con potasio en soluciones cardiopléjicas. También se plantea su posible aplicación en la preservación del corazón para trasplante, basada en los resultados de estudios experimentales que han demostrado que la adenosina prolonga el intervalo libre

de contractura y preserva la función ventricular izquierda tras almacenamiento prolongado del injerto.

1.4. Preservación miocárdica para trasplante cardíaco.

Las técnicas de preservación miocárdica adquieren una gran importancia en relación al trasplante cardíaco, puesto que la mortalidad tras el trasplante está relacionada con el tiempo de isquemia del corazón del donante antes de la cirugía (52, 199). Actualmente, los estudios de protección miocárdica intentan perfeccionar las técnicas de preservación del corazón en estas circunstancias, para lograr, por un lado, mejorar la recuperación funcional y la supervivencia tras el trasplante y, por otro, ampliar el tiempo de isquemia "tolerable", con las condiciones máximas de seguridad.

En principio, las técnicas de preservación del corazón del donante se basaban en el almacenamiento del corazón en solución hipotérmica. Posteriormente se desarrollaron métodos de perfusión continua (que proporcionaría enfriamiento miocárdico más uniforme y permitiría el "lavado" de metabolitos) con objeto de mejorar las condiciones de la preservación (50, 200). Se han empleado diferentes soluciones para la preservación del corazón del donante antes del trasplante (52, 201, 202). Al parecer, la llamada solución de la Universidad de Wisconsin ha mostrado óptimos resultados, tanto en estudios experimentales (201, 202) como en ensayos clínicos (52), en cuanto a adecuada recuperación funcional y a prolongación del tiempo de isquemia. Esta solución que se ha empleado con éxito en la preservación pretrasplante de hígado, páncreas y riñón, contiene entre otros componentes: concentración elevada de potasio (120-140 mmol/l), precursores de ATP, agentes con acción antiedema y agentes anti-

radicales libres (201, 202). La capacidad cardioprotectora superior de la solución de la Universidad de Wisconsin se ha atribuido a que lograría parada cardíaca rápidamente, mejoraría la preservación de los nucleótidos, limitaría el edema y suprimiría el daño producido por los radicales libres.

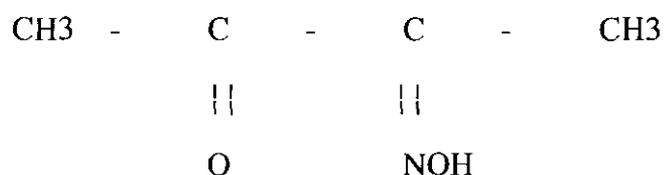
Hardesty y cols (203) describieron que el empleo de cardioplejia durante la escisión del corazón del donante y durante la implantación se asociaba a una disminución de las necesidades de drogas inotropas tras el trasplante.

Los métodos actuales de preservación del corazón para trasplante han demostrado protección adecuada durante tiempos de isquemia de hasta 4 horas (50, 199), aunque se han descrito casos con mayores períodos de isquemia pretrasplante en sistemas de almacenamiento con perfusión continua (200). Existen estudios experimentales que han analizado la preservación miocárdica durante períodos más prolongados (hasta de 24 horas) con resultados esperanzadores (204).

2. Estudios con BDM.

2.1. Antecedentes. Modelos experimentales.

La 2,3 butanodiona monoxima (BDM) o diacetil monoxima (DAM) es un agente nucleofílico perteneciente al grupo de las oximas (RCH=NOH). Su fórmula química es la siguiente:



Se trata de una molécula pequeña (peso molecular 101.1), carente de carga eléctrica, de naturaleza lipofílica lo cual permite su fácil difusión dentro y fuera del espacio intracelular. Estas propiedades condicionan la efectividad y reversibilidad de la droga (205).

Esta sustancia se utilizó inicialmente como antídoto en el tratamiento de la intoxicación por pesticidas organofosforados, los cuales actúan sobre la acetilcolinesterasa produciendo su inactivación mediante fosforilización. La BDM reactiva la acetilcolinesterasa debido a que fija y desplaza el grupo fosfato de la enzima inactiva. La BDM se definía así como una "fosfatasa química" (206, 207). Por otro lado, la BDM ha sido empleada en la determinación de urea en fluidos biológicos (208).

Posteriores observaciones permitieron comprobar que la BDM era capaz de inhibir la contracción tanto en músculo cardíaco (209-212) como en músculo esquelético (213-215) y músculo liso (216, 217).

El análisis del mecanismo por el cual la BDM ejerce esta acción depresora de la contractilidad ha sido y es objeto de estudios experimentales, en diferentes modelos:

-Preparaciones de miocitos aislados: de rata (91, 218-222), de pollo (19) y de cerdo (223, 224).

-Preparaciones de músculos papilares: de hurón (225), de cerdo (209, 226, 227) y de conejo (228).

-Preparaciones de músculo ventricular derecho de mono sano y distrófico (229).

-Corazones aislados: de rata (75, 88, 130, 230), de conejo (205, 231), de cerdo (232, 233) y de perro (234).

-Preparaciones de tejido ventricular izquierdo humano (235-237).

-Modelo "in vivo" para administración intracoronaria de BDM en perros (77, 238).

-Preparaciones de músculo estriado (214, 215, 239-241) y músculo liso (216, 217, 242).

Existe una gran variabilidad interespecie e, incluso, intraespecie respecto a los efectos observados en el tejido muscular por acción de la BDM (237, 243). Probablemente, también presenta acciones diferentes en miocardio sano y enfermo, como apuntaban West y cols a partir de estudios realizados en miocardio de ratón sano y distrófico (229). Por otra parte, las concentraciones de BDM empleadas han variado mucho en los diferentes estudios experimentales, desde 0.25-0.5 mM (215, 226), hasta 100 mM (238), aunque, en la mayoría la dosis utilizada se encontraba entre 10 y 30 mM (19, 75, 225, 235). Algunos grupos han señalado que el mecanismo de acción de la BDM puede ser diferente a diferentes concentraciones de la misma (214-216, 226). La adición de BDM produce disminución significativa de la concentración de calcio libre debido probablemente a efecto quelante (75). La BDM es rápidamente eliminada de las células y tejidos tras cesar su administración (88, 91, 212, 241).

La acción de la BDM parece potenciarse a bajas temperaturas (205, 214, 223, 232).

2.2. Efecto de la BDM sobre el tejido muscular. Propiedades farmacológicas.

Numerosos estudios experimentales han analizado el efecto depresor de la contractilidad muscular que muestra la BDM. Las diferentes acciones que se han atribuido a la BDM son, por un lado, efectos sobre la contractilidad tanto en

miocardio como en músculo liso y estriado y, por otro lado, acción sobre las propiedades electrofisiológicas. Destaca, asimismo, la importancia de la relación entre la dosis de BDM y la acción que ésta desarrolla, pues sus efectos pueden ser diferentes a distintas concentraciones.

2.2.1. Acción de la BDM sobre la contractilidad miocárdica.

La acción que la BDM ejerce sobre la contractilidad ha sido analizada tanto en miocardio como en músculo liso y estriado.

A. En miocardio.

La acción inotropa negativa que presenta la BDM ha sido atribuida a: efecto sobre los canales del calcio, alteración de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio y del ciclo de formación de puentes, actuación sobre las elevaciones transitorias de calcio intracelular y actuación sobre el potencial de acción.

Efecto sobre los canales del calcio.

En principio, se atribuyó el efecto depresor de la contractilidad que mostraba la BDM a la defosforilización de los canales del calcio, lo que disminuiría la corriente lenta de entrada de calcio a través del sarcolema (211, 212, 243). Estudios posteriores no confirmaron esta hipótesis (209, 225). Sin embargo, más recientemente,

Gwathmey y cols han descrito que la BDM disminuía la corriente de entrada de calcio a través del sarcolema y lo atribuyen a un efecto de defosforilización de la BDM sobre los canales del calcio dependientes de voltaje (223).

Alteración de la sensibilidad de las proteínas contráctiles al calcio y del ciclo de formación de puentes.

Li y cols (209), en experimentos en músculo papilar de cerdo, describieron disminución de la fuerza contráctil con BDM que no se acompañaba de inhibición de los parámetros del potencial de acción lento. Basados en estos hallazgos consideraban poco probable que la acción de la BDM se realizara mediante la defosforilización e inhibición de los canales lentos del calcio. En estudios en músculos ventriculares de cerdo, en los que se había eliminado el sarcolema por medios químicos, describieron que la adición de BDM produjo disminución de la sensibilidad de la preparación al calcio. Proponen por ello, que la BDM ejerce su efecto mediante la inhibición a nivel miofibrilar, por disminución de la sensibilidad de las miofibrillas al calcio.

Blanchard y cols (225), en experimentos con BDM en músculo papilar de hurón, señalaron que esta sustancia puede inhibir selectivamente el ciclo de formación de puentes por acción directa sobre el aparato contráctil. Morner y cols (227), en estudios realizados en músculo papilar de cerdo, describieron que la BDM (2 mM) producía un efecto inotrope negativo que, en su opinión, era debido a una acción inhibitoria sobre la formación de puentes y, posiblemente, también a la reducción de la sensibilidad de las miofibrillas al calcio.

En un estudio realizado por Perreault, Mulieri y cols (237), se analizó el efecto inotrope negativo de la BDM en miocardio humano obtenido de receptores de trasplante cardíaco. Describieron que el mecanismo principal de producción de esta acción inotropa negativa resultaba de la inhibición de la fuerza desarrollada por la formación de puentes y de la reducción en la sensibilidad de los miofilamentos al calcio. Schwinger y cols (236) en fibras de músculo papilar ventricular izquierdo y en trabéculas de aurícula derecha de corazón humano (sano y con insuficiencia cardíaca) describen también que la BDM produce, de forma reversible y dependiendo de la concentración (0.001-30 mM), una disminución en la fuerza de contracción porque disminuye la sensibilidad al calcio de las miofibrillas y la fuerza generada en la formación de puentes. También sugieren que la BDM puede reducir la disponibilidad de calcio intracelular.

West y cols (229), en estudios realizados en preparaciones de músculo ventricular derecho de mono sano y distrófico, observaron que la BDM (15-100 mM) redujo la fuerza de contracción en respuesta al calcio y disminuyó la sensibilidad del aparato contráctil al calcio tanto en músculo sano como distrófico. Observaron que las preparaciones de miocardio enfermo eran más sensibles a la acción de la BDM que las correspondientes a tejido muscular normal.

Actuación sobre las elevaciones transitorias de calcio intracelular.

Gwathmey, Hajjar y cols (223), en estudios en varias preparaciones de miocardio de hurón y de cerdo, señalaron que la BDM disminuía la corriente de

calcio a través del sarcolema y la liberación de este ión desde el retículo endoplásmico, disminuyendo la amplitud de las elevaciones transitorias de calcio intracelular. Describen también estos autores, una disminución de la respuesta de las miofibrillas al calcio y una alteración de la cinética de los puentes entre las proteínas contráctiles. No observaron alteración de la afinidad de la troponina C por el calcio. Según estos autores, el efecto de la BDM se produciría a varios niveles, que afectarían de forma conjunta disminuyendo tanto la disponibilidad de calcio como la respuesta de las miofibrillas a este ión.

Morner y cols, como hemos comentado anteriormente, estudiaron el efecto inotrope de la BDM sobre músculo papilar de cerdo. Estos autores observan en su estudio (227) que la BDM modificaba la curva de recuperación mecánica entre dos latidos consecutivos, la cual está en relación con la cinética del calcio en los depósitos intracelulares, principalmente en el retículo endoplásmico. En su opinión, esto sugiere una acción adicional de la BDM sobre el mecanismo que gobierna la liberación del calcio del retículo endoplásmico, que podría contribuir a la acción inotropa negativa de la droga.

Por su parte, Marijic y cols (226), en estudios en músculo papilar de cerdo, describen, junto a la disminución de la fuerza contráctil que produce la BDM, un incremento en la amplitud de las elevaciones transitorias de calcio intracelular. Steele y cols (244), en preparaciones de trabéculas cardíacas de rata, describen que la BDM, a concentraciones de 5-30 mM, induce una liberación neta de calcio y disminuye el contenido de calcio del retículo endoplásmico, con lo que disminuye la cantidad de calcio disponible para ser liberada desde el retículo endoplásmico durante cada sístole.

A dosis menores de BDM (1-5 mM) los autores describen que la inhibición de la fuerza contráctil era debida sobre todo a una acción directa sobre los miofilamentos. Blanchard y cols en sus primeros trabajos (225) no objetivaron influencia de la BDM sobre las oscilaciones del calcio intracelular. Por ello, estos autores han utilizado la solución BDM-manitol para bloquear la tensión contráctil y la generación de calor dependiente de la tensión y así estudiar aisladamente el componente de calor generado independientemente de la tensión, que está en relación con las oscilaciones del calcio y fundamentalmente con la captación de calcio por el retículo endoplásmico. Sin embargo, en experimentos posteriores empleando dosis variables de BDM, estos autores describen que con dosis de BDM superiores a 5mM se produce una caída de la amplitud de las elevaciones transitorias del calcio intracelular, lo cual contribuye al efecto inotrope negativo de la droga a estas concentraciones (245). La adición de BDM a bajas concentraciones (por debajo de 5 mM) reduciría la tensión de contracción sin afectar de forma significativa a las elevaciones transitorias de calcio intracelular. Estos resultados y los de Steele y cols (244) son diferentes de los obtenidos por Fryer y cols en músculo estriado de rata (214), que describieron una alteración de la liberación de calcio del retículo endoplásmico con dosis de BDM de 1 mM. Los autores atribuyen estas discrepancias en los resultados obtenidos a diferencias en el mecanismo de acoplamiento excitación-contracción entre ambos modelos.

Perreault, Mulieri y cols, en un estudio realizado con BDM en miocardio humano (237) observan junto a la ya descrita acción sobre la formación de puentes, que la BDM producía también una disminución de la disponibilidad de calcio iónico (medido con aequorina). Consideran que a altas concentraciones de BDM (por

encima de 30 mM) el efecto sobre la disponibilidad de calcio intracelular tendría un papel más importante.

Actuación sobre el potencial de acción.

Existen también hallazgos no completamente concordantes respecto a la acción de la BDM sobre el potencial de acción y la actividad eléctrica del corazón. Así, las primeras observaciones hacían referencia a una disminución en la duración del "plateau" del potencial de acción en músculo ventricular de gato (212) y en fibras de Purkinje de perro (211). También se describió que la BDM disminuía la duración del potencial de acción lento en corazón embrionario de pollo (243). Recientemente, Chapman y cols, en estudios con BDM a dosis variables (4, 8, 16, 32 mM), han descrito una reducción del potencial de acción, dependiente de la dosis de BDM, en miocitos ventriculares de cerdo aislados (224). En sus experimentos observaron que tanto la BDM como otra oxima, la nor-PAM (piridina-2-aldoxima), inhibían la corriente de calcio sensible a nifedipina. Estos autores sugieren que la inhibición de la corriente de calcio es debida a "actividad fosfatasa" de las oximas, que produciría defosforilización de los canales del calcio a nivel de las proteínas responsables de la regulación de estos canales. Liu, Cabo y cols (246), en estudios con BDM (5-20 mM) en miocardio de oveja, en músculo papilar de cerdo y en miocitos de cerdo aislados, observaron que la BDM producía reducción de la duración del potencial de acción y del período refractario dependiente de dosis, que no se acompañaba de modificación significativa de la amplitud del potencial de acción ni del potencial de reposo de la membrana. Por el contrario, como hemos comentado previamente, Li y cols (209) encontraron poco efecto de la BDM sobre la actividad eléctrica del corazón, con ligero aumento de la

duración del potencial de acción lento y un ligero acortamiento del potencial de acción rápido. Morner y cols (227) describieron también ausencia de efectos importantes de la BDM sobre el potencial de acción en sus estudios en músculo papilar de cerdo. Igualmente, Blanchard y cols, en sus estudios en músculo papilar de hurón (225), describen que la BDM no produjo efecto significativo sobre la actividad eléctrica cardíaca.

Por otra parte, Coulombe (247), en trabajos realizados en preparaciones de miocitos aislados y de corazón de rata, describe que con la adición de BDM el potencial de acción no resulta acortado sino alargado y justifican este efecto por una reducción simultánea en dos canales antagonistas con desigual influencia sobre el desarrollo del potencial de acción. Estos dos canales serían, por un lado, el canal de entrada lenta de calcio y, por otro lado, diversos componentes de la vía de salida de calcio.

Otras acciones.

De Tombe y cols (234) estudiaron el efecto de la BDM sobre la interrelación entre el estado contráctil y el consumo de oxígeno en corazón de perro aislado y, describieron que la droga no producía ninguna modificación en esta relación. Sin embargo, Hebisch y cols (232), en corazón de cerdo aislado, describieron una reducción del consumo de oxígeno asociada a la inhibición de la función contráctil que produjo la BDM (30 mM).

Estudios recientes en nuestro modelo, han demostrado que la BDM tiene un potente efecto vasodilatador coronario directo (248), que puede estar en relación con el efecto inhibitorio de la contractilidad en músculo liso.

Armstrong, Ganote y cols han descrito un efecto nocivo de la BDM sobre el citoesqueleto de los miocitos (221), puesto que en situación de isquemia o inhibición del metabolismo observaron un incremento de la fragilidad osmótica de los miocitos en presencia de BDM (ver apartado 2.3. Efecto de la BDM durante la isquemia y la reperfusión).

B. Acción de la BDM sobre la contractilidad en músculo estriado.

Estudios en músculo esquelético han mostrado que la BDM también producía disminución de la fuerza contráctil y una inhibición del ciclo de formación de puentes (213). Horiuti y cols, en estudios en músculo estriado de rana (241), describieron que la BDM producía disminución de la tensión de contracción debido fundamentalmente a la acción directa sobre el sistema contráctil, aunque produjo también efecto sobre la liberación del calcio del retículo endoplásmico.

Fryer y cols (214, 240) en experimentos en músculo estriado de rata, observaron efectos diferentes correspondientes al empleo de distintas dosis de BDM. La BDM a bajas concentraciones (1 mM), producía una disminución de la contractilidad que se acompañaba de una reducción de la cantidad neta de calcio

liberado del retículo endoplásmico. A una concentración 10 mM de BDM describían disminución en la formación de puentes y en la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles.

Hui, Maylie y cols (215, 239, 249), en estudios realizados en fibras musculares estriadas de rana, observaron que la BDM afectaba la tensión de contracción, el potencial de acción (producía reducción de la amplitud máxima) y el movimiento iónico. No obstante, su efecto sobre la tensión de contracción fue mucho más importante que el producido sobre los otros dos parámetros.

Higuchi (250) en estudios realizados en músculo esquelético de conejo, describió que la BDM tenía capacidad de inhibir la actividad ATPasa a nivel de la cadena pesada de meromiosina. Más recientemente, Herrmann y cols (251) en preparaciones de miofibrillas de psoas de conejo han analizado el efecto de la BDM (20 mM) sobre los diferentes intermediarios de la cadena de ATPasa de la miosina y han descrito que la BDM actuaba como un inhibidor no competitivo en esta cadena (que actuaría directamente sobre M^{**} . ADP. Pi).

C. Acción de la BDM sobre la contractilidad en músculo liso.

En músculo liso, Packer y cols (217, 242) refieren que la BDM disminuía el índice de formación de puentes cíclicos. Opinan que ejerce su efecto actuando sobre los puentes de formación rápida, no teniendo prácticamente acción sobre los puentes lentos. Lang y cols (216) describen que la BDM disminuye el flujo de entrada y de salida de calcio a través de los canales dependientes de voltaje. En su

opinión, la BDM se fijaría a un lugar del canal de calcio diferente del ocupado por el ión, siendo su afinidad por el canal mayor cuando éste se encuentra en estado inactivo.

La acción inotropa negativa de la BDM sobre el músculo liso vascular es probablemente responsable del potente efecto vasodilatador coronario de la BDM (233, 248).

2.2.2. Acción sobre las propiedades electrofisiológicas.

Como se ha descrito previamente, los hallazgos referidos en los distintos estudios respecto a la posible acción de la BDM sobre la amplitud del potencial de acción no son completamente concordantes (ver apartado: Acción sobre el potencial de acción).

La mayor parte de los autores describen ausencia de efectos importantes de la BDM sobre la actividad eléctrica del corazón (209, 210, 213, 233). Respecto al automatismo y la conducción, Marijic y cols (226) analizaron la frecuencia cardíaca y la conducción aurículoventricular en corazón aislado de cerdo con diferentes concentraciones de BDM. Con una concentración de 0.5-5 mM no objetivaron ninguna variación en la frecuencia cardíaca ni en la conducción AV. Tras una dosis 10 mM encontraron una ligera disminución de la frecuencia auricular, sin modificación de la conducción AV. Con concentraciones de 20-30 mM describen disociación AV. Otros experimentos, sin embargo, no han confirmado estos hallazgos.

Boban, Stowe y cols (233), en experimentos en corazón aislado de cerdo, describieron que el tratamiento con BDM durante la isquemia y la reperfusión produjo una disminución en la incidencia y duración de arritmias.

En resumen, la BDM tiene un efecto depresor de la contractilidad miocárdica que se produce fundamentalmente por inhibición de la formación de puentes entre actina y miosina y por la disminución de la sensibilidad al calcio de las proteínas contráctiles. Este efecto se produce en ausencia de cambios electrofisiológicos importantes y conduce, en la práctica, a un desacoplamiento entre activación y contracción. Otros posibles efectos de la BDM han sido más controvertidos y desarrollan probablemente un papel menor en su acción inotropa negativa: afectación directa de los canales del calcio debido a defosforilización de los mismos, modificación secundaria del potencial de acción transmembrana y alteración de la cinética del calcio por parte del retículo endoplásmico con afectación de las elevaciones transitorias del calcio intracelular.

2.2.3 Relación dosis-efecto de la BDM. Importancia de la concentración de BDM.

Existe evidencia de que sus efectos pueden ser diferentes a distintas concentraciones de BDM (75, 214, 216, 226, 233). Por ejemplo, en el estudio de Fryer y cols (214) se analizó la acción de diferentes concentraciones de BDM sobre la contractilidad en músculo esquelético, observándose que, a bajas concentraciones (inferiores a 1 mM), la BDM producía fundamentalmente disminución de la liberación de calcio desde el retículo endoplásmico. Por el contrario, con concentraciones de BDM

10 mM se observó disminución de la sensibilidad del aparato contráctil al calcio y afectación del ciclo de formación de puentes. Por su parte, Marijic, Stowe y cols (226) investigaron el efecto de diferentes concentraciones de BDM sobre corazón y músculo papilar aislados. Estos autores observaron que a dosis inferiores a 10 mM aparecía depresión de la contractilidad que no se acompañaba de alteración de la actividad eléctrica. Con concentraciones de BDM 20-30 mM, la depresión de la contractilidad era más profunda y se acompañaba de disminución de la frecuencia auricular y de disociación aurículo-ventricular.

2.3. Efecto de la BDM durante la isquemia y la reperfusión.

Numerosos estudios han analizado el efecto bloqueante de la BDM sobre la hipercontractura miocárdica que se observa durante la reperfusión, la paradoja del calcio y la paradoja del oxígeno (19, 73-75, 91, 130, 221, 233, 238, 252, 253). Los experimentos han sido realizados en distintos modelos animales, así; en miocitos aislados, en corazón aislado y en corazón "in vivo".

Estudios en miocitos aislados.

Siegmund, Piper y cols (91), en preparaciones de miocitos de rata aislados sometidos a anoxia, describen que la BDM (20 mM) puede prevenir la hipercontractura cuando es administrada antes de la aplicación de la reoxigenación y se mantiene durante 15 minutos en la fase de reoxigenación. En su opinión, la protección que aporta la BDM es debida a un efecto bloqueante del mecanismo contráctil de las miofibrillas.

Quaife y cols (19), en cultivos de miocitos ventriculares de pollo, observaron que la liberación de LDH tras 2 ó 3 horas de hipoxia seguidas de 15 minutos de reoxigenación se redujo en presencia de BDM (20 mM). En su opinión, estos resultados apoyan la idea de que parte del daño por reoxigenación es debido a hipercontractura, posiblemente en relación a la síntesis de ATP que sensibilizaría los miofilamentos al Ca en presencia de alta concentración de calcio iónico. Observaron que la BDM podía prevenir el desarrollo de la hipercontractura durante la reoxigenación, lo cual según estos autores se realizaría debido a la disminución de la sensibilidad de los elementos contráctiles al calcio por acción de esta droga.

Nichols y cols (222) utilizaron BDM para bloquear la contractura que se produce tras la inhibición de la producción de fosfatos de alta energía en miocitos ventriculares de rata. En su opinión, la BDM producía este efecto porque bloqueaba de forma reversible la formación de puentes. Consideran que la contractura, en estas condiciones, ocurre independientemente de la concentración de calcio y que la velocidad y la extensión de esta contractura viene directamente determinada por la caída de ATP.

Silverman y cols (218) estudiaron la afectación de la relajación que se produce durante la hipoxia en un modelo de miocitos ventriculares de rata. Describen que la utilización de BDM durante un período transitorio de hipoxia profunda produce mejoría de los parámetros de relajación. Consideran que esta mejoría se debe a la acción de la BDM sobre las propiedades de los miofilamentos.

Sin embargo, también se han descrito efectos perjudiciales de la BDM sobre los miocitos isquémicos. Armstrong, Ganote y cols (221) estudiaron la acción de la BDM sobre miocitos de rata aislados en condiciones de inhibición del metabolismo y de isquemia y encontraron datos de que, en esas condiciones, la inhibición de la contractura que produce la BDM se asociaba a una aceleración del daño celular. Este incremento del daño celular en presencia de BDM vino definido por la captación por parte de los miocitos de marcadores extracelulares (Trypan Blue), la determinación de la mioglobina liberada y la demostración mediante análisis ultraestructural de defectos en la integridad de la membrana. Estas observaciones se explican, probablemente, porque el mantenimiento de la integridad del citoesqueleto y de las membranas celulares precisa un proceso continuo de refosforilización de las proteínas que requiere cierto nivel de ATP. El hecho de que el incremento del daño que produce la BDM se evidencie sólo en células con depleción de ATP sugiere que la BDM podría potenciar la defosforilización de las proteínas celulares y que este efecto se expresaría en daño celular cuando los índices de refosforilización están deprimidos, a causa de un descenso crítico de los niveles de ATP.

Estudios en corazón aislado.

Vanoverschelde y cols (86, 252) estudiaron el efecto de la contractura isquémica en corazón de conejo aislado, empleando BDM para inhibir la contractilidad. Describen que tras 60 minutos de isquemia, la BDM previno la contractura, disminuyó el daño del sarcolema y facilitó la recuperación funcional en la fase de reperfusión. También observaron una disminución en la depleción de ATP. Sin embargo, tras 120 minutos de isquemia la presencia de BDM sólo permitió atenuar la

contractura y la deplección de ATP, pero no previno el daño celular (medido por la liberación de CPK) ni el fallo contráctil durante la reperfusión. Señalan, los autores, que si se aumentaba el ritmo de la glucólisis anaerobia durante la isquemia (incrementando el suministro de glucosa y de insulina) lograban prevenir el daño celular y mejorar la recuperación de la contractilidad en la fase de reperfusión.

Nayler y cols (73-75, 130), en su modelo en corazón aislado de rata, demostraron que la BDM aportaba una protección significativa frente a la paradoja del calcio. Valoran esta protección en la mejoría de 4 parámetros: el daño ultraestructural, la ganancia de Na y de Ca, y la pérdida de componentes intracelulares (75). La protección que aportaba la BDM frente a la ganancia de Ca fue menor que respecto a los otros parámetros, resultando esta entrada de calcio reducida y retrasada pero no abolida (130). Los autores sugieren la existencia de otras rutas de entrada de calcio no relacionadas con la hipercontractura. Asimismo, refieren que la protección que produjo la BDM durante la reperfusión se acompañaba de un aumento en los depósitos de ATP y CP (73). No obstante, las células no recuperaron su estado preisquémico por efecto de la BDM, puesto que tras la retirada de la droga y la continuación de la reperfusión con solución control se reprodujeron la ganancia de calcio y el daño estructural con formación de bandas de contracción similares a las de los miocitos no tratados. Proponen los autores que el daño causado por la actividad contráctil es secundario a algún otro acontecimiento deletéreo primario.

Estos mismos autores estudiaron también el efecto producido tras períodos de quiescencia eléctrica (mediante elevación de la concentración de potasio hasta 16 mM) o quiescencia mecánica (mediante la disminución de la concentración de

calcio de la solución de perfusión o utilizando BDM) inmediatamente antes del episodio isquémico (88). La recuperación funcional del miocardio tras la reperfusión fue significativamente mejor en los corazones pretratados con incremento de la concentración de potasio o empleando BDM, no así en los que se provocó parada mecánica mediante la disminución de calcio. Consideran que el efecto protector pudiera ser debido a la disminución de edema celular debido al incremento de la osmolaridad que producirían ambas infusiones. No obstante, esta explicación parece poco probable, puesto que la BDM penetra libremente dentro de las células por lo que carece de efecto osmótico. En un estudio reciente (220) describen también Nayler y cols, que la perfusión libre de calcio aumentaba el número de receptores para endotelina-1, lo cual parece asociarse a una ganancia temprana de calcio. En presencia de BDM (30 mM) este aumento de receptores resultaba atenuado. Durante la fase de repleción de calcio el número de puntos para la fijación de endotelina-1 aumentaba más, siendo este efecto revertido en presencia de BDM.

Siegmund, Piper y cols estudiaron también el efecto de la BDM sobre la paradoja del oxígeno en corazón de rata aislado (230) y observaron que el daño producido durante la hipoxia-reoxigenación podía ser prevenido cuando el aparato contráctil era temporalmente paralizado durante la fase inicial de la reoxigenación. No se observó hipercontractura ni liberación de CPK y se mantuvieron parcialmente los depósitos de creatín fosfato. Si la BDM era retirada tras 20 minutos de reoxigenación existía un incremento, aunque atenuado, de la liberación de enzimas. Cuando la BDM se mantenía durante 60 minutos de la fase de reoxigenación, no se apreciaban cambios estructurales y la liberación de enzimas era mucho menor que en los miocitos no tratados. De todas formas, parece que los miocitos no recuperaron su estado

preisquémico pues presentaban disminución de los depósitos de fosfatos de alta energía y todavía perdían pequeñas cantidades de enzimas intracelulares. Hemos señalado que Nayler y cols describieron que durante la reperfusión, tras la retirada de la BDM, se reprodujeron en los miocitos alteraciones similares a las de aquellos no tratados. Tal vez las diferencias respecto a los resultados obtenidos por Siegmund, Piper y cols corresponden a que éstos mantuvieron la perfusión de BDM durante un período más largo durante la fase de reperfusión (hasta de 60 minutos), mientras que en los experimentos de Nayler y cols la BDM era retirada tras 5 minutos (75) y 15 minutos (73) de la fase de reoxigenación. El período de tiempo más largo tal vez permitiría, por un lado, la normalización del nivel de calcio libre antes de que se restablezca la función contráctil y, por otro lado la recuperación de la resistencia mecánica del sarcolema.

Boban, Stowe y cols (233), en experimentos en corazón aislado de cerdo, describieron que concentraciones relativamente bajas de BDM (3.5-10 mM) proporcionaban cardioprotección frente a la isquemia temporal y a la reperfusión. Observaron mejoría de la función contráctil, de la relajación diastólica, del flujo y la reserva coronarios, del consumo de oxígeno y del índice entre consumo y demanda de oxígeno. Describen existencia de un efecto vasodilatador coronario de la BDM, así como una disminución en la incidencia y duración de arritmias. Hebisch y cols (232), en su modelo en corazón de cerdo aislado tratado con BDM (30 mM) durante la isquemia y la reperfusión, describieron que el efecto protector de la BDM resultaba más marcado en situación de hipotermia.

Estudios en corazón "in vivo".

En un estudio reciente OBrien y cols (238), analizaron el efecto de la BDM sobre el miocardio contundido empleando un modelo canino "in vivo" para oclusión coronaria y administración intracoronaria selectiva de BDM (100mM). Objetivaron una significativa mejoría de la función contráctil postisquémica en este modelo.

La infusión intracoronaria de BDM "in vivo", durante la fase inicial de la reperfusión ha demostrado una reducción en el tamaño final del infarto tanto en cerdos (254) como en perros (77).

2.4. Otras posibles aplicaciones de la protección miocárdica con BDM.

La administración de BDM añadida a la solución de perfusión protege al miocardio ventricular humano de la lesión por corte o disección (235, 255). Los autores de este trabajo consideran que esta cardioprotección se debe a que la BDM reduce la contractura que resulta de cortar las membranas celulares.

Una de las mayores limitaciones para la preservación prolongada de órganos para trasplante se relaciona con el daño estructural que causa la contractura isquémica miocárdica progresiva y la pérdida de distensibilidad ventricular izquierda que se asocia al descenso de los niveles de ATP. Stringham Belzer y cols, en experimentos en corazón de conejo almacenado en solución de la Universidad de

Wisconsin, a la que se añadió BDM 30 mM (205, 231, 256), observaron que la BDM inhibía de forma reversible la contractura miocárdica durante 24 horas de almacenamiento en frío, retrasaba la depleción de ATP y permitía la restauración de una función casi normal tras la reperfusión. Mejoraba así significativamente la preservación del miocardio incrementando la tolerancia del corazón a la isquemia en frío. Los autores sugieren que la BDM ejerce su efecto inhibiendo la interacción entre actina y miosina y retrasando el catabolismo intracelular de ATP. En su opinión, la mejoría en diferentes parámetros indicaría la existencia de efectos de la BDM sobre múltiples puntos de acción. Estos autores describen también que el calcio tiene un efecto protector para la preservación prolongada, pero que junto a éste puede existir otro efecto que resulta deletéreo pues induce hidrólisis acelerada de ATP y contractura isquémica más severa. Mediante la utilización conjunta de BDM y calcio en la solución para almacenamiento de corazón de conejo, desaparecen los efectos nocivos del calcio (la BDM protegió al miocardio de la pérdida de ATP inducida por el calcio) permitiendo la manifestación de la acción protectora del calcio sobre el miocardio (205). En un experimento reciente (257) estos autores utilizaron diferentes concentraciones de BDM (15, 30 y 60 mM) y de calcio (0.1-1.0 mmol/l) y observaron que la preservación más adecuada se obtuvo con la solución de la Universidad de Wisconsin modificada con BDM y calcio a dosis 30 mM y 1.0 mmol/l respectivamente.

Stowe, Boban y cols (258) estudiaron el efecto de BDM (10 mM) en corazón de cerdo aislado sometido a hipotermia durante 22 horas y observaron que la administración de BDM antes y durante la fase de hipotermia, así como en la fase inicial de la reperfusión, mejoraba la recuperación posterior del miocardio, atenuando el efecto deletéreo de la hipotermia prolongada. La administración conjunta de

adenosina, nitroprusiato y BDM durante la fase inicial de la reperfusión en este modelo produjo una mejoría superior a la obtenida con BDM. Los resultados de estos dos grupos respecto a la mejoría de la tolerancia del miocardio a la isquemia prolongada en presencia de BDM son discrepantes respecto a los obtenidos por Armstrong, Ganote y cols (221), quienes observaron una aceleración en el daño celular de los miocitos isquémicos en presencia de BDM.

La BDM no parece desempeñar un papel importante en el mantenimiento de los depósitos de ATP durante la isquemia y la reperfusión; sin embargo, tampoco existe acuerdo entre los autores respecto a este aspecto (73, 88, 205, 221, 231, 238, 252). Nayler y cols describieron, en algunos de sus experimentos (73), cierta recuperación de los depósitos de ATP y CP empleando BDM durante la reperfusión, mientras que otros estudios en el mismo modelo de corazón aislado no confirmaron estos hallazgos (88). Stringham y cols (205, 231) describieron que durante el almacenamiento prolongado de corazón de conejo, la adición de BDM se acompañaba de una disminución la velocidad de degradación del ATP. Vanovershelde y cols (252) observaron que la BDM atenuaba la depleción de los depósitos de ATP durante la isquemia en corazón de conejo aislado. Por el contrario, Armstrong, Ganote y cols (221), en sus estudios en miocitos aislados, no objetivaron ningún efecto de la BDM sobre las reservas de ATP, que resultaban reducidas durante la isquemia o la inhibición del metabolismo tanto en presencia como en ausencia de BDM.

En resumen, estudios realizados en diferentes laboratorios demuestran que la BDM es capaz de prevenir la hipercontractura que ocurre en el miocardio durante la paradoja del oxígeno, la paradoja del calcio y la reperfusión. Esta inhibición de la hipercontractura se asocia a un efecto de protección del miocardio, con mejoría de la recuperación funcional tras la reoxigenación. Respecto a la isquemia prolongada, se ha descrito cardioprotección con BDM durante períodos prolongados de isquemia en frío. Sin embargo, parece que la BDM en situación de isquemia miocárdica puede tener también un efecto nocivo sobre el citoesqueleto, con incremento de la fragilidad osmótica y aceleración del daño celular.

3.- ORIGINALIDAD DE ESTE ESTUDIO. IMPLICACIONES CLINICAS.

Los resultados de este trabajo demuestran, por primera vez, que la infusión intracoronaria selectiva de 2,3 butanodiona-monoxima permite una cardioplejia regional instantánea, controlada y rápidamente reversible. Los otros agentes con capacidad cardiopléjica previamente empleados (potasio, diltiazem ...) tardan más en producir la inhibición completa de la contractilidad del miocardio, lo cual tiene claras implicaciones respecto a su acción cardioprotectora, pues el tiempo que transcurre hasta la abolición de la contracción supone depleción de los depósitos de ATP. La recuperación de la contractilidad después de la administración de estos agentes es también más lenta que en el caso de la BDM.

La infusión intracoronaria de BDM, a concentraciones capaces de inhibir la contractilidad, no se acompañó de alteraciones electrofisiológicas importantes,

no produciendo arritmias ventriculares graves en ningún caso. Por el contrario, la infusión de diltiazem, o de una solución marcadamente hiperpotasémica produce cambios electrocardiográficos acusados. Estos cambios hacen imposible la utilización de potasio o diltiazem de forma regional sin parada cardíaca, pues se produciría una dispersión de las propiedades electrofisiológicas que favorecería la aparición de fibrilación ventricular.

Los resultados de este trabajo demostraron también, que la adición de BDM durante los últimos minutos de la isquemia y durante los 30 minutos de la reperfusión produjo un aumento final de la longitud telediastólica del grupo tratado con BDM, probablemente porque previene la "hipercontracción permanente" que provoca la reperfusión del miocardio isquémico. Estudios recientes en este modelo (259) han demostrado la existencia de una estrecha correlación entre el acortamiento de la longitud telediastólica a los 30 minutos de reperfusión y la aparición de necrosis en bandas de contracción y el tamaño del infarto.

La BDM es el único agente bloqueante de la contractilidad miocárdica que ha demostrado ser capaz de prevenir la hipercontractura inducida por la reoxigenación y la reperfusión en miocitos, corazones aislados y en la reperfusión coronaria "in situ". La aplicación durante la reperfusión de esta cardioplejia regional con BDM ha demostrado mejoría de la recuperación funcional del miocardio en perros (238) y reducción del tamaño del infarto tanto en cerdos (254) como en perros (77).

La 2,3 butanodiona monoxima no tiene una aplicación clínica en el momento actual y no conocemos todos sus posibles efectos a nivel sistémico. Sin

embargo, la posibilidad de inhibir de forma selectiva la contractilidad en una zona concreta del miocardio mediante la aplicación de esta forma de cardioplejia regional con BDM supone una nueva forma de cardioprotección que podría tener aplicación en situaciones clínicas en las que es posible la reperfusión controlada. Entre estas situaciones destacan por su frecuencia e importancia: la ACTP compleja, la cirugía cardíaca y la preservación del corazón para trasplante.

4.- CONSIDERACIONES METODOLOGICAS

En este modelo de infusión intracoronaria selectiva no es posible determinar con exactitud la concentración miocárdica de BDM.

La infusión intracoronaria de BDM se realizó a través de un catéter y hacia una pequeña zona de miocardio. No se conoce el efecto que se produciría sobre un área en riesgo de mayor tamaño ni si el empleo de una dosis más elevada tendría efectos tóxicos sistémicos. Por otra parte, considerando que el miocardio isquémico está ya aquinético, parece poco probable que la perfusión del mismo con BDM empeorara la situación hemodinámica en el curso de un infarto de miocardio agudo.

La solución empleada para infusión intracoronaria de BDM se preparó añadiendo la droga a una solución de composición normoiónica, normosmótica y normoncótica, resultando una mayor osmolaridad en la solución BDM que en la solución placebo, lo cual puede haber disminuido la producción de edema osmótico,

puesto que estudios previos realizados en este modelo (36) han demostrado que la infusión intracoronaria de una solución hiperosmótica disminuía el edema y el tamaño del infarto. No obstante, el hecho de que la BDM difunda libremente al interior de la célula hace imposible que esta sustancia modifique de forma importante las fuerzas osmóticas entre el espacio intracelular y el intersticial.

El modelo porcino empleado para este experimento carece prácticamente de circulación colateral a diferencia del modelo canino, y puede no reflejar adecuadamente la situación creada por una oclusión coronaria en algunos pacientes con infarto de miocardio y circulación colateral bien desarrollada como consecuencia de una larga historia de enfermedad coronaria progresiva. Sin embargo, otros autores han podido reproducir recientemente los resultados de este estudio en un modelo canino (77).

Los resultados del presente estudio no permiten descartar que la administración de BDM intracoronaria pueda aumentar el riesgo de arritmias durante la reperfusión. No hemos estudiado posibles efectos tóxicos derivados de la BDM a nivel sistémico.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1) La infusión intracoronaria selectiva de 2,3-butanodiona monoxima produce inhibición reversible de la contractilidad en el segmento de miocardio correspondiente, por acción sobre el acoplamiento entre actina y miosina, y permite, por primera vez, una cardioplejia regional, instantánea, controlada y rápidamente reversible.

2) El grado de inhibición de la contractilidad, depende de la concentración de BDM en el miocardio dependiente de la arteria infundida, la cual viene determinada por la velocidad de la infusión . El cese de la contractilidad se inicia a los pocos segundos del comienzo de la infusión y la interrupción de esta infusión se acompaña de una rápida restauración de la actividad contráctil.

3) La infusión intracoronaria de BDM produjo cambios en la situación hemodinámica (con reducción de la tensión arterial sistólica y aumento de la frecuencia cardíaca) y en la contractilidad regional en todos los animales. Las modificaciones de la contracción segmentaria consistieron en un aumento de la longitud telediastólica y una marcada reducción de la fracción de acortamiento. La oclusión coronaria de la arteria produce cambios contráctiles superponibles a los descritos para la infusión de BDM.

4) La infusión intracoronaria de BDM a concentraciones capaces de inhibir la contractilidad no se acompaña de alteraciones electrofisiológicas importantes, y no produjo arritmias ventriculares en ningún caso.

5) La modificación de la concentración de calcio extracelular no se acompañó de cambios en la contracción segmentaria, siendo el efecto de la BDM independiente del descenso de la concentración de calcio iónico causado por la capacidad quelante de la droga.

6) La oclusión coronaria prolongada en ausencia de circulación colateral se acompaña de un marcado aumento de la longitud telediastólica y una disminución de la fracción de acortamiento, mientras que en los primeros minutos de la reperfusión se objetiva una rápida caída de la longitud telediastólica, que alcanza frecuentemente valores inferiores a los basales.

7) La infusión de BDM durante los últimos minutos de la isquemia y durante 30 minutos de la reperfusión se acompaña de un aumento del abombamiento sistólico al inicio de la reperfusión y un aumento final de la longitud telediastólica que se debe probablemente a que la BDM previene la "hipercontracción" que provoca la reperfusión en zonas del miocardio isquémico.

8) En presencia de isquemia, la infusión de BDM se acompaña de una mayor vulnerabilidad eléctrica y de un aumento del riesgo de fibrilación ventricular.

VII. BIBLIOGRAFIA

VII. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Jennings RB, Reimer KA. Factors involved in salvaging ischemic myocardium: effect of reperfusion of arterial blood. *Circulation* 1983; 68 (suppl I): I25-I36.
- 2.- Lavie CJ, Gersh BJ, Chesebro JH. Reperfusion in acute myocardial infarction. *Mayo Clin Proc* 1990; 65: 549-564.
- 3.- Braunwald E, Kloner RA. Myocardial reperfusion: a double-edged sword? *J Clin Invest* 1985; 76: 1713-1719.
- 4.- Braunwald E. Myocardial reperfusion, limitation of infarct size, reduction of left ventricular dysfunction, and improved survival. Should the paradigm be expanded? *Circulation* 1989; 79: 441-444.
- 5.- García-Dorado D, Fernández-Avilés F. Mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y la reperfusión miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 1988; 41 (2): 109-119.
- 6.- Pasternak RC, Braunwald E, Sobel BE. Acute myocardial infarction. En: Braunwald E. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Fourth Edition. W. B. Saunders Company. 1992; 1200-1291.

- 7.- Nayler WG, Elz JS. Reperfusion injury: laboratory artifact or clinical dilemma?. *Circulation* 1986; 74: 215-221.
- 8.- Opie LH. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation* 1989; 80: 1049-1062.
- 9.- Vinten-Johansen J, Johnston WE, Mills SA, Faust KB, Geisinger KR, DeMasi RJ, Cordell AR. Reperfusion injury after temporary coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1988; 95: 960-8.
- 10.- Marsh JD, Smith TS. Calcium overload and ischemic myocardial injury. *Circulation* 1991; 83: 709-711.
- 11.- Opie LH. Myocardial reperfusion: calcium and free radicals. En: Opie LH. *The Heart. Physiology and metabolism*. Second edition. Raven Press. 1991. 469-483.
- 12.- García-Dorado D, Sanz E. Daño miocárdico por perfusión: ¿un problema mecánico? *Rev Esp Cardiol* 1992; 45: 83-87.
- 13.- Ganote Ch, Armstrong S. Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1387-1403.
- 14.- Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen Ch. Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Moll Cell Cardiol* 1986; 18: 769-780.

- 15.- Miura T. Does reperfusion induce myocardial necrosis? *Circulation* 1990; 82: 1070-1072.
- 16.- García-Dorado D, Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1555-1563.
- 17.- Ganz W, Watanabe I, Kanamasa K, Yano J, Han D, Fishbein MC. Does reperfusion extend necrosis? A study in a single territory of myocardial ischemia half reperfused and half not reperfused. *Circulation* 1990; 82: 1020-1033.
- 18.- Reimer KA, Jennings RB. The "Wavefront Phenomenon" of myocardial ischemic cell death. *Lab Invest* 1979; 40: 633-644.
- 19.- Quaife RA, Kohmoto O, Barry WH. Mechanisms of reoxygenation injury in cultured ventricular myocytes. *Circulation* 1991; 83: 566-577.
- 20.- Siegmund B, Koop A, Kliez T, Schwartz P, Piper HM. Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1990; 258: H285-H291.
- 21.- Steenbergen Ch, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic, and ischemic myocardium in vitro. Effects of osmotic cell swelling on plasma membrane integrity. *Circ Res* 1985; 57: 864-875.

- 22.- Steenbergen Ch, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 1987; 60: 478-486.
- 23.- Ganote CHE, Vander Heide RS. Irreversible injury of isolated adult rat myocytes. Osmotic fragility during metabolic inhibition. *Am J Pathol* 1988; 132: 212-222.
- 24.- Ganote ChE, Vander Heide RS. Cytoskeletal lesions in anoxic myocardial injury. A conventional and high-voltage electron-microscopic and immunofluorescence study. *Am J Pathol* 1987; 129: 327-344.
- 25.- Anderson PG, Bishop SP, Digerness SB. Transmural progression of morphologic changes during ischemic contracture and reperfusion in the normal and hypertrophied rat heart. *Am J Pathol* 1987; 129: 152-167.
- 26.- Reimer KA, Jennings RB, Cobb FR et al. Animal models for protecting ischemic myocardium: results of the NHLBI Cooperative Study. *Circ Res* 1985; 56: 651-665.
- 27.- Jennings RB, Reimer KA. Patología de la isquemia miocárdica aguda. *Hospital Practice (Ed Español)* 1989; 4: 41-57.

- 28.- Rankin JS, Sabiston DC. The coronary circulation. I. Physiology of coronary blood flow, myocardial function and intraoperative myocardial protection. En: Sabiston DC. Surgery of the Chest. Vol II. WB Saunders Company. Fifth Edition, 1990; 1635-1653.
- 29.- García-Dorado D, Théroux P, Desco M, Solares J, Elízaga J, Fernandez-Avilés F, Alonso J, Soriano J. Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am J Physiol* 1989; 256: H1266-H1273.
- 30.- García-Dorado D, Théroux P, Elízaga J, Galiñanes M, Solares J, Riesgo M, Gómez MJ, García-Dorado A, Fernández-Avilés F. Myocardial reperfusion in the pig heart model: infarct size and duration of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1987; 21: 537-544.
- 31.- Alonso J. Estudio de la participación del radical superóxido en la génesis del daño por reperfusión. Tesis Doctoral. Universidad de Alcalá de Henares. Madrid 1990.
- 32.- Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial protection is lost before contractile function recovers from ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1991; 260: H796-H804.
- 33.- Cohen MV, Downey JM. Myocardial stunning in dogs: preconditioning effect and influence of coronary collateral flow. *Am Heart J* 1990; 120: 282-291.

- 34.- Williams DO, Boatwright RB, Rugh KS, Garner HE, Griggs DM. Myocardial blood flow, metabolism, and function with repeated brief coronary occlusions in conscious ponies. *Am J Physiol* 1991; 260: H100-H109.
- 35.- Schott RJ, Rohmann S, Braun ER, Schaper W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 1133-1142.
- 36.- García-Dorado D, Theroux P, Muñoz R, Alonso J, Elízaga J, Fernández-Avilés F, Botas J, Solares J, Soriano J, Durán JM. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* 1992; 262: H17-H22.
- 37.- Tranum-Jansen J, Jansen MJ, Fiolet JWT, Krieger WJC, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolarity, cell swelling, and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart: *Circ Res* 1981; 49: 364-381.
- 38.- Werns SW, Shea MJ, Mitsos SE et al. Reduction of the size of infarction by allopurinol in the ischemic-reperfused canine heart. *Circulation* 1986; 73: 518-524.
- 39.- Engler R, Covell JW. Granulocytes cause reperfusion ventricular dysfunction after 15-minute ischemia in the dog. *Circ Res* 1987; 61: 20-28.
- 40.- Metzdorff MT, Grunkemeier GL, Starr A. Effect of initial reperfusion temperature on myocardial preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 91: 545-550.

- 41.- Okada T. Facilitating effect of cold shock on recovery from anoxia-induced contractile depression in isolated rat heart and heart muscle. *Circ Res* 1988; 62: 338-346.
- 42.- Schreur JHM, Kirkels JH, Van Echteld CJA, Ruigrok TJC. Postischaemic metabolic and functional recovery of rat heart after transient reperfusion with various low Ca^{++} concentrations. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 687-693.
- 43.- Bush LR, Buja LM, Samowitz W, Rude RE, Wathen M, Tilton GD, Willerson JT. Recovery of left ventricular segmental function after long-term reperfusion following temporary coronary occlusion in conscious dogs. Comparison of 2- and 4-hour occlusions. *Circ Res* 1983; 53: 248-263.
- 44.- Elízaga J. Factores que determinan el tamaño del infarto de miocardio en el modelo experimental de oclusión coronaria transitoria en el cerdo: influencia de la hipertensión arterial y la taquicardia. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma. Madrid 1987.
- 45.- Feldman RL, Pepine CJ. Evaluation of coronary collateral circulation in conscious humans. *Am J Cardiol* 1984; 53: 1233-1238.
- 46.- Frank JS, Brady AJ, Farnsworth S, Mottino G. Ultrastructure and function of isolated myocytes after calcium depletion and repletion. *Am J Physiol* 1986; 250: H265-H275.

- 47.- Miyazaki S, Fujiwara H, Onodera T et al. Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart. *Circulation* 1987; 75: 1074-1082.
- 48.- García-Dorado D. La era de la reperfusión miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 1992; 45 (supl 2): 1-8.
- 49.- Kirklin JW. Historical developments in myocardial management during cardiac surgery. En: Engelman RM, Levitsky S. *A textbook of cardioplegia for difficult clinical problems*. NY, Futura Publishing Company. 1992; 1-7.
- 50.- Qayumi AK, Jamieson WRE, Rosado LJ et al. Preservation techniques for heart transplantation: comparison of hypothermic storage and hypothermic perfusion. *J Heart Lung Transplant* 1991; 10: 518-526.
- 51.- Kirklin JW. Myocardial protection during cardiac surgery with cardiopulmonary bypass. General considerations. En: *Cardiac Surgery*. Kirklin JW, Barratt-Boyes BG. John Wiley and Sons 1986: 92-108.
- 52.- Stein DG, Drinkwater DC, Laks H, Permut LC, Sangwan S, Chait HI, Child JS, Bhuta S. Cardiac preservation in patients undergoing transplantation. A clinical trial comparing University of Wisconsin solution and Stanford solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 102: 657-65.

- 53.- Nayler WG, Slade AM. Pharmacological protection of the hypoxic heart: enzymatic, biochemical and ultrastructural studies in the isolated heart. En: Hearse DJ. Enzymes in cardiology. Diagnosis and research. Wiley-Interscience Publication. 1979; 503-527.
- 54.- Ip JH, Levin RI. Myocardial preservation during ischemia and reperfusion. *Am Heart J* 1988; 115 (5): 1094-1104.
- 55.- Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractile function during ischemia and hypoxia. *Circ Res* 1987; 60: 153-168.
- 56.- Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen Ch, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985; 56: 262-278.
- 57.- Marban E, Koretsune Y, Corretti M, Chacko VP, Kusuoka H. Calcium and its role in myocardial cell injury during ischemia and reperfusion. *Circulation* 1989; 80 (suppl IV): IV17-IV22.
- 58.- Hajjar RJ, Gwathmey JK. Direct evidence of changes in myofilament responsiveness to Ca^{++} during hypoxia and reoxygenation in myocardium. *Am J Physiol* 1990; 259: H784-H795.

- 59.- Kanaide H, Taira Y, Nakamura M. Transmural anoxic wave front and regional dysfunction during early ischemia. *Am J Physiol* 1987; 253: H240-H247.
- 60.- Koretsune Y, Marban E, Relative roles of calcium dependent and calcium-independent mechanism in hypoxic contractile dysfunction. *Circulation* 1990; 82: 528-535.
- 61.- Steenbergen C, Murphy E, Watts JA, London RE. Correlation between cytosolic free calcium, contracture, ATP, and irreversible ischemic injury in perfused rat heart. *Circ Res* 1990; 66: 135-146.
- 62.- Smith GL, Allen DG. Effects of metabolic blockade on intracellular calcium concentration in isolated ferret ventricular muscle. *Circ Res* 1988; 62: 1223-1236.
- 63.- Barry WH, Peeters GA, Rasmussen CAF, Cunningham MJ. Role of changes in $[Ca^{++}]$ in energy deprivation contracture. *Circ Res* 1987; 61: 726-734.
- 64.- Theroux P, Franklin D, Ross J Jr, Kemper WS. Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ Res* 1974; 35: 896-908.
- 65.- Ross J Jr. Assessment of ischemic regional myocardial dysfunction and its reversibility. *Circulation* 1986; 74: 1186-1191.

- 66.- Théroux P, Ross J, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S. Regional myocardial function in the conscious dog during acute coronary occlusion and responses to morphine, propranolol, nitroglycerin and lidocaine. *Circulation* 1976; 53: 302-314.
- 67.- Akaishi M, Weintraub WS, Schneider RM, Klein LLW; Agarwal JB, Helfant RH. Analysis of systolic bulging. Mechanical characteristics of acutely ischemic myocardium in the conscious dog. *Circ Res* 1986; 58: 209-217.
- 68.- Ohtsuka S, Kakihana M, Doi T, Sugishita Y, Ito I. Effects of acutely impaired regional function on remote myocardial wall motion and blood flow in the canine left ventricle studied by coronary occlusion and hypoxic perfusion. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 433-439.
- 69.- García-Dorado D, Théroux P, Esteban E, Alonso J, Durán JM, Elízaga J, Muñoz R, Botas J, Soriano J, Fernández-Avilés F. Role of oxygen restoration in reperfusion-induced arrhythmias: differential effects on ventricular ectopic activity and ventricular fibrillation in the pig. *J Appl Cardiol* 1991; 6: 411-420.
- 70.- Bullock GR. Structural changes at cardiac cell junctions during ischaemia. *J Moll Cell Cardiol* 1986; 18 (supl 4): 1-5.
- 71.- Nayler WG. Calcium and cell death. *Eur Heart J* 1983; 4 (suppl C): 33-41.

- 72.- Hearse DJ, Humphrey SM, Bullock GR. Reoxygenation, reperfusion and the calcium paradox: studies of cellular damage and enzyme release. En: Hearse DJ. Enzymes in cardiology. Diagnosis and research. Wiley-Interscience Publication. 1979; 417-444.
- 73.- Elz JS, Nayler WG. Contractile activity and reperfusion induced calcium gain after ischemia in the isolated rat heart. *Lab Invest* 1988; 58: 653-659.
- 74.- Elz JS, Panagiotopoulos S, Nayler WG. Reperfusion-induced calcium gain after ischemia. *Am J Cardiol* 1989; 63: 7E-13E.
- 75.- Daly MJ, Elz JS, Nayler WG. Contracture and the calcium paradox in the rat heart. *Circ Res* 1987; 61: 560-569.
- 76.- Nayler WG, Perry SE, Elz JS, Daly MJ. Calcium, sodium and the calcium paradox. *Circ Res* 1984; 55: 227-237.
- 77.- Siegmund B, Schlüter KD, Piper HM. Calcium and the oxygen paradox. *Cardiovasc Res* 1993; 27(10): 1778-1783.
- 78.- Crake T, Poole-Wilson PA. Calcium exchange in rabbit myocardium during and after hypoxia: role of sodium-calcium exchange. *J Mol Cell Cardiol* 1990; 22: 1051-1064.

- 79.- Murphy JG, Smith TW, Marsh JD. Mechanisms of reoxygenation-induced calcium overload in cultured chick embryo heart cells. *Am J Physiol* 1988; 254: H1133-H1141.
- 80.- Dixon IMC, Eyoifson DA, Dhalla NS. Sarcolemmal Na^+ - Ca^{++} exchange activity in hearts subjected to hypoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1987; 253: H1026-H1034.
- 81.- Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{++} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+ - Na^+ and Na^+ - Ca^{++} exchange. *Circ Res* 1989; 65: 1045-1056.
- 82.- Weiss RG, Lakatta EG, Gerstenblith G. Effects of amiloride on metabolism and contractility during reoxygenation in perfused rat hearts. *Circ Res* 1990; 66: 1012-1022.
- 83.- Pesaturo JA, Gwathmey JK. The role of mitochondria and sarcoplasmic reticulum calcium handling upon reoxygenation of hypoxic myocardium. *Circ Res* 1990; 66: 696-709.
- 84.- Stone D, Darley-Usmar V, Smith DR, O'Leary V. Hypoxia-reoxygenation induced increase in cellular Ca^{++} in myocytes and perfused hearts: the role of mitochondria. *J Moll Cell Cardiol* 1989; 21: 963-973.

- 85.- Piper HM, Siegmund B, Ladilov YV, Schluter KD. Calcium and sodium control in hypoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Basic Res Cardiol* 1993; 88(5): 471-482.
- 86.- Vanoverschelde JL, Janier MF, Bergmann SR. The relative importance of myocardial energy metabolism compared with ischemic contracture in the determination of ischemic injury in isolated perfused rabbit hearts. *Circ Res* 1994; 74: 817-828.
- 87.- Sanz E, García-Dorado D, Oliveras J, Carreras MJ, Lidón RM, Théroux P, Soler-Soler J. Disminución del edema miocárdico postreperfusión tras preconditionamiento isquémico. *Rev Esp Cardiol* 1991; 44 (supl 1): 109.
- 88.- Nayler WG, Elz JS, Buckley DJ. The stunned myocardium: effect of electrical and mechanical arrest and osmolarity. *Am J Physiol* 1988; 255: H60-H69.
- 89.- Bernier M, Hearse DJ. Reperfusion induced arrhythmias: mechanism of protection by glucose and mannitol. *Am J Physiol* 1988; 254: H862-H870.
- 90.- Sanz E, García-Dorado D. Remodelado ventricular en el infarto de miocardio. *Rev Esp Cardiol* 1992; 45(6): 397-411.
- 91.- Siegmund B, Kliez T, Schwartz P, Piper HM. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1991; 260: H426-H435.

- 92.- Schouten VJA, Los GJ, Kuypers PDL, Brinkman CJJ, Huysmans HA. Paradox of enhanced contractility in postischemic rat hearts with depressed function. *Am J Physiol* 1991; 260: H89-99.
- 93.- Koyama T, Temma K, Akera T. Reperfusion-induced contracture develops with a decreasing intracellular $[Ca^{++}]$? in single heart cells. *Am J Physiol* 1991; 261: H1115-H1122.
- 94.- Rumsey WL, Wilson DF, Erecinska M. Relationship of myocardial metabolism and coronary flow: dependence on extracellular calcium. *Am J Physiol* 1987; 253: H1098-H1105.
- 95.- Vander Heide RS, Altschuld RA, Lamka KG, Ganote CHE. Modification of Caffeine-Induced injury in calcium-free perfused rat hearts. Relation to the calcium paradox. *Am J Pathol* 1986; 123: 351-364.
- 96.- Vander Heide RS, Ganote CHE. Caffeine-Induced myocardial injury in calcium-free perfused rat hearts. *Am J Pathol* 1985; 118: 55-65.
- 97.- Stern MD, Chien AM, Capogrossi MC, Pelto DJ, Lakatta EG. Direct observation of the "oxygen paradox" in single rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1985; 56: 899-903.

- 98.- Piper HM, Schwartz P, Spahr R, Hüter JF, Spieckermann PG. Absence of reoxygenation damage in isolated heart cells after anoxic injury. *Pflügers Arch* 1984; 401: 71-76.
- 99.- McCord JM. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985; 312: 159-163.
- 100.- Bolli R. Superoxide dismutase 10 years later: a drug in search of a use. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 231-233.
- 101.- Kinsman JM, Murry ChE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. The xanthine oxidase inhibitor oxypurinol does not limit infarct size in a canine model of 40 minutes of ischemia with reperfusion. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12: 209-217.
- 102.- Werns SW, Grum CM, Ventura A et al. Xanthine oxidase inhibition does not limit canine infarct size. *Circulation* 1991; 83: 995-1005.
- 103.- Uraizee A, Reimer KA, Murry ChE, Jennings RB. Failure of superoxide dismutase to limit size of myocardial infarction after 40 minutes of ischemia and 4 days of reperfusion in dogs. *Circulation* 1987; 75: 1237-1248.
- 104.- Richard VJ, Murry ChE, Jennings RB, Reimer KA. Therapy to reduce free radicals during early reperfusion does not limit the size of myocardial infarcts caused by 90 minutes of ischemia in dogs. *Circulation* 1988; 78: 473-480.

- 105.- Eddy LJ, Stewart JR, Jones HP, Engerson TD, McCord JM, Downey JM. Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts. *Am J Physiol* 1987; 253: H709-H711.
- 106.- Kawata H, Aoki M, Hickey PR, Mayer JE. Effect of antibody to leukocyte adhesion molecule CD18 on recovery of neonatal lamb hearts after 2 hours of cold ischemia. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II364-II370.
- 107.- García-Dorado D, Theroux P, Solares J et al. Determinants of hemorrhagic infarcts. Histologic Observations from experiments involving coronary occlusion, coronary reperfusion, and reocclusion. *Am J Pathol* 1990; 137: 301-311.
- 108.- Galiñanes M, Hearse DJ. Diltiazem and/or desferrioxamine administered at the time of reperfusion fail to improve post-ischemic recovery in the isolated rat heart after long-term hypothermic storage. *J Moll Cell Cardiol* 1990; 22: 1211-1220.
- 109.- García-Dorado D, Théroux P, Alonso J, Elízaga J, Botas J, Fernández-Avilés F, Soriano J, Muñoz R, Solares J. Intracoronary infusion of superoxide dismutase and reperfusion injury in the pig heart. *Basic Res Cardiol* 1990; 85: 619-629.

- 110.- Alonso J, García-Dorado D, Durán JM, Esteban E, Muñoz R, Botas J, Soriano J, Elízaga J, Théroux P. Papel de la reoxigenación en la génesis de las arritmias de reperfusión después de una oclusión coronaria in situ. *Rev Esp Cardiol* 1991; 44 (supl 1): 109.
- 111.- Dauber IM, VanBenthuyzen KM, McMurtry IF et al. Functional coronary microvascular injury evident as increased permeability due to brief ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66: 986-998.
- 112.- Bolli R. Mechanism of myocardial "stunning". *Circulation*; 82: 723-738.
- 113.- Braunwald E. Letters to the editor. The stunned myocardium: newer insights into mechanisms and clinical implications. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 100: 310-11.
- 114.- Tani M, Neely JR. Intermittent perfusion of ischemic myocardium. Possible mechanism of protective effects on mechanical function in isolated rat heart. *Circulation* 1990; 82: 536-548
- 115.- Ely SW, Berne RM. Protective effects of adenosine in myocardial ischemia. *Circulation* 1992; 85: 893-904.
- 116.- Ferrari R, Albertini A, Curello S, Ceconi C, Di Lisa F, Raddino R, Visioli O. Myocardial recovery during post-ischaemic reperfusion: effects of nifedipine, calcium and magnesium. *J Moll Cell Cardiol* 1986; 18: 487-498.

- 117.- Higginson L, Tang A, Knoll G, Calvin J. Effect of intracoronary diltiazem on infarct size and regional myocardial function in the ischemic reperfused canine heart. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 868-875.
- 118.- Kloner R, Przyklenk K. Experimental infarct size reduction with calcium channel blockers. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 876-878.
- 119.- Taylor AL, Golino P, Eckels R, Pastor P, Buja LM, Willerson JT. Differential enhancement of postischemic segmental systolic thickening by diltiazem. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 737-747.
- 120.- Lange R, Ingwall J, Hale SL, Alker KJ, Braunwald E, Kloner RA. Preservation of high-energy phosphates by verapamil in reperfused myocardium. *Circulation* 1984; 70 (4): 734-741.
- 121.- Skolnick AE, Frishman WH. Calcium channel blockers in myocardial infarction. *Arch Intern Med* 1989; 149: 669-677.
- 122.- Roberts R. Review of calcium antagonist trials in acute myocardial infarction. *Clin Cardiol* 1989; 12 (suppl III): III4-III47.
- 123.- Goldstein RE, Boccuzzi ST, Cruess D, Nattel S. Diltiazem increases late-onset congestive hearts failure in postinfarction patients with early reduction in ejection fraction. *Circulation* 1991; 83: 52-60.

- 124.- Caspi J, Herman SL, Coles JG, Benson LN, Radde I, Augustine J, Hamilton F, Castellarin S, Kumar R, Wilson GJ. Effects of low perfusate Ca^{++} concentration on newborn myocardial function after ischemia. *Circulation* 1990; 82 (suppl IV): IV371-IV379.
- 125.- Ledingham SJM, Braimbridge MV, Hearse DJ. The St Thomas' Hospital cardioplegic solution. A comparison of the efficacy of two formulations. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 240-246.
- 126.- Kinoshita K, Oe M, Tokunaga K. Superior protective effect of low-calcium, magnesium-free potassium cardioplegic solution on ischemic myocardium. Clinical study in comparison with St. Thomas' Hospital solution. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101: 695-702.
- 127.- Allen BS, Okamoto F, Buckberg GD, Acar C, Partington M, Bugyi H, Leaf J. Studies of controlled reperfusion after ischemia. IX. Reperfusate composition: benefits of marked hypocalcemia and diltiazem on regional recovery. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92: 564-572.
- 128.- Tani M, Neely JR. Mechanism of reduced reperfusion injury by low Ca^{++} and/or high K^+ . *Am J Physiol* 1990; 258: H1025-H1031.
- 129.- Opie LH. ATP synthesis and breakdown. En: *The Heart. Physiology, Metabolism, Pharmacology and Therapy*. LH Opie. Grune Stratton 1984: 136-153.

- 130.- Nayler WG, Elz JS, Buckley DJ. Dissociation of hypoxia-induced calcium gain and rise in resting tension in isolated rat hearts. *Am J Physiol* 1988; 254: H678-H685.
- 131.- Hearse DJ, Stewart DA, Chain EB. Recovery from cardiac bypass and elective cardiac arrest. The metabolic consequences of various cardioplegic procedures in the isolated rat heart. *Circ Res* 1974; 35: 448-457.
- 132.- Buckberg GD, Brazier JR, Nelson RL, Goldstein SM, McConnell DH, Cooper N. Studies of the effects of hypothermia on regional myocardial blood flow and metabolism during cardiopulmonary bypass. I. The adequately perfused beating, fibrillatory and arrested heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1977; 73: 87-94.
- 133.- Opie LH. Myocardial infarction. En: *The Heart. Physiology, Metabolism, Pharmacology and Therapy*. LH Opie. Grune Stratton 1984: 351-371.
- 134.- Akins CW. Early and late results following elective isolated myocardial revascularization during hypothermic fibrillatory arrest. *Circulation* 1985; 72 (suppl 3): 375.
- 135.- Akins CW. Early and late results following emergency isolated myocardial revascularization during hypothermic fibrillatory arrest. *Ann Thorac Surg* 1987; 43: 131-137.

- 136.- Greene PS, Cameron DE, Griffiths EM, DiNatale JM, Gardner TJ. Does hypothermic fibrillatory arrest improve myocardial protection during emergency revascularization? *Ann Thorac Surg* 1989; 48: 38-42.
- 137.- Hearse DJ, Stewart DA, Braimbridge MV, Chir B. Cellular protection during myocardial ischemia. The development and characterization of a procedure for the induction of reversible ischemic arrest. *Circulation* 1976; 54: 193-202.
- 138.- Navas JP, Anderson W, Marsh JD. Hypothermia increases calcium content of hypoxic myocytes. *Am J Physiol* 1990; 259: H333-H339.
- 139.- Ferrari R, Raddino R, Di Lisa F, Ceconi C, Curello S, Albertini A, Nayler W. Effects of temperature on myocardial calcium homeostasis and mitochondrial function during ischemia and reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990; 99: 919-28.
- 140.- Nayler WG. Protection of the myocardium against postischemic reperfusion damage. The combined effect of hypothermia and nifedipine. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 84: 897-905.
- 141.- Jones RN, Reimer KA, Hill ML, Jennings B. Effect of hypothermia on changes in high-energy phosphate production and utilization in total ischemia. *J Moll Cell Cardiol* 1982; 14: 123-130.

- 148.- Wakida Y, Haendchen RV, Kobayashi S, Nordlander R, Corday E. Percutaneous cooling of ischemic myocardium by hypothermic retroperfusion of autologous arterial blood: effects on regional myocardial temperature distribution and infarct size. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 293-300.
- 149.- Flack JE, Hafer J, Engelman RM, Rousou JA, Deaton DW, Pekow P. Effect of normothermic blood cardioplegia on postoperative conduction abnormalities and supraventricular arrhythmias. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II385-II392.
- 150.- Engelman RM. Retrograde continuous warm blood cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1991; 51: 180-181.
- 151.- Holman WL, Spruell RD, Digerness SB, Dudelston J, Pacifico AD. Oxyhemoglobin dissociation during hypothermic blood cardioplegia arrest. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II339-II345.
- 152.- Buckberg GD. Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 127-139.
- 153.- Rousou JH, Dobbs WA, Meeran MK, Engelman RM. The temperature dependence of recovery of metabolic function following hypothermic potassium cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 83: 117-121.

- 148.- Wakida Y, Haendchen RV, Kobayashi S, Nordlander R, Corday E. Percutaneous cooling of ischemic myocardium by hypothermic retroperfusion of autologous arterial blood: effects on regional myocardial temperature distribution and infarct size. *J Am Coll Cardiol* 1991; 18: 293-300.
- 149.- Flack JE, Hafer J, Engelman RM, Rousou JA, Deaton DW, Pekow P. Effect of normothermic blood cardioplegia on postoperative conduction abnormalities and supraventricular arrhythmias. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II385-II392.
- 150.- Engelman RM. Retrograde continuous warm blood cardioplegia. *Ann Thorac Surg* 1991; 51: 180-181.
- 151.- Holman WL, Spruell RD, Digerness SB, Dudelston J, Pacífico AD. Oxyhemoglobin dissociation during hypothermic blood cardioplegia arrest. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II339-II345.
- 152.- Buckberg GD. Strategies and logic of cardioplegic delivery to prevent, avoid, and reverse ischemic and reperfusion damage. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 93: 127-139.
- 153.- Rousou JH, Dobbs WA, Meeran MK, Engelman RM. The temperature dependence of recovery of metabolic function following hypothermic potassium cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1982; 83: 117-121.

- 154.- Kempsford RD, Murashita T, Hearse DJ. Transient hypothermic reperfusion and postischemic recovery in isolated rat heart. *Am J Physiol* 1990; 259: H879-H888.
- 155.- Braimbridge MV. European origins of cardioplegia. En: Engelman RM, Levitsky S. *A textbook of cardioplegia for difficult clinical problems*. NY, Futura Publishing Company. 1992; 9-16.
- 156.- Kirklin JW, Conti VR, Blackstone EH. Prevention of myocardial damage during cardiac operations. *N Engl J Med* 1979. 301: 135-141.
- 157.- Catinella FP, Cunningham JN, Spencer FC. Myocardial protection during prolonged aortic cross-clamping. Comparison of blood and crystalloid cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984; 88: 411-423.
- 158.- Buckberg GD. Oxygenated cardioplegia: blood is a many splendored thing. *Ann Thorac Surg* 1990; 50: 175-177.
- 159.- Buckberg GD. Recent advances in myocardial protection using antegrade/retrograde blood cardioplegia. *Eur Heart J* 1989; 10 (suppl H): 43-48.
- 160.- Buckberg GD. *Antegrade/retrograde blood cardioplegia to ensure cardioplegic distribution: operative techniques and objectives*. *J Cardiac Surg* 1989; 4(3): 216-238.

- 161.- Menasché P, Kucharski K, Mundler O et al. Adequate preservation of right ventricular function after coronary sinus cardioplegia. A clinical study. *Circulation* 1989; 80 (suppl III): III19-III24.
- 162.- Yau TM, Weisel RD, Mickle DAG et al. Alternative techniques of cardioplegia. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II377-II384.
- 163.- Misare BD, Krukenkamp IB, Lazer ZP, Levitsky S. Retrograde is superior to antegrade continuous warm blood cardioplegia for acute cardiac ischemia. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II393-II397.
- 164.- Rousou JA, Engelman RM, Flack JE, Deaton DW. Retrograde coronary sinus cardioplegia in acute coronary syndromes. En: Engelman RM, Levitsky S. A textbook of cardioplegia for difficult clinical problems. NY, Futura Publishing Company. 1992; 143-150.
- 165.- Fabiani JNM, Carpentier AF. Comparative evaluation of retrograde cardioplegia through the coronary sinus and the right atrium. *Circulation* 1983; 68 (supl III): III-251.
- 166.- Allen BS, Okamoto F, Buckberg GD et al. Studies of controlled reperfusion after ischemia. XV. Immediate functional recovery after six hours of regional ischemia by careful control of conditions of reperfusion and composition of reperfusate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92: 621-635.

- 167.- Lazar HL, Haan CK, Yang X, Rivers S, Bernard S, Shemin RJ. Reduction of infarct size with coronary venous retroperfusion. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II352-II357.
- 168.- Gore JM, Weiner BH, Benotti JR, et al. Preliminary experience with synchronized coronary sinus retroperfusion in humans. *Circulation* 1986; 74: 381-388.
- 169.- Berland J, Farcot JC, Barrier A, et al. Coronary venous synchronized retroperfusion during percutaneous transluminal angioplasty of left anterior descending coronary artery. *Circulation* 1990; 81(suppl IV): IV35-IV42.
- 170.- Reimer KA, Rasmussen MM, Jennings RB. Reduction by propranolol of myocardial necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circ Res* 1973; 33: 353.
- 171.- Opie LH. Myocardial infarct size. Part 2. Comparison of anti-infarct effects of beta-blockade, glucose-insulin-potassium, nitrates, and hyaluronidase. *Am Heart J* 1980; 100: 531-552.
- 172.- Nayler WG, Ferrari R, Williams A. Protective effect of pretreatment with verapamil, nifedipine and propranolol on mitochondrial function in the ischemic and reperfused myocardium. *Am J Cardiol* 1980; 46: 242-248.

- 173.- Reimer KA, Rasmussen MM, Jennings Rb. Reduction by propranolol of myocardial necrosis following temporary coronary artery occlusion in dogs. *Circ Res* 1973; 33: 353.
- 174.- Nayler WG, Yopez C, Fassold E, Ferrari R. Prolonged protective effect of propranolol on hypoxic heart muscle. *Am J Cardiol* 1978; 42: 217-225.
- 175.- Smith HJ, Goldstein RA, Griffith JM, Kent KM, Epstein SE. Regional contractility. Selective depression of ischemic myocardium by verapamil. *Circulation* 1976; 54: 629-635.
- 176.- Beta-Blocker Heart Attack Trial Research Group. A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. I. Mortality results. *JAMA* 1982; 247: 1707-1714.
- 177.- ISIS-1 (First International Study of Infarct Survival) Collaborative Group: Randomized trial of intravenous atenolol among 16027 cases of suspected acute myocardial infarction. ISIS-1. *Lancet* 1986; 2: 57.
- 178.- The MIAMI Trial Research Group: Metoprolol in acute myocardial infarction (MIAMI). A randomized placebo controlled international trial. *Eur Heart J* 1985; 6: 199.

- 179.- The Norwegian Multicenter Study Group. Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction. *N Engl J Med* 1981; 304: 801-807.
- 180.- Rydén L, Ariniego R, Arnman K et al. A double-blind trial of metoprolol in acute myocardial infarction. Effects on ventricular tachyarrhythmias. *N Engl J Med* 1983; 308: 614-8.
- 181.- TIMI Study Group: Comparison of invasive and conservative strategies after treatment with intravenous tissue plasminogen activator in acute myocardial infarction: Results of the thrombolysis in myocardial infarction (TIMI) Phase II Trial. *N Engl J Med* 1989; 320: 618-627.
- 182.- Kanter KR, Flaherty JT, Bulkley BH, Gott VL, Gardner TJ. Beneficial effects of adding propranolol to multidose potassium cardioplegia. *Circulation* 1981; 64: 1184-1189.
- 183.- De Jong JW. Cardioplegia and calcium antagonists: a review. *Ann Thorac Surg* 1986; 42: 593-598.
- 184.- Ponce-Hornos JE, Musi EA, Bonazzola P. Role of extracellular calcium on heart muscle energetics: effects of verapamil. *Am J Physiol* 1990; 258: H64-H72.

- 185.- Yamamoto F, Manning AS, Braimbridge MV, Hearse DJ. Cardioplegia and slow calcium-channel blockers. Studies with verapamil. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1983; 86: 252-261.
- 186.- Standeven JW, Jellinek M, Menz LJ, Kolata RJ, Barner HB. Cold blood potassium diltiazem cardioplegia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1984; 87: 201-212.
- 187.- Hearse DJ, Yamamoto F, Shattock MJ. Calcium Antagonists and hypothermia: the temperature dependency of the negative inotropic and anti-ischemic properties of verapamil in the isolated rat heart. *Circulation* 1984; 70 (supl I): I54-I64.
- 188.- The first American clinical trial of nifedipine in cardioplegia. A report of the first 12 month experience. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981; 82: 848-859.
- 189.- Koolen JJ, Van Wezel HB, Visser CA et al. Nicardipine for preservation of myocardial metabolism and function in patients undergoing coronary artery surgery. *Anesthesiology* 1989; 71: 508-518.
- 190.- Weinstein GS, Rao PS, Tyras DH. Reduction of myocardial injury with verapamil before aortic cross-clamping. *Ann Thorac Surg* 1990; 49: 419-423.
- 191.- Serruys PW, Van den Brand M, Brower RW, Hugenholtz PG. Regional cardioplegia and cardioprotection during transluminal angioplasty: which role for nifedipine? *Eur Heart J* 1983; 4 (supl C): 115.

- 192.- García-Dorado D, Théroux P, Fernandez-Avilés F, Elízaga J, Solares J, Galiñanes M. Diltiazem and progression of myocardial ischemic damage during coronary artery occlusion and reperfusion in porcine hearts. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 906-911.
- 193.- Pasternak RC, Braunwald E, Sobel BE. Acute myocardial infarction. En: Braunwald E. *Heart Disease. A Textbook of Cardiovascular Medicine*. Fourth Edition. W. B. Saunders Company. 1992; 1200-1291.
- 194.- Hirota Y, Bing OHL, Abelmann WH. Effect of ethanol on contraction and relaxation of isolated rat ventricular muscle. *J Moll Cell Cardiol* 1976; 8: 727-732.
- 195.- Kalbaek H, Gjorup T, Brynjolf I, Christensen NJ, Godtfredsen J. Acute effects of alcohol on left ventricular function in healthy subjects at rest and during upright exercise. *Am J Cardiol* 1985. 55: 164-167.
- 196.- Danzinger RS, Sakai M, Capogrossi MC, Spurgeon HA, Hansford RG, Lakatta EG. Ethanol acutely and reversibly suppresses excitation-contraction coupling in cardiac myocytes. *Circ Res* 1991; 68: 1660-1668.
- 197.- Guarnieri T, Lakatta EG. Mechanism of myocardial contractile depression by clinical concentrations of ethanol. A study in ferret papillary muscles. *J Clin Invest* 1990; 85: 1462-1467.

- 198.- Wikman-Coffelt J, Wagner S, Wu S, Parmley W. Alcohol and pyruvate cardioplegia. Twenty-four-hour in situ preservation of hamster hearts. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1991; 101: 509-516.
- 199.- Alonso Pulpón L, Anguita M, Crespo M, Segovia J. Presente y futuro del trasplante cardíaco en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca crónica. Papel de la asistencia mecánica circulatoria. *Rev Esp Cardiol* 1992; 45(4): 270-283.
- 200.- Wicomb WN, Cooper DKC, Novitzky D, Barnard CN. Cardiac transplantation following storage of the donor heart by a portable hypothermic perfusion system. *Ann Thorac Surg* 1984; 37: 243-248.
- 201.- Ledingham SJM, Katayama O, Lachno DR, Yacoub M. Prolonged cardiac preservation. Evaluation of the University of Wisconsin preservation solution by comparison with the St Thomas' Hospital cardioplegic solutions in the rat. *Circulation* 1990; 82 (supl IV): IV351-IV358.
- 202.- Ko W, Zelano JA, Lazenby WD, Isom OW, Krieger KH. Compositional analysis of a modified University of Wisconsin solution for extended myocardial preservation. A study of the left ventricular pressure-volume relation. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II326-II332.
- 203.- Hardesty RL, Griffith BP, Deeb GM, Bahnson HT, Starzl TE. Improved cardiac function using cardioplegia during procurement and transplantation. *Transplant Proc* 1983; XV: 1253-1255.

- 204.- Nutt MP, Fields BL, Sebree LA et al. Assessment of function, perfusion, metabolism, and histology in hearts preserved with University of Wisconsin solution. *Circulation* 1992; 86 (suppl II): II333-II338.
- 205.- Stringham JC, Paulsen KL, Southard JH, Fields BL, Belzer FO. Improved myocardial ischemic tolerance by contractile inhibition with 2,3-butanedione monoxime. *Ann Thorac Surg* 1992; 54: 852-860.
- 206.- Froede HC, Wilson IB. Acetylcholinesterase. En: Boyer PD. *The enzymes*. NY, Academic Press. 1971; vol 5: 87-114.
- 207.- Green AL, Saville B. The reaction of oxime with isopropyl methyl-phosphonofluoridate. *J Chem Soc* 1956; 756: 3887-3892.
- 208.- Cojocaru Z, Serban F, Nastasa V, Ungureanu M, Lazar MI. Synthesis of diacetylmonoxime, a new reagent for urea determination in biological fluids. *Revista Medico-chirurgicalá* 1985; 89: 661-662.
- 209.- Li T, Sperelakis N, Teneik RE, Solaro RJ. Effects of diacetyl monoxime on cardiac excitation-contraction coupling. *J Pharmacol Exp Ther* 1984; 232: 688-695.

- 210.- Blanchard EM, Mulieri LA, Alpert NR. The effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on the relation between initial heat and mechanical output of rabbit papillary muscle (abstract). *Biophys J* 1984; 45: 48A.
- 211.- Bergey JL, Reiser J, Wiggins JR, Freeman AR. Oximes: "enzymatic" slow channel antagonists in canine cardiac Purkinje fibers? *Eur J Pharmacol* 1981; 71: 307-319.
- 212.- Wiggins JR, Reiser J, Fitzpatrick DF, Bergey JL. Inotropic actions of diacetyl monoxime in cat ventricular muscle. *J Pharmacol Exp Ther* 1980; 212: 217-224.
- 213.- Mulieri LA, Alpert NB. Differential effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on activation and contraction (abstract). *Biophys J* 1984; 45: 47A.
- 214.- Fryer MW, Neering IR, Stephenson DG. Effects of 2,3-butanedione monoxime on the contractile activation properties of fast- and slow-twitch rat muscle fibres. *J Physiol* 1988; 407: 53-75.
- 215.- Hui ChS, Maylie J. Effects of BDM on contractile and membrane electrical properties in frog twitch fibers. *Biophys J* 1988; 53: 646a.
- 216.- Lang RJ, Paul RJ. Effects of 2,3-butanedione monoxime on whole-cell Ca^{++} channel currents in single cells of the Guinea-pig Taenia Caeci. *J Physiol* 1991; 433: 1-24.

- 217.- Packer CS, Kagan ML, Kagan JF, Robertson SA, Stephens NL. The effect of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on smooth muscle mechanical properties. *Pflügers Arch* 1988; 412: 659-664.
- 218.- Silverman HS, Ninomiya M, Blank PS, Hano O, Miyata H, Spurgeon HA, Lakatta EG, Stern MD. A cellular mechanism for impaired posthypoxic relaxation in isolated cardiac myocytes. Altered myofilament relaxation kinetics at reoxygenation. *Circ Res* 1991; 69: 196-208.
- 219.- Cheung JY, Tillotson DL, Yelamarty RV, Scaduto RC. Cytosolic free calcium concentration in individual cardiac myocytes in primary culture. *Am J Physiol* 1989; 256: C1120-1130.
- 220.- Daly MJ, Ou R, Gu XH, Casley DJ, Nayler W. The effects of Ca^{++} -free perfusion and the calcium paradox on [^{125}I] endothelin-1 binding to rat cardiac membranes. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 1433-1441.
- 221.- Armstrong SC, Ganote ChE. Effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) on contracture and injury of isolated rat myocytes following metabolic inhibition and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1001-1014.
- 222.- Nichols CG, Lederer WJ. The role of ATP in energy deprivation contractures in unloaded rat ventricular myocytes. *Can J Physiol Pharmacol* 1990; 68: 183-194.

- 223.- Gwathmey JK, Hajjar RJ, Solaro RJ. Contractile deactivation and uncoupling of crossbridges. Effects of 2,3-butanedione monoxime on mammalian myocardium. *Circ Res* 1991; 69: 1280-1292.
- 224.- Chapman RA. The effect of oximes on the dihydropyridine-sensitive Ca current of isolated guinea-pig ventricular myocytes. *Pflügers Arch* 1993; 422: 325-331.
- 225.- Blanchard EM, Alpert NR, Allen DG, Smith GL. The effect of 2,3-butanedione monoxime on the initial heat-tension-time integral relation and aequorin light output from ferret papillary muscles. *Biophys J* 1988; 53: 605a.
- 226.- Marijic J, Buljubasic N, Stowe DF, Turner LA, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Opposing effects of diacetyl monoxime on contractility and calcium transients in isolated myocardium. *Am J Physiol* 1991; 260: H1153-H1159.
- 227.- Mörner SE, Wohlfart B. The action of 2,3-butanedione monoxime on the inotropic state in guinea-pig myocardium. *Acta Physiol Scand* 1991; 142: 211-219.
- 228.- Alpert NR, Blanchard EM, Mulieri LA. Tension-independent heat in rabbit papillary muscle. *J Physiol* 1989; 414: 433-453.
- 229.- West JM, Stephenson DG. Contractile activation and the effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) in skinned cardiac preparations from normal and dystrophic mice. *Pflügers Arch* 1989; 413: 546-552.

- 230.- Schlüter KD, Schwartz P, Siegmund B, Piper HM. Prevention of the oxygen paradox in the hypoxic-reoxygenated hearts. *Am J Physiol* 1991; 261: H416-H423.
- 231.- Stringham JC, Paulsen KL, Southard JH, Fields BL, Belzer FO. Improved myocardial preservation by modification of the University of Wisconsin solution with 2,3-butanedione monoxime and calcium. *Transplant Proc* 1993; 25 (1): 1625-1626.
- 232.- Hebisch S, Bischoff E, Soboll S. Influence of 2,3-butanedione monoxime on heart energy metabolism. *Basic Res Cardiol* 1993; 88(6): 566-575.
- 233.- Boban M, Stowe DF, Kampine JP, Goldberg AH, Bosnjak ZJ. Effects of 2,3-butanedione monoxime in isolated hearts: protection during reperfusion after global ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 105: 532-540.
- 234.- De Tombe PP, Burkhoff D, Hunter WC. Comparison between the effects of 2,3-butanedione monoxime (BDM) and calcium chloride on myocardial oxygen consumption. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 783-797.
- 235.- Mulieri LA, Hasenfuss G, Ittleman F, Blanchard EM, Alpert NR. Protection of human left ventricular myocardium from cutting injury with 2,3 butanedione monoxime. *Circ Res* 1989; 65: 1441-1444.

- 236.- Schwinger RHG, Böhm M, Koch A, Morano I, Rüegg JC, Erdmann E. Inotropic effect of the cardioprotective agent 2,3-butanedione monoxime in failing and nonfailing human myocardium. *J Pharmacol Exp Ther* 1994; 269(2): 778-786.
- 237.- Perreault CL, Mulieri LA, Alpert NR, Ransil BJ, Allen PD, Morgan JP. Cellular basis of negative inotropic effect of 2,3-butanedione monoxime in human myocardium. *Am J Physiol* 1992; 263: H503-H510.
- 238.- O'Brien P, Bosnjak Z, Warltier DC. Recovery of contractile function of postischemic, reperfused myocardium: influence of 2,3-butanedione-2-monoxime. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 693-700.
- 239.- Hui ChS, Maylie J. Multiple actions of 2,3-butanedione monoxime on contractile activation in frog twitch fibres. *J Physiol* 1991; 442: 527-549.
- 240.- Fryer MW, Gage PW, Neering IR, Dulhunty AF, Lamb GD. Paralysis of skeletal muscle by butanedione monoxime, a chemical phosphatase. *Pflügers Arch* 1988; 411: 76-79.

- 241.- Horiuti K, Higuchi H, Umazume Y, Konishi M, Okazaki O, Kunihara S. Mechanism of action of 2,3-butanedione 2-monoxime on contraction of frog skeletal muscle fibres. *J Muscle Res Cell Motil* 1988; 9: 156-164.
- 242.- Stephens NL, Kagan ML, Packer CS. Time dependence of shortening in tracheal smooth muscle. *Am J Physiol* 1986; 251: C435-C442.
- 243.- Sada H, Sada S, Sperelakis N. Effects of diacetyl monoxime (DAM) on slow and fast action potentials of young and old embryonic chick hearts and rabbit hearts. *Eur J Pharmacol* 1985; 112: 145-152.
- 244.- Steele DS, Smith GL. Effects of 2,3-butanedione monoxime on sarcoplasmic reticulum of saponin-treated rat cardiac muscle. *Am J Physiol* 1993; 265: H1493-H1500.
- 245.- Blanchard EM, Smith GL, Allen DG, Alpert NR. The effects of 2,3-butanedione monoxime on initial heat, tension, and aequorin light output of ferret papillary muscles. *Pflügers Arch* 1990; 416: 219-221.
- 246.- Liu Y, Cabo C, Salomonsz R, Delmar M, Davidenko J, Jalife J. Effects of diacetyl monoxime on the electrical properties of sheep and guinea pig ventricular muscle. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1991-1997.

- 247.- Coulombe A, Lefevre IA, Deroubaix E, Thuringer D, Coraboeuf E. Effect of 2,3-butanedione 2-monoxime on slow inward and transient outward currents in rat ventricular myocytes. *J Moll Cell Cardiol* 1990; 22: 921-932.
- 248.- Sanz E, García-Dorado D, Carreras MJ, Oliveras J, Carreño A, Lidón RM, Pérez-Villa F, Soler-Soler J, Théroux P. Potente efecto vasodilatador coronario de la 2,3 butanodiona monoxima. *Rev Esp Cardiol* 1991; 44 (supl 1): 109.
- 249.- Maylie J, Hui ChS. Action of 2,3-butanedione monoxime on calcium signals in frog cut twitch fibres containing Antipyrylazo III. *J Physiol* 1991; 442: 551-567.
- 250.- Highuchi H, Takemori S. Butanedione monoxime suppresses contraction and ATPase activity of rabbit skeletal muscle. *J Biochem* 1989; 105: 638-643.
- 251.- Herrmann C, Wray J, Travers F, Barman T. Effect of 2,3-butanedione monoxime on myosin and myofibrillar ATPases. An example of an uncompetitive inhibitor. *Biochemistry* 1992; 31: 12227-12232.
- 252.- Vanoverschelde JJ, Janier MF, Bergmann R. The relative importance of myocardial energy metabolism compared with ischemic contracture in the determination of ischemic injury in isolated perfused rabbit hearts. *Acta Cardiológica* 1993; 48: 141-143.

- 253.- Armstrong SC, Ganote ChE. Flow cytometric analysis of isolated adult cardiomyocytes: vinculin and tubulin fluorescence during metabolic inhibition and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1992; 24: 149-162.
- 254.- García-Dorado D, Thérroux P, Durán JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz R, Elízaga J, Botas J, Fernandez-Avilés F, Soriano J, Esteban E. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation* 1992; 85: 1160-1174.
- 255.- Mulieri LA, Hasenfuss G, Leavitt B, Allen PD, Alpert NR. Altered myocardial force-frequency relation in human heart failure. *Circulation* 1992; 85: 1743-1750.
- 256.- Lopukhin SY, Southard JH, Belzer FO. University of Wisconsin solution containing 2,3-Butanedione-monoxime extends myocardial preservation time. *Transplant Proc* 1993; 25(6): 3017-3018.
- 257.- Stringham JC, Paulsen KL, Southard JH, Mentzer RM, Belzer FO. Prolonging myocardial preservation with a modified University of Wisconsin solution containing 2,3-butanedione monoxime and calcium. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1994; 107: 764-775.

- 258.- Stowe DF, Boban M, Kampine JP, Bosnjak ZJ. Reperfusion with adenosine and nitroprusside improves preservation of isolated guinea pig hearts after 22 hours of cold perfusion with 2,3 butanedione monoxime. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 21: 578-586.
- 259.- García-Dorado D, Barrabés JA, Solares J, Ruiz Meana MS, González Herrejón MP, Soler Soler J. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion "in situ". Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Eur Heart J* (en prensa).