

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**



**“ESTUDIO DE LA CORRIENTE DE CALCIO
TIPO T EN LA HIPERTROFIA CARDIACA
EXPERIMENTAL”**

TESIS DOCTORAL

**M^a LUISA MARTINEZ RODRIGUEZ
MADRID, 2000**

TESIS DOCTORAL

**ESTUDIO DE LA CORRIENTE DE CALCIO TIPO T
EN LA HIPERTROFIA CARDIACA
EXPERIMENTAL**

M^a Luisa Martínez Rodríguez

DIRECTOR: Dra. C. Delgado Canencia
Científico Titular del C.S.I.C
Instituto de Farmacología y Toxicología
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina, UCM

PONENTE: Dra. Rocío Muñoz Calvo
Profesor Titular de Fisiología
Departamento de Fisiología
Facultad de Farmacia, UCM

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA**

**ESTUDIO DE LA CORRIENTE DE CALCIO TIPO T
EN LA HIPERTROFIA CARDIACA
EXPERIMENTAL**

**M^a Luisa Martínez Rodríguez
Madrid, 2000**

A mi familia

A Jesús

*“Aunque este Universo poseo,
nada poseo,
pues no puedo conocer lo desconocido
si me aferro a lo conocido”*

Robert Fisher

Deseo expresar mi más profundo agradecimiento a la Dra. Carmen Delgado Canencia, Directora de esta Tesis Doctoral, por la dedicación y consejos que me ha prodigado durante la realización del presente estudio, quien no sólo me ha iniciado en el mundo de la investigación científica, sino que además me ha ofrecido en todo momento su apoyo y comprensión.

Quiero agradecer al Prof. Dr. Pedro Lorenzo, Director del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Complutense de Madrid, por haberme brindado la oportunidad de realizar esta Tesis Doctoral en el Departamento que él dirige, y al Prof. Dr. Mariano Illera, Director del Departamento de Fisiología de la Facultad de Farmacia y Veterinaria de la misma Universidad, por haber aceptado que lea la Tesis en el Departamento de su dirección.

Debo agradecer a la Dra. Rocío Muñoz, quien ha aceptado gustosa ser Ponente de esta Tesis Doctoral, y he encontrado en ella su ayuda y consejo siempre que se los he pedido.

Agradezco a la Dra. Paz Fernández Tomé, Dra. M^a Isabel Colado, Dra. Amaya Aleixandre y Dra. Visitación López Miranda, por su apreciada ayuda, gracias a la cuál me ha sido posible realizar y aprender diferentes técnicas, utilizadas a lo largo de estos años de formación científica.

Deseo agradecer especialmente el apoyo y amistad que he recibido en los momentos difíciles de los Dres. Santos Barrigón, Angela Alsasua, Jorge de Alba, Steve Finn y a las licenciadas, Puy Heredia, Gemma Benito, Raquel Ábalo y María Fernández.

Agradezco a los Dres. Mario Delmar y Alessandro Mugelli, que me han acogido en diferentes estancias cortas en los equipos de investigación bajo su dirección en Syracuse (USA) y Florencia (Italia) respectivamente, ya no sólo por la buena acogida que me ofrecieron sino también por su inestimable amistad y ayuda.

Quiero expresar mi Gratitud a M^a Elena Vicente e Isabel Ocaña por su ayuda administrativa, a Rubén Vara, Manuel Bas, M^a Luisa Hidalgo, Fernando Ortego, Manuel Solís y Oscar Grijota por su excelente ayuda técnica y apoyo moral en todo momento.

Y a todos esas personas no pertenecientes al ámbito científico, familia y amigos, que me han apoyado en todo momento de manera incondicional y han permanecido a mi lado en los momentos en que más les necesitaba.

Agradezco al laboratorio Hoffman-La Roche por haberme proporcionado generosamente el Mibefradilo utilizado en los experimentos de esta Tesis.

Finalmente agradezco al Ministerio de Educación y Ciencia la concesión de una Beca de formación de personal investigador, que me permitió la realización de esta Tesis Doctoral.

A todos, mi más sincera gratitud

ÍNDICE

1. OBJETIVOS	1
2. INTRODUCCIÓN.....	4
2.1. HIPERTROFIA CARDIACA	5
2.1.1. Características celulares de la hipertrofia cardiaca	7
2.1.2. Señales asociadas a la aparición de hipertrofia cardiaca	15
2.1.2.1. Señales hemodinámicas.....	15
2.1.2.2. Señales no hemodinámicas	17
2.1.3. Mecanismos intracelulares asociados al estímulo.....	20
hipertrófico	
2.1.4. Implicaciones clínicas de la hipertrofia cardiaca.....	23
2.1.4.1. Disfunción diastólica.....	25
2.1.4.2. Isquemia miocárdica	25
2.1.4.3. Arritmias ventriculares	26
2.1.4.4. Insuficiencia cardiaca.....	27
2.1.5. Prevalencia de la hipertrofia. Factores de riesgo.....	27
2.1.6. Tratamiento de la hipertrofia	29
2.1.7. Modelos experimentales utilizados para inducir	33
hipertrofia cardiaca	
2.2. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA.....	36
2.2.1. Conceptos básicos de electricidad aplicados a la.....	36
biología celular	
2.2.2. Membrana celular.....	37
2.2.3. Canales	38
2.2.4. Potencial de reposo de la célula cardiaca	41
2.2.5. Potencial de acción cardiaco	42
2.2.6. Corrientes iónicas.....	45

2.2.7. Alteraciones electrofisiológicas en la hipertrofia cardiaca.....	47
2.2.7.1. Duración del potencial de acción y corrientes.....	47
de membrana	
2.2.7.2. Incidencia de las arritmias.....	50
2.2.7.2.1. Arritmias cardiacas. Concepto	50
2.2.7.2.2. Mecanismos celulares de las arritmias	54
descritas en la hipertrofia	
2.2.7.2.3. Contracción de los miocitos hipertróficos.....	55
 2.3. CANALES DE CALCIO EN EL CORAZÓN.....	56
 2.3.1. Canal de calcio tipo L.....	57
2.3.2. Canal de calcio tipo T.....	58
2.3.2.1. Estructura.....	58
2.3.2.2. Propiedades cinéticas y características	60
generales	
2.3.2.3. Efecto de los iones divalentes sobre I_{CaT}	63
2.3.3. Importancia fisiológica de la corriente de calcio tipo T.....	64
2.3.3.1. Acoplamiento excitación-contracción.....	64
2.3.3.2. Actividad rítmica	65
2.3.3.3. Crecimiento y desarrollo.....	67
2.3.4. Modulación farmacológica.....	68
2.3.4.1. Antagonistas del calcio.....	68
2.3.4.1.1. Dihidropiridinas.....	69
2.3.4.1.2. Mibefradilo.....	69
2.3.4.2. Antiarrítmicos y otros compuestos.....	78
2.3.4.3. Neurotransmisores.....	79
 3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	81
 3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA CARDIACA.....	82
 3.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MIOCITOS CARDIACOS:.....	83
Técnica de disociación	

3.3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS.....	84
3.3.1. Patch-Clamp.....	85
3.3.1.1. Configuraciones de patch-clamp.....	85
3.3.2. Equipo utilizado.....	89
3.3.3. Soluciones empleadas.....	89
3.3.3.1. Disociación de miocitos.....	89
3.3.3.2. Mantenimiento de células ya disociadas.....	90
3.3.3.3. Solución externa de registro.....	91
3.3.3.4. Solución interna.....	92
3.3.4. Protocolo experimental para el registro de las corrientes.....	94
de calcio	
3.3.4.1. Medida de la capacitancia y resistencia en serie.....	95
3.3.4.2. Medición de las corrientes.....	97
Relación corriente-voltaje	
3.3.4.3. Tiempo al pico y curso temporal de la inactivación....	98
3.3.4.4. Activación en estado estacionario.....	100
3.3.4.5. Inactivación en estado estacionario.....	100
3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	102
4. RESULTADOS.....	103
4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS.....	104
4.2. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES DE CALCIO	106
EN MIOCITOS VENTRICULARES PROCEDENTES	
DE CORAZONES NORMALES E HIPERTRÓFICOS	
4.2.1. Corrientes de calcio en miocitos ventriculares.....	106
aislados de corazones de ratas controles	
4.2.2. Corrientes de calcio en miocitos ventriculares.....	110
aislados de corazones hipertróficos	

4.3. CARACTERIZACIÓN DE I_{CaT} . COMPARACIÓN CON I_{CaL}	114
4.3.1. Cinética de la corriente I_{CaT} dependiente de voltaje.....	114
4.3.1.1. Activación en estado estacionario.....	114
4.3.1.2. Inactivación en estado estacionario.....	117
4.3.1.3. Corriente ventana.....	119
4.3.2. Tiempo al pico y curso temporal de la inactivación	121
4.3.2.1. Tiempo al pico.....	122
4.3.2.2. Curso temporal de inactivación.....	122
4.3.3. Permeabilidad del canal de calcio.....	123
4.4. BLOQUEANTES DE LA CORRIENTE I_{CaT}	125
4.4.1. Bloqueo por níquel.....	125
4.4.2. Bloqueo por mibefradilo.....	128
4.4.2.1. Efecto sobre I_{CaT}	128
4.4.2.2. Efecto sobre I_{CaL}	132
4.5. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE I_{CaT}	143
4.5.1. Nifedipino y Bay K8644.....	143
4.5.1.1. Nifedipino.....	144
4.5.1.2. BAY K8644.....	146
4.5.2. Efecto de péptidos internos neurotransmisores.....	150
4.5.2.1. Angiotensina II.....	150
4.5.2.2. Endotelina-1.....	155
4.5.3. Efecto de la estimulación adrenérgica sobre I_{CaT}	160
4.5.3.1. Efecto de la estimulación β	161
4.5.3.2. Estimulación α_1 -adrenérgica	165

5. DISCUSIÓN	170
5.1. ESTUDIO DE LAS CORRIENTES DE CALCIO.....	171
TIPO T Y L EN CONTROL Y EN LA HIPERTROFIA	
5.1.1. I_{CaT} y crecimiento.....	171
5.1.2. I_{CaT} e I_{CaL} en células cardiacas.....	175
5.1.3. I_{CaT} y arritmias	177
5.2. MODULACIÓN DE I_{CaT}	179
5.2.1. Efecto de mibefradilo sobre I_{CaT} e I_{CaL}	179
5.2.2. Nifedipino y Bay K8644.....	182
5.2.3. Endotelina-1 y Angiotensina II	184
5.3.3. Estimulación adrenérgica.....	185
6. CONCLUSIONES.....	187
7. BIBLIOGRAFÍA.....	189

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Manifestaciones cardiacas de la hipertensión arterial	6
Fig. 2. Resumen del acoplamiento entre el estímulo hipertrófico y la expresión génica	11
Fig. 3. Reducción de la reserva coronaria; posibles mecanismos	12
Fig. 4. Cambios en la tensión de la pared según progresa la hipertrofia	24
Fig. 5. Esquema de un canal iónico de membrana	38
Fig. 6. Esquema de un canal dependiente de ligando y de un canal dependiente de voltaje	40
Fig. 7. Transiciones entre los posibles estados de un canal	41
Fig. 8. Esquema de un potencial de acción cardiaco	44
Fig. 9. Comparación de dos potenciales de acción ventriculares registrados en una célula control y una célula hipertrófica de rata	48
Fig. 10. Ejemplo de una postdespolarización temprana y una postdespolarización tardía	53
Fig. 11. Estructura esquematizada de un canal de calcio y sus subunidades	59
Fig. 12. Efecto del níquel sobre la fase diastólica del potencial de acción	66
Fig. 13. Estructura química del mibefradilo	70
Fig. 14. Esquema de las configuraciones de la técnica de patch-clamp	88
Fig. 15. Ejemplo de un trazo de capacitancia celular y los parámetros para su correcto análisis	96
Fig. 16. Ejemplo de un trazo de corriente a -10 mV y los parámetros para su análisis	99
Fig. 17. Trazos representativos de las corrientes de calcio de una célula ventricular control	108
Fig. 18. Relación densidad de corriente frente al voltaje de la corriente de calcio control	109
Fig. 19. Trazos representativos de las corrientes de calcio de una célula hipertrófica	112
Fig. 20. Relación densidad corriente-voltaje de las corrientes de calcio en la hipertrofia	113

Fig. 21. Activaciones en estado estacionario de las corrientes de calcio en control e hipertrofia	116
Fig. 22. Dependencia de voltaje de la inactivación en estado estacionario de las corrientes de calcio en control e hipertrofia	118
Fig. 23. Corrientes ventana en control e hipertrofia	120
Fig. 24. Densidad de corriente obtenida para I_{CaT} e I_{CaL} utilizando 5 mM de calcio como ion transportador o bario	124
Fig. 25. Efecto del níquel sobre I_{CaT} e I_{CaL}	127
Fig. 26. Trazos representativos de la corriente de calcio tipo T a -40 mV en presencia y ausencia de mibefradilo	129
Fig. 27. Relación densidad de corriente-voltaje en presencia y ausencia de mibefradilo	131
Fig. 28. Comparación del efecto de mibefradilo a los PFs de -90 mV y -50 mV sobre la I_{CaL}	133
Fig. 29. Inactivación en estado estacionario con mibefradilo	135
Fig. 30. Reactivación de la I_{CaL} en función del tiempo	137
Fig. 31. Efecto tónico y de frecuencia dependencia del mibefradilo sobre I_{CaL} en una célula hipertrófica	140
Fig. 32. Resumen del efecto tónico y frecuencia dependencia del mibefradilo	140
Fig. 33. Constantes de tiempo de la inactivación con mibefradilo	142
Fig. 34. Efecto de nifedipino sobre la corriente I_{CaT}	145
Fig. 35. Efecto del BAY K8644 sobre la corriente I_{CaT}	148
Fig. 36. Curva de inactivación en estado estacionario de la I_{CaT} en control y con BAY K8644	149
Fig. 37. Efecto de la Ang II sobre la corriente I_{CaT}	152
Fig. 38. Inactivación en estado estacionario de I_{CaT} en control y con Ang II	153
Fig. 39. Efecto de ET-1 sobre la corriente I_{CaT}	157
Fig. 40. Efecto de ET-1 sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT}	159
Fig. 41. Efecto del isoproterenol sobre I_{CaT}	163
Fig. 42. Efecto del isoproterenol sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT}	164
Fig. 43. Efecto de fenilefrina sobre I_{CaT}	167
Fig. 44. Efecto de fenilefrina sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT}	168

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Relación entre los cambios hemodinámicos y celulares durante el desarrollo de hipertrofia cardiaca	14
Tabla 2. Agentes antihipertensivos eficaces revirtiendo la hipertrofia ventricular izquierda	31
Tabla 3. Diferentes modelos experimentales utilizados en la inducción de la hipertrofia cardiaca	35
Tabla 4. Comparación de las propiedades iónicas de los canales T y L	63
Tabla 5. Composición de la solución de disociación	90
Tabla 6. Composición de la solución de mantenimiento de las células	91
Tabla 7. Composición de la solución de registro	92
Tabla 8. Composición de la solución interna	93
Tabla 9. Características de los animales controles e hipertróficos	105
Tabla 10. Parámetros de la activación en estado estacionario en control e hipertrofia	115
Tabla 11. Parámetros de la inactivación en estado estacionario en control e hipertrofia	118
Tabla 12. Parámetros del curso temporal de la activación e inactivación	122
Tabla 13. Parámetros de la inactivación en hipertrofia en ausencia y presencia de mibefradilo	135
Tabla 14. Parámetros del curso temporal de la inactivación de I_{CaT} en presencia y ausencia de BAY K8644	149
Tabla 15. Parámetros del curso temporal de la inactivación a -40 mV en ausencia y presencia de Ang II	154
Tabla 16. Parámetros del curso temporal de la inactivación de I_{CaT} en control y en presencia de ET-1	158
Tabla 17. Parámetros del curso temporal de la inactivación de I_{CaT} en presencia y ausencia de isoproterenol	164
Tabla 18. Efecto de fenilefrina sobre el curso temporal de la inactivación de I_{CaT}	169

ABREVIATURAS UTILIZADAS

A: Adrenalina

ACh: Acetil-Colina

ADN: Acido desoxiribonucleico

AMPc: Adenosin monofosfato cíclico

Ang II: Angiotensina II

ARNm: Acido ribonucleico mensajero

ATP: Adenosina trifosfato

C_m: Capacitancia

CsA: Ciclosporina A

DAD: Postdespolarización tardía

DAG: Diacil glicerol

DMSO: Dimetil sulfóxido

EAD: postdespolarización temprana

ECA: Enzima de conversión de angiotensina

EEM: Error estándar de la media

ET-1: Endotelina 1

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50

I_{CaL}: Corriente de calcio tipo L

I_{CaT}: Corriente de calcio tipo T

IECA: Inhibidores del enzima de conversión de angiotensina

IP₃: Inositol trifosfato

K: Pendiente

LDH: Lactato deshidrogenasa

MHC: Cadena pesada de miosina

Mtx: Metoxamina

NA: Noradrenalina

PF: Potencial de fijación

PKA: Proteína kinasa A

PKC: Proteína kinasa C

T_p: Tiempo al pico

TTX: tetrodotoxina

V₅₀: Potencial al cuál se produce el 50% de inactivación ó activación

1. OBJETIVOS

La hipertrofia ventricular izquierda es una respuesta adaptativa del corazón a una sobrepresión crónica que aunque en un principio permite mantener la función cardiaca, a largo plazo se asocia a un aumento de mortalidad (Levy y cols., 1987; Kannel y Cobb, 1992).

Es un hecho probado que el corazón hipertrófico muestra diversas alteraciones tales como fibrosis, dispersión de la refractoriedad y cambios en las propiedades electrofisiológicas que hacen al mismo, más susceptible a las arritmias. Sin embargo, los mecanismos celulares implicados en el proceso de la hipertrofia no son bien conocidos. Desde un punto de vista electrofisiológico, uno de los cambios más característicos asociados a la presencia de hipertrofia es una prolongación significativa en la duración del potencial de acción (Kleiman y Houser, 1988, Gomez y cols., 1997). Dicha prolongación, podría deberse a un aumento en las corrientes netas de entrada y/o a una disminución en las corrientes de salida. En el momento actual, se acepta que una reducción en la densidad de la corriente transitoria de potasio (Ito) (Benitah y cols., 1993; Cerbai y cols., 1994) participa en el mecanismo asociado a la prolongación de la duración del potencial de acción en el ventrículo hipertrófico, sin embargo, otros mecanismos también podrían intervenir (Hart, 1994).

Por otro lado, e independientemente de los cambios electrofisiológicos, también se ha demostrado que el desarrollo de la hipertrofia cardiaca se caracteriza por una vuelta a patrones embrionarios, mediante una reexpresión de genes fetales y protooncogenes en el miocito adulto (Marban y Koretsune, 1990). En este sentido, enlazamos con la hipótesis de trabajo que nos planteamos al inicio de la presente Tesis Doctoral, ¿Podría el ventrículo hipertrófico expresar algún canal iónico que solo estuviera presente en tejido embrionario?, y si este fuera el caso, ¿Podría este canal estar involucrado en la mayor incidencia de arritmias asociadas al corazón hipertrófico?. El candidato que surgía inmediatamente era el canal de calcio tipo T, puesto que es un canal que se asocia a los procesos de crecimiento y cuya densidad disminuye progresivamente con el desarrollo postnatal (Xu y Best, 1992). De hecho, la presencia del canal de calcio tipo T en el ventrículo sano del animal adulto es insignificante en casi todas las especies de mamíferos. Por el contrario, los canales de calcio tipo T si están presentes en el tejido especializado de conducción cardíaca ya que participan en

los mecanismos iónicos asociados a la función marcapasos (Bean, 1985; Hagiwara y cols., 1988; Doerr y cols., 1989; Pelzer y cols., 1992).

Por todo lo expuesto anteriormente y siguiendo la trayectoria investigadora del grupo al que pertenezco, en el ámbito del estudio de los mecanismos iónicos asociados al desarrollo y mantenimiento de la hipertrofia cardiaca, el objetivo de esta Tesis Doctoral fue analizar la existencia de la corriente de calcio tipo T en miocitos ventriculares aislados de corazones de rata normales e hipertróficos, profundizando en las características cinéticas y de voltaje-dependencia de dicha corriente en el ventrículo hipertrófico así como a la respuesta del mismo ante distintos agentes farmacológicos.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. HIPERTROFIA CARDIACA

La hipertrofia cardiaca es un hallazgo clínico bastante común en varios tipos de enfermedades cardiovasculares como son la hipertensión (Dunn y Pringle; 1987; Devereux y Roman; 1999), el infarto de miocardio y la insuficiencia cardiaca (Levy y cols., 1990; Devereux y Romani, 1993). Varios estudios han demostrado que la hipertrofia ventricular izquierda, incluso en ausencia de hipertensión arterial, es un factor de riesgo importante para predecir la posible presencia de enfermedades cardiacas más severas (Levy y cols., 1990; Koren y cols., 1991; Pfeffer y cols., 1992; Messerli, 1999).

La hipertrofia cardiaca se presenta como un aumento de la masa ventricular izquierda, que normalmente se desarrolla tras un aumento en la carga hemodinámica (tanto de presión como de volumen) que impone al corazón unas mayores exigencias de trabajo (Morgan y cols., 1987; Vogt y cols., 1993). Pero no sólo una sobrecarga hemodinámica es causa de desarrollo de una hipertrofia cardiaca, hay numerosos factores no hemodinámicos como son, catecolaminas (Zierhut y Zimmer, 1989; Clark y cols., 1993; Colucci, 1998), hormonas tiroideas (Brooks y cols., 1985) y angiotensina II (Schunkert y cols., 1990; Yamazaki y Yazaki, 1999) que también estimulan el desarrollo de la hipertrofia cardiaca. Las respuestas mediadas a través de estas señales se realizan mediante la expresión de genes tempranos embrionarios (Komuro y cols., 1988; Komuro y cols., 1991; Force y cols., 1999; McKinsey y Olson, 1999).

La hipertrofia representa una importante respuesta compensatoria que permite al corazón mantener la función cardiaca. Así tras un infarto de miocardio los miocitos sanos asumen el trabajo de los miocitos que se han perdido, por un periodo de isquemia o por muerte celular. Estos miocitos sanos se hipertrofian, lo cual hace que aumenten en tamaño pero no en número (hiperplasia), añadiendo nuevos sarcómeros y mitocondrias a su estructura para mantener la contracción y la producción de energía respectivamente. Inicialmente estos mecanismos compensatorios mejoran la función cardiaca pero sólo durante un periodo de tiempo limitado. Con el tiempo comienza a haber una desintegración de las miofibrillas, una depleción de la reserva energética (ATP), fibrosis intersticial y alteración de la expresión génica (Leger y cols., 1990; Perennec y cols.,

1990). En esta situación, la red capilar no llega a todas las zonas del miocardio, se desarrolla una isquemia subendocárdica y el corazón empieza a fallar (Katz, 1991); arritmias ventriculares y fibrilación auricular se hacen mas frecuentes, la contractilidad disminuye y se puede llegar a insuficiencia cardíaca y dilatación ventricular. Todo ello inicia y mantiene un “círculo cerrado” de activación neuroendocrina que desemboca finalmente en infarto y muerte súbita (Maish, 1996). Luego lo que en un principio comienza como un proceso de adaptación beneficioso, a largo plazo puede acarrear consecuencias muy perjudiciales (Kannel, 1999).

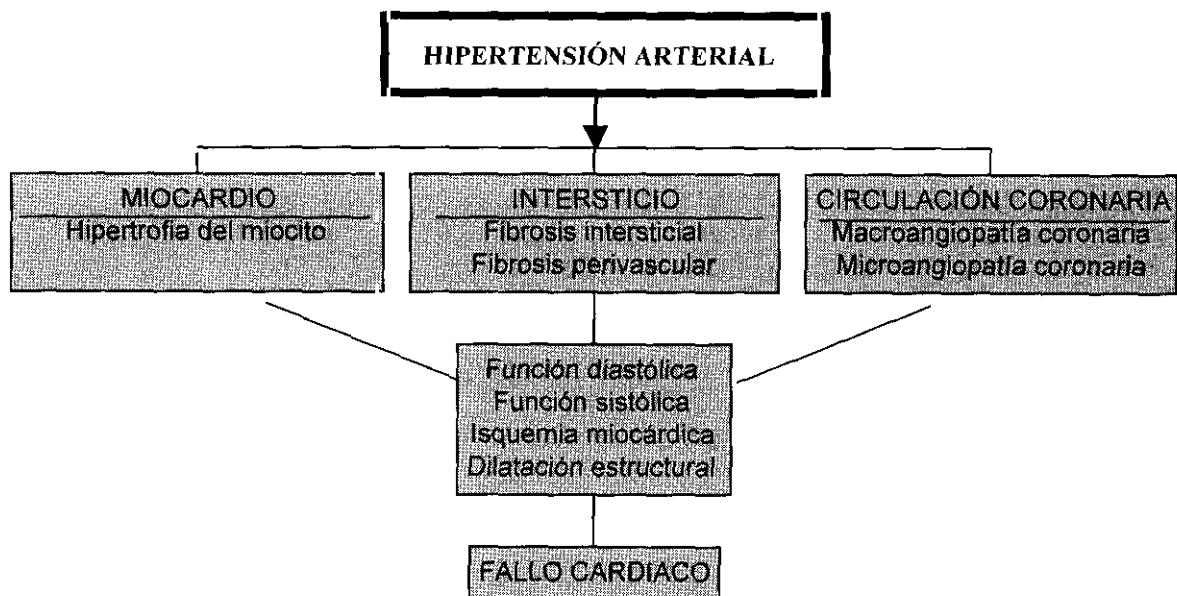


Figura 1. Manifestaciones cardíacas de la hipertensión arterial. La hipertrofia ventricular izquierda se caracteriza por una activación del miocto y de los compartimentos intersticial y vascular. Modificado de Vogt y Strauer, (1995).

2.1.1. CARACTERÍSTICAS CELULARES DE LA HIPERTROFIA CARDIACA

El miocardio está compuesto por miocitos y no miocitos; los fibroblastos son una de las células no miocíticas más abundantes. Cuando se desarrolla la hipertrofia cardiaca ambos tipos celulares sufren alteraciones. Los miocitos ya diferenciados sufren cambios en su arquitectura celular, en la reserva energética y en la utilización de la misma. También se producen cambios en la síntesis de diferentes isoformas de las proteínas contráctiles, así como la reexpresión de isoformas de proteínas contráctiles embrionarias. Los fibroblastos sufren división celular aumentando su número (ellos sí pueden sufrir hiperplasia). También se aumenta la producción de colágeno. El crecimiento hipertrófico de los miocitos junto con la proliferación fibroblástica causan profundos cambios en la función sistólica y diastólica (Opie, 1991; Weber y Brilla, 1991).

El punto de vista predominante es que los miocitos cardíacos son células de diferenciación terminal, es decir, no pueden aumentar en número ni dividirse una vez alcanzado el desarrollo, aunque esto es aún materia de polémica (ver revisiones: Aversa y cols., 1998; Soonpaa y Field, 1998). Durante la hipertrofia, la superficie y el volumen celular aumentan mientras que el cociente superficie/volumen se mantiene constante (Mayoux y cols., 1990; Opie, 1991; Perennec y Hatt, 1990). Los túbulos T y el retículo sarcoplásmico mantienen su forma normal pero se alargan con la hipertrofia. También se produce una disminución en la bomba Ca-ATPasa (Kuo y cols., 1987) y Na-K-ATPasa (Charlemagne y cols., 1987) del sarcolema, debido a que se produce un aumento de la superficie celular sin un aumento concomitante del número de bombas. Todo ello va acompañado de numerosos cambios que ocurren en la mitocondria y en las proteínas contráctiles.

En el miocardio sano los sistemas enzimáticos mitocondriales generan la mayor parte del ATP necesario para la función cardiaca. Las mitocondrias ocupan el 30% del espacio intracelular, heterogéneamente distribuidas. Tanto las mitocondrias como los sustratos utilizados por ellas, sufren cambios correlacionados con el grado de hipertrofia al que se ve sometido el corazón (Sack y Kelly, 1998). Por ejemplo, en una primera fase de hipertrofia inducida por sobrepresión, se produce un aumento del trabajo mitocondrial y un aumento del consumo de oxígeno. Inicialmente, el aumento en la demanda energética es cubierto por un mayor uso de la reserva de ácidos grasos; pero después de un periodo de adaptación a esta situación de estrés, el miocardio comienza a hipertrofiarse con lo que se normaliza de nuevo consumo de oxígeno y el uso de los sustratos energéticos (Perennec y cols., 1990; Younes y cols., 1990). Anormalidades en la energía de metabolismo, tales como la distribución de ATP, fosfocreatina y el cociente ATP/fosfocreatina, han sido encontradas en corazones hipertróficos. Estas alteraciones también parecen ser proporcionales al grado de hipertrofia desarrollado (Zhu y cols., 1996).

La mitocondria del miocardio hipertrófico tiene una mayor superficie de membrana interna, pero una menor densidad de crestas, lo que le hace muy similar a las características de las mitocondrias del miocardio en el recién nacido. Hay también una distribución diferente de las mitocondrias dentro de las capas del corazón, de tal manera que se reduce el número de mitocondrias presentes en el subendocardio lo que puede contribuir a la mayor susceptibilidad de esta región cardiaca a sufrir eventos isquémicos (Pianno, 1994).

Por otro lado, las isoenzimas de lactato deshidrogenasa (LDH) están asociados con el metabolismo aeróbico y anaeróbico. Se han observado cambios en la distribución de las isoenzimas en función de la viabilidad de oxígeno intracelular, (Everse y Kaplan, 1975). En el metabolismo aeróbico, la LDH1 actúa como la forma mayoritaria de LDH, y el corazón actúa como un consumidor de lactato, con el NADH que es rápidamente reoxidado por la fosforilación oxidativa vía mitocondrial. Durante la isquemia, el metabolismo aeróbico cambia hacia un metabolismo esencialmente anaeróbico y se ve aumentada la producción de piruvato por la glucólisis (Barger y Kelly, 1999). En este caso el corazón se vuelve productor de lactato y la LDH5 aumenta para actuar como una piruvato-reductasa. Por tanto, LDH1 disminuye de manera antiparalela con respecto al

aumento de LDH5, indicando un aumento del metabolismo anaeróbico en el miocardio hipertrófico, (Zhu y cols, 1996).

La unidad básica contráctil del miocito es el sarcómero. Éste está compuesto por cuatro proteínas contráctiles: miosina, actina, tropomiosina y troponina. Durante el desarrollo de la hipertrofia cardíaca, se produce un aumento de la velocidad de síntesis de las proteínas contráctiles, así como un cambio en la proporción de las isoformas de dichas proteínas, lo que lleva a un alargamiento del sarcómero (Opie, 1991).

En los corazones de mamíferos, incluido el humano, se han identificado dos isoformas de la miosina ventricular que han sido designadas como “la cadena pesada de miosina α (α -MHC)” y “la cadena pesada de miosina β (β -MHC)”. Aunque la función que realizan ambas isoformas es la misma, la estructura y la forma de realizar su función difieren una de otra. Tras una sobrecarga hemodinámica, se producen cambios en la expresión de los genes que codifican para ambas cadenas de miosinas, de manera que se produce una desaparición gradual de la isoforma α -MHC tanto en el ventrículo como en la aurícula, y un aumento de la isoforma β -MHC (Mercadier y cols., 1983; Buguaisky y cols., 1990; Leger y cols., 1990). Debido a que la isoforma β -MHC está asociada a una menor actividad de la ATPasa, disminuye la utilización de energía por el corazón (Schwartz y cols., 1981).

En el corazón adulto hipertrófico reaparecen isoformas de proteínas que normalmente están presentes en el feto (Schwartz y cols., 1986). Hasta la fecha varias de estas isoformas fetales han sido identificadas incluyendo la α -Actina esquelética (Schwartz y cols., 1986), la β -tropomiosina (Izumo y cols., 1988) y el factor natriurético auricular (Eghbali y cols., 1989). De acuerdo con Katz, (1991), el significado funcional de esta reexpresión no está claro pero podría estar relacionado con la cardiopatía asociada a la sobreexpresión y al deterioro del corazón.

Se producen además cambios a nivel de otros genes, que codifican para proteínas sarcoméricas, proteínas de membrana, varias proteínas encargadas del metabolismo energético y mecanismos envueltos en procesos de transducción (Klug y cols., 1993). Los cambios en la expresión génica permiten al corazón obtener una menor velocidad de contracción y mejorar su deteriorada economía (Alpert y Mulieri, 1982). En esta nueva situación el genoma simplemente utiliza otro programa, como no hay tantos programas disponibles, el programa que utiliza el corazón es el fetal.

La cascada de sucesos anteriormente citados, producen una serie de cambios iniciales que se transformarán en cambios permanentes en la expresión génica. Comienzan con una señal inicial que aumenta la expresión génica y que es monomorfa en varios tipos de adaptaciones biológicas. Engloba un proceso en escalera compuesto de los siguientes pasos: 1) Una señal actúa como disparo en respuesta al estímulo. El estiramiento del miocito es el disparo sugerido por la experiencia clínica, siendo como es la respuesta al incremento de tensión de la pared ventricular. 2) El transmisor es el mecanismo biológico que traduce la información al genoma. 3) La diana es el ADN o, de forma más precisa, la porción de gen que está situado al comienzo de la secuencia codificadora, llamada región reguladora del gen. 4) Se producen aumentos breves de la expresión genética. Varias transcripciones de oncogenes, tales como *c-fos*, *c-myc*, *c-jun* y otros ARNm que codifican para proteínas del shock de temperatura y factores de crecimiento se expresan rápida y brevemente actuando como señales de crecimiento. 5) El paso final es el cambio permanente en la expresión de los genes, lo cuál ocurre a nivel del sarcómero o de las proteínas de membrana (Chevalier y cols., 1994).

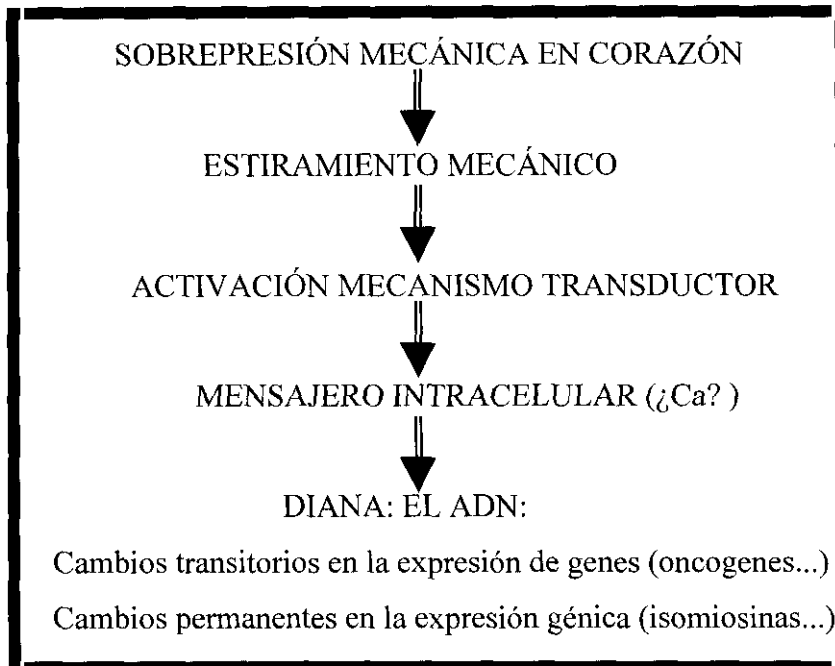


Figura 2. Resumen del acoplamiento entre el estímulo hipertrofico y la expresión génica.

Por lo que respecta a las células no miocíticas, incluyen: células endoteliales, células del músculo liso vascular, macrófagos, mastocitos y fibroblastos, todas ellas localizadas en el intersticio. Los miocitos sólo representan realmente una tercera parte de la población pero debido a su tamaño ocupan el 75% de la estructura miocárdica (Eghbali y cols., 1989; Weber y Brilla, 1991).

Los fibroblastos son capaces de dividirse y por lo tanto de sufrir un crecimiento hiperplásico, además contienen ARNm que codifica para el colágeno tipo I y tipo III. El colágeno producido por estas células conecta unos miocitos con otros y es el soporte para los capilares coronarios y los vasos. Nuevos datos han demostrado que no sólo aumenta la síntesis de colágeno intersticial durante la hipertrofia ventricular izquierda, sino que además, se produce una disminución en su degradación, porque se ve reducida la actividad enzimática tisular de las metaloproteinasas que lo degradan (Maisch, 1996).

Durante el desarrollo de la hipertrofia los fibroblastos proliferan y el colágeno se acumula en el intersticio. Esta acumulación de colágeno conlleva un cambio en las propiedades elásticas del miocardio, un aumento de la rigidez y una disminución del distendimiento ventricular (Capasso y cols., 1990; Weber y Brilla, 1991). Todo ello parece ser un factor determinante en la disfunción diastólica de la bomba cardiaca, al disminuir el grado de relajación, la distensibilidad ventricular y aumentar, por tanto, la presión diastólica final. Este proceso fibrótico comparte varias características en común con la cicatrización de una herida. La sobreexpresión de ese proceso de “cicatrización”, según su grado, deriva hacia una buena o mala readaptación, la mala adaptación lleva a la restricción de la función cardiaca. Simplificando la idea, se podría decir que la excesiva fibrosis puede virtualmente estrangular al corazón, primero en la diástole y más tardíamente en la sístole.

En cuanto a lo que se refiere a la circulación coronaria, se han propuesto varios mecanismos para explicar las anomalías que se observan en ella durante una sobrecarga de presión en la hipertensión, acompañada de una hipertrofia ventricular izquierda. Durante el desarrollo normal, hay una adecuada relación entre la masa ventricular izquierda y el área superficial funcional de la vasculatura coronaria. Tres posibilidades podrían originar una elevación de la resistencia coronaria mínima: 1) Un desarrollo inadecuado o retrasado de la circulación coronaria, disminuyendo la densidad vascular. 2) Reducción de la luz vascular de la pared de los vasos. 3) Una reducción funcional en la circulación por una compresión extrínseca o vasoconstricción (Gosse y Clementy, 1995).

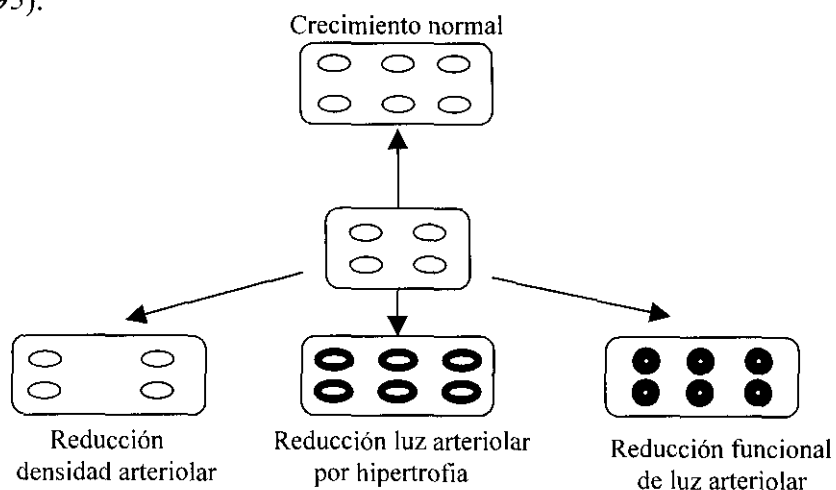


Figura 3. Reducción de la reserva coronaria: posibles mecanismos. Modificado de Gosse y Clementy, (1995).

Las fuerzas externas compresoras son mínimas en pacientes hipertensos y no hay una correlación clara entre la disminución de la reserva coronaria y el estrés de la pared miocárdica. (Vogt, y cols., 1992). La disfunción endotelial que induce de por sí la vasoconstricción es a menudo puesta de manifiesto en hipertensión, aunque parece tener un bajo impacto en el ámbito de la vasculatura coronaria.

En ratas espontáneamente hipertensas, se ha observado un desarrollo compensatorio retrasado de los pequeños vasos, con respecto de la masa cardiaca extra. Los animales jóvenes tienen una reserva coronaria disminuida y una menor densidad de capilares e incluso arteriolas, pero estas anormalidades tienden a desaparecer con la edad. En pacientes hipertensos, no parece existir una relación clara entre el grado de hipertrofia y la disminución en densidad de la circulación coronaria.

Por tanto, la principal causa de anormalidades en la circulación coronaria en la hipertensión parece ser una alteración estructural de la pared arterial (Kaski y cols., 1993). La reducción de la luz vascular radica en dos procesos principalmente: 1) Una hipertrofia concéntrica de la reorganización vascular en la ausencia de crecimiento lo cual produce una disminución del diámetro interno. 2) La reorganización o remodelaje de los vasos, adaptándose a la nueva situación, aunque ésta varía mucho en las distintas especies animales y dependiendo del tipo de hipertensión arterial (Heagerty y cols., 1992; Garot y cols., 1999).

En la siguiente tabla se resumen los cambios estructurales y celulares que se producen en el corazón hipertrofico y sus correspondientes cambios hemodinámicos.

Tabla 1. Relación entre los cambios celulares y hemodinámicos durante el desarrollo de la hipertrofia cardiaca.

FASE	CAMBIOS CELULARES Y ESTRUCTURALES	CAMBIOS HEMODINÁMICOS	SIGNIFICADO CLÍNICO
I	Desarrollo de hipertrofia No cambio en el espesor de la pared Pequeño aumento de fibroblastos y colágeno fibrilar	Pequeño aumento de la tensión Pequeño aumento de la presión sistólica y diastólica	Paciente sin sintomatología
II	Hipertrofia compensada Aumento del tamaño del corazón Aumento del tamaño del miocito Aumento del número de fibroblastos y síntesis de colágeno	Tensión normalizada Disminución de la velocidad de acortamiento Disminución del grado de relajación Disminución de la reserva arterial coronaria	Episodios transitorios de dolor en el pecho y fatiga con el ejercicio. Arritmias
III	Hipertrofia descompensada, fallo cardiaco Aumento de la masa ventricular con excesiva dilatación Crecimiento desproporcionado de fibroblastos y colágeno en el intersticio (Fibrosis avanzada) Areas focales de isquemia y necrosis celular	Disminución de fracción de eyección Relajación perjudicial Disminución de la reserva coronaria Aumento importante de las presiones sistólicas y diastólicas	Síntomas de insuficiencia cardiaca, disminución de la perfusión tisular y cambios en la función hepática y renal

2.1.2. SEÑALES ASOCIADAS A LA APARICIÓN DE HIPERTROFIA CARDIACA

Numerosas señales han sido identificadas en la iniciación y/o el mantenimiento de la hipertrofia cardiaca. Dependiendo de la naturaleza de la señal estas se pueden clasificar en señales hemodinámicas y señales no hemodinámicas. Un aumento del volumen y de la presión, son señales hemodinámicas que estimulan el crecimiento hipertrófico. Las catecolaminas, (agonistas α - y β - adrenérgicos), hormonas tiroideas, angiotensina II y algunos factores de crecimiento son señales no hemodinámicas (Morgan y Baker, 1992).

Es importante subrayar a este nivel que enfermedades cardiovasculares tales como la hipertensión presentan frecuentemente señales mixtas. Por ejemplo, pacientes con hipertensión sistémica tienen un aumento de la postcarga así como un aumento de los niveles de catecolaminas circulantes (Pianno, 1994).

2.1.2.1. Señales hemodinámicas

Presión

Con cada latido, el corazón se distiende en relación directa con el volumen de sangre que fluye en su interior al final de la diástole, e inmediatamente después se bombea esa sangre contra la presión ejercida por las arterias; es lo que se denomina postcarga. Bajo condiciones normales esa presión es importante para mantener la masa del corazón, pero al mismo tiempo esa presión puede ser también una señal hemodinámica envuelta en el desarrollo de la hipertrofia (Cooper, 1987; Morgan y cols., 1987). Un aumento sostenido en la presión de postcarga puede provocar una hipertrofia ventricular izquierda de tipo concéntrico. De todas formas cambios sostenidos en la presión de postcarga también inducen cambios en señales no hemodinámicas, como un aumento de la actividad simpática neural y la activación del sistema renina angiotensina (Morgan y cols., 1987).

En modelos experimentales en los que únicamente se estudian los efectos de la presión arterial, tanto el aumento de la actividad neural simpática como la activación del sistema renina-angiotensina, pueden ser controlados utilizando músculo cardiaco denervado o usando bloqueantes farmacológicos específicos de cada sistema. Con esas condiciones experimentales se ha visto que una sobrepresión sostenida produce un aumento en los niveles totales de ARNm y síntesis de proteínas, por lo que por sí misma puede estimular el crecimiento cardiaco (Peterson y Lesch, 1972; Cooper y Tomanek, 1982; Cooper y cols., 1985). No es bien conocida, la relación existente entre cambios en la presión y la hipertrofia cardiaca pero parece ser que la deformación de las células ante la sobrepresión es uno de los factores determinantes.

Volumen

Las adaptaciones funcionales cardiacas serán tanto mejores cuanto más íntegro se encuentre el metabolismo cardiaco y la circulación coronaria. Cuando el estímulo permanente es una sobrecarga de volumen o diastólica, (Insuficiencia valvular, fístulas, etc...) se produce un mayor estiramiento y contracción de las fibras. Esto ocasionará una hipertrofia excéntrica o "dilatación", por cambios de la longitud en serie y elongación del miocardio, sin o con poco aumento de grosor, con un claro aumento del volumen externo y de la propia cavidad ventricular (López-Merino y cols., 1992).

Uno de los factores importantes en el desarrollo de la hipertrofia cardiaca generada por un aumento de volumen es la anemia. En algunos pacientes, la anemia produce un aumento de la masa ventricular izquierda mientras que en otros también produce una dilatación del volumen diastólico final del ventrículo izquierdo. Estos cambios aumentan el riesgo de arritmias, infarto de miocardio y fibrosis miocárdica (Mann JF, 1999). No sólo eso, en presencia de una isquemia cardiaca, la anemia empeora aún más la reserva cardiaca de oxígeno. Cuanto menor es al nivel de hemoglobina, más probable es el desarrollo de hipertrofia e infarto, una hemoglobina de 11 g/dl está asociada a un aumento de la morbilidad y la mortalidad. Una corrección parcial de la anemia con Epopoyetina recombinante ha mostrado una mejora de la reserva cardiaca de oxígeno y una reversión parcial de los cambios patológicos en la geometría ventricular. De todos modos, aunque una corrección parcial de la anemia

normalmente disminuye el volumen ventricular izquierdo, los efectos sobre el grosor de la pared no son significativos (Eckerdt, 1999).

2.1.2.2. Señales no hemodinámicas

Hipertrofia mediada a través de la estimulación α - y β - adrenérgica

Varios estudios han ido encaminados a establecer la relación entre las catecolaminas, noradrenalina (NA) y adrenalina (A), y el crecimiento cardiaco. La NA se libera desde las terminaciones presinápticas simpáticas, mientras que la A se libera desde la médula adrenal (Opie, 1991). La NA también se libera desde la médula adrenal pero en mucho menor grado en comparación con la A. La primera evidencia que relacionaba las catecolaminas con el desarrollo de la hipertrofia cardiaca derivó de estudios clínicos, en los cuales se observó una regresión de la hipertrofia cardiaca en pacientes tratados con fármacos antihipertensivos que reducían la actividad simpática (Corea y cols. 1981; Strauer y cols., 1985).

Zierhut y Zimmer, (1989), y King y cols., (1987), demostraron en estudios experimentales que la infusión de NA producía aumentos significativos de la masa cardiaca que eran independientes de los cambios en la presión sanguínea, presiones intracardiacas y trabajo cardiaco. Para ver mas claramente el efecto de la NA en el crecimiento del corazón Zierhut y Zimmer vieron que si concomitantemente con las infusiones de NA se añadía un bloqueante α -adrenérgico (prazosin) o un bloqueante no selectivo β (metoprolol), se bloqueaba el desarrollo de la hipertrofia inducida por NA. Utilizando cultivos de miocitos cardiacos neonatales, Simpson, (1985), demostró que fármacos agonistas α_1 inducían una hipertrofia en los miocitos en cultivo. Posteriormente, y apoyando estos datos Clark y cols., (1993), caracterizaron el efecto de fenilefrina, agonista α_1 , e isoproterenol, agonista β , en el crecimiento hipertrófico, demostrando un efecto directo estimulante del crecimiento miocítico por parte de ambos fármacos (Schluter y Piper, 1999).

Se han visto algunas diferencias en cuanto a los efectos producidos por ambos agonistas al desarrollar la hipertrofia. Por ejemplo, la estimulación β -adrenérgica induce el automatismo y una reorganización de las miofibrillas, mientras que la estimulación α_1 no induce el automatismo, las células permanecen quiescentes, y no sufren ninguna reorganización significativa de las miofibrillas. Además, tanto la estimulación α como β producen cambios similares pero cuantitativamente diferentes en cuanto al tamaño celular, la velocidad de síntesis de proteínas, el contenido proteico y la producción del factor natriurético auricular en el ventrículo, factor indicador de la expresión génica en células en cultivo (Clark y cols., 1993).

Hipertrofia mediada por la hormona tiroidea

Tanto el hipertiroidismo como una elevación de los niveles de hormona tiroidea en el plasma, producen varios efectos en el miocardio y en la vasculatura sanguínea (Timssit y cols., 1990). Algunos de los cambios producidos en el ámbito circulatorio incluyen un aumento en el ritmo cardiaco, una disminución de la resistencia arterial y *un aumento del consumo de oxígeno periférico y miocárdico. Independientemente de los efectos circulatorios, la hormona tiroidea produce hipertrofia cardiaca, pero sin producir grandes cambios histológicos. La hipertrofia inducida por la hormona tiroidea es reversible. Los efectos de la hormona tiroidea en el miocardio incluyen un aumento en el número y afinidad de los receptores β -adrenérgicos, un aumento de la respuesta inotrópica positiva y cronotrópica a las catecolaminas, y una expresión alterada de las isoformas de miosina (Limas y Limas, 1987; Lortet y cols., 1989).*

Hipertrofia mediada a través de Angiotensina II

La angiotensina II es un potente vasoconstrictor arterial que ocasiona cambios muy marcados en el flujo sanguíneo de varios lechos vasculares (Dzau y Pratt, 1991). La angiotensina II induce tanto hipertrofia cardiaca (Aceto y Baker, 1990; Wollert y Drexler, 1999), como proliferación de los fibroblastos (fibrosis intersticial), por aumento de la síntesis de proteínas (Jalil y cols., 1991; Weber y cols., 1991).

La angiotensina II puede originar tanto directa, mediante unión a los receptores de angiotensina AT₁ cardiacos, como indirectamente, mediante una elevación de la presión arterial, una hipertrofia ventricular izquierda (Pianno, 1994; Frohlich, 2000).

Los inhibidores del enzima de conversión de angiotensina (IECA), son fármacos que inhiben la enzima dipeptidil carboxipeptidasa, enzima encargada de transformar la angiotensina I en angiotensina II, la forma activa (Dzau y Pratt, 1991). Debido a que la angiotensina II puede mediar el desarrollo de hipertrofia, cabe esperar que la inhibición del enzima de conversión de angiotensina (ECA) pudiera mitigar los efectos del crecimiento producidos por la activación *in vivo* del sistema renina-angiotensina. De hecho, varios estudios en diferentes modelos de animales hipertensos, e incluso en pacientes hipertensos, han demostrado como el tratamiento con IECA produce una reversión de la hipertrofia ventricular izquierda (Dunn y cols., 1984; Julien y cols., 1990; Nagano y cols., 1991a; Nagano y cols., 1991b; Martínez y cols., 1999). En modelos de cultivos celulares, se ha visto el efecto directo de la angiotensina II sobre el crecimiento miocítico, observando como esta inducía realmente una hipertrofia celular y estimulaba la síntesis de proteínas. Este efecto de la angiotensina II es bloqueado al pretratar las células con un bloqueante de los receptores AT₁ de angiotensina (Aceto y Baker, 1990).

Hipertrofia mediada por factores de crecimiento

Con el tiempo se han identificado una serie de factores de crecimiento en el tejido miocárdico. Entre estos factores destacan: factores de crecimiento de insulina I y II, factor de crecimiento fibroblástico y el factor de crecimiento β (Englemann y cols., 1989; Long y cols., 1990). De entre ellos son destacables los factores de crecimiento fibroblástico y el de insulina I, los cuales han sido encontrados en los miocitos cardiacos tras un estímulo de sobrepresión (Chiba y cols., 1989). Hasta la fecha, el conocimiento de los efectos directos de estos factores sobre los miocitos es limitado y por tanto, el papel que desempeñan en el desarrollo de la hipertrofia no está bien definido.

Tanto las señales hemodinámicas como no hemodinámicas pueden producir proliferación fibroblástica y expresión de los genes del colágeno. Varios autores han demostrado que la estimulación del sistema renina-angiotensina-aldosterona está implicado en el desarrollo de la fibrosis intersticial (Brilla y Weber, 1991; Jalil y cols., 1991; Yamahada y cols., 1991; Benitah y cols., 1999). Así Brilla y Weber, (1991), comprobaron como se prevenía la proliferación de los fibroblastos cardiacos, utilizando un bloqueante de aldosterona (espirolactona). Otros estudios han confirmado que, la angiotensina II produce tanto crecimiento fibroblástico como expresión de colágeno. Jalil y cols., (1991), observaron que tratando a ratas con Captopril, un IECA, atenuaban la fibrosis intersticial y perivascular mejorando el funcionamiento del ventrículo.

2.1.3. MECANISMOS INTRACELULARES ASOCIADOS AL ESTÍMULO HIPERTRÓFICO

El estiramiento que sufre el corazón en respuesta a la presión está asociado con la activación de diversos mecanismos de transducción, tales como el recambio del fosfoinositol (von Harsdorf y cols., 1989; Dassouli y cols., 1993), la activación de la adenilato ciclasa (Watson y colss., 1989; Xenophontos y cols., 1989) y señales inducidas por el paso de calcio través de los canales de membrana (Haneda y cols., 1989).

El estiramiento miocárdico induce un aumento de los niveles celulares del inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). La acumulación de inositol fosfato es mediada a través de la fosfolipasa C que hidroliza los fosfolípidos de la membrana (Dassouli y cols., 1993). En particular, la fosfolipasa C media la hidrólisis de fosfatidil inositol 4,5-difosfato dando lugar a IP₃ y diacilglicerol (DAG). El DAG activa la proteína kinasa C (PKC) que a su vez está envuelta en el crecimiento celular y la hipertrofia cardiaca (Berrige, 1987; Rana y Hokin, 1990; Simpson y cols., 1991; Schluter y piper, 1999; Naruse y King, 2000).

El estiramiento cardiaco parece también activar la enzima adenilato-ciclasa la cual produce un rápido incremento de los niveles de AMPc. A su vez este AMPc activa a una enzima proteína kinasa dependiente de AMPc, la PKA (Shabb y Corbin, 1991).

Las proteína-quinasas son enzimas que fosforilan proteínas celulares específicas, activándolas o desactivándolas, por lo que son enzimas muy importantes en la regulación de la función fisiológica, incluyendo la síntesis de proteínas. Por ejemplo la PKA fosforila a la proteína de unión al elemento respuesta del AMPc ó CREB el cuál se une a la región promotora de genes aumentando su expresión (Tratner y cols., 1992).

Aunque es menos conocida, parece ser que la presión que induce el estiramiento del ventrículo que se hipertrofia puede activar canales iónicos de membrana permeables a iones Na^+ y Ca^{2+} (Haneda y cols., 1989; Kent y cols., 1989) y activar el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, el cuál aumenta el pH intracelular (produce una alcalinización intracelular) (Schwartz y cols., 1990; Karmazyn y cols., 1999). La alcalinización celular ha relacionado también con un aumento en la síntesis de proteína y el crecimiento celular (Berridge, 1987).

El estiramiento también se ha visto asociado a la expresión de genes tempranos u oncogenes tales como *c-fos* y *c-myc*. Estos son unos de los primeros genes expresados en respuesta a ciertos estímulos (Komuro y cols.,1990; Kolbeck y cols., 1993). Parece ser que codifican a otros factores reguladores del crecimiento y la diferenciación celular (Simpson, 1988). Algunos de estos genes codifican para factores de transcripción que a su vez se unen a regiones reguladoras específicas de otros genes y regulan su expresión. Esta segunda hornada de genes codifican para un nuevo grupo de proteínas que en el corazón incluyen la β -MHC o α -Actina.

Recientemente han surgido nuevas teorías acaparando la atención científica, que tratan de explicar los mecanismos moleculares que acoplan las señales hipertróficas antes mencionadas, tanto hemodinámicas como no hemodinámicas, a la reprogramación de la expresión génica del miocito cardiaco. Numerosos estudios han sugerido como señal un aumento en los niveles de calcio intracelular (Marban y cols., 1987; Sadoshima y cols., 1990; Bustamante y cols., 1991; Leite y cols., 1994; Hongo y cols., 1995).

Varios mecanismos intracelulares se han implicado en la transducción del estímulo hipertrófico. Por ejemplo, la angiotensina II, la fenilefrina y la endotelina-1, provocan la activación de la fosfolipasa C, dando lugar a la producción de DAG e IP_3 , lo que a su vez moviliza el Ca^{2+} intracelular y activa la proteína kinasa C (Sadoshima e

Izumo, 1993; Yamazaki y cols., 1996; Zou y cols., 1996) También existe un amplio grupo de investigadores que proponen como transductores del estímulo hipertrófico al sistema de las kinasas Ras y MAP (proteínas activadas por mitogénesis) (Thorburn y cols., 1993; Force y cols., 1996; Sudgen y Clerk, 1998). La manera en que todos estos mecanismos están relacionados aún permanece sin descifrarse, pero un hecho es claro, todos están asociados con un aumento del calcio intracelular, lo que hace que este ion actúe coordinando la actividad de diferentes mecanismos de transducción del estímulo hipertrófico.

En las células B Y T del sistema inmunológico, la calcineurina, una fosfatasa dependiente de calmodulina, se muestra como enlace entre la expresión génica y el aumento en los niveles de calcio como resultado de la activación de la respuesta inmune. La calcineurina regula los genes de la respuesta inmunológica mediante la desfosforilación de una familia de factores de transcripción conocidos, como NF-ATs (factores nucleares de células T activadas), (Rao y cols., 1997; Izumo y Aoki, 1998). Una vez desfosforilados, los factores de transcripción NF-AT se translocan al núcleo donde directamente activan los genes de la respuesta inmunológica (Flanagan y cols., 1991; Loh y cols., 1996). Los fármacos inmunosupresores como el FK 506 y la ciclosporina A (CsA), suprimen la respuesta inmune por inhibición la actividad de la calcineurina sobre los NF-AT. El NFAT3 es una de las cuatro proteínas conocidas NFAT expresadas en células T y músculo esquelético, pero la NFAT-3 además está expresada en un amplio número de tejidos incluido el corazón adulto (McCaffrey y cols., 1993; Northrop y cols., 1994; Ho y cols., 1995; Park y cols., 1996).

En un estudio reciente presentado por Molkentin y cols., (1998), se demuestra que el miocardio utiliza la calcineurina para activar al factor NFAT3 durante la hipertrofia. Dicho factor se transloca al núcleo donde interacciona con una secuencia GATA4 y que posteriormente inducirá los genes fetales reexpresados en la hipertrofia. Además se muestra como la administración sistémica de CsA y FK-506, previene el desarrollo de hipertrofia en ratones transgénicos a dosis que anteriormente mostraron efectos inmunosupresores. Es interesante señalar que el crecimiento postnatal normal del corazón no se ve afectado por estos fármacos, sugiriendo que los mecanismos de crecimiento cardíaco normales son calcineurina independientes.

Sin embargo, no todo se reduce al mecanismo de la calcineurina, como se indicó anteriormente, numerosos estudios han implicado a la PKC, PKA, calmodulina, MAP kinasas en la transducción del estímulo hipertrófico. Los estudios actuales se basan en un modelo integrado de señales hipertróficas intracelulares. Este modelo predice una interconexión entre todos los mecanismos mencionados (Olson y Molkenin, 1999; Walsh, 1999; Sudgen, 1999).

2.1.4 IMPLICACIONES CLÍNICAS DE LA HIPERTROFIA CARDIACA

Como se ha señalado previamente, la hipertrofia ventricular izquierda representa una importante respuesta compensatoria que permite al miocardio mantener la función cardíaca frente a una sobrepresión. Pero con el tiempo, el alargamiento de los miocitos, el remodelaje del intersticio cardíaco y las alteraciones sufridas en la microcirculación tienen efectos desfavorables que van en detrimento de la función cardíaca. Así, se produce un aumento de la tensión de la pared en la sístole, una disminución de la fracción de eyección e isquemia subendocárdica.

Un aumento de la postcarga requiere que el corazón genere más fuerza y tensión durante la sístole. En respuesta a ese aumento de presión, el corazón comienza a hipertrofiarse. Los cambios morfológicos y estructurales van apareciendo gradualmente a través de diferentes fases que se corresponden con los cambios producidos en la función miocárdica (Opie, 1991; Morgan y Baker, 1992; Natsume, 1993). Durante la primera fase de la hipertrofia, hay un modesto aumento del grosor de la pared del ventrículo izquierdo para tratar de normalizar la tensión a la se somete a la pared. Esta tensión refleja el grado de postcarga y es un factor determinante en el consumo de oxígeno. Así en la primera fase de hipertrofia la tensión de la pared permanece inalterada. Por tanto, el consumo de oxígeno, la función de la bomba en la sístole y otros índices de contractilidad son normales (Katz, 1991; Opie 1991; Vogt y cols., 1993). La relación entre la tensión de la pared, la presión, el grosor del ventrículo y el radio del ventrículo se explica mediante la “Ley de LaPlace” (Katz, 1991).

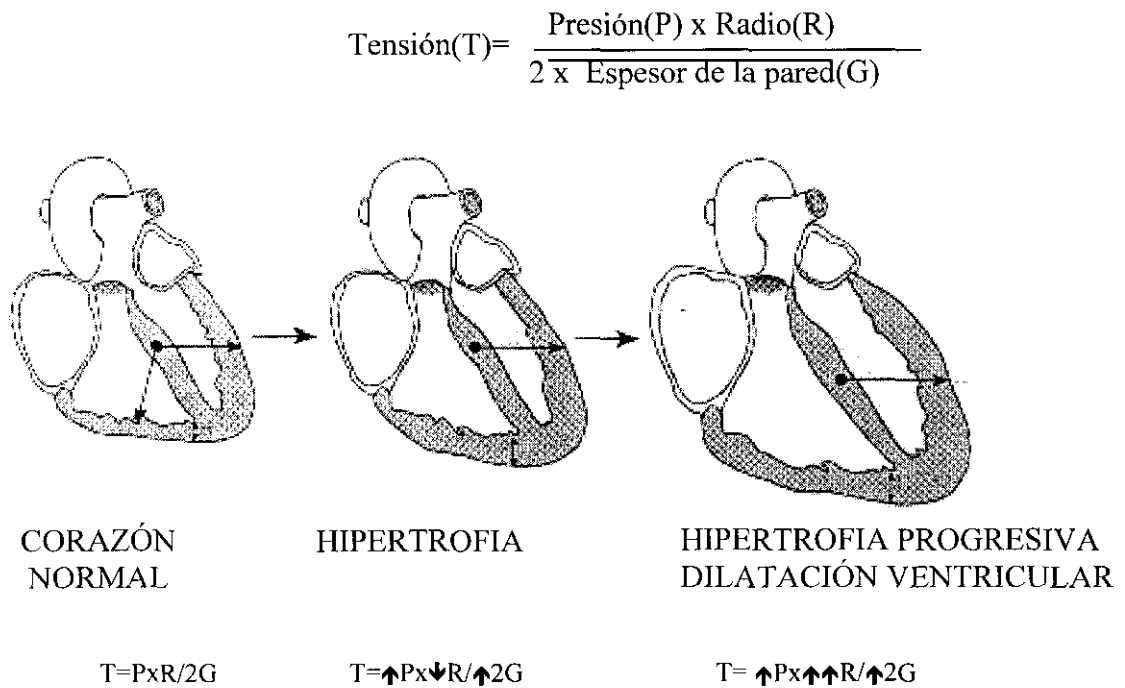


Figura 4. Cambios en el la tensión de la pared según progresa la hipertrofia. Modificado de Pianno, (1994).

Según se observa en la figura 4, durante la primera fase de la hipertrofia, aunque se produce un aumento de la presión, la tensión de la pared permanece prácticamente inalterada porque se produce al mismo tiempo una disminución recíproca del radio ventricular y un aumento del grosor. Pero con el tiempo, en fases ya más avanzadas, se produce un aumento concomitante del volumen de diástole final del ventrículo izquierdo debido a una reducción de la contractilidad cardiaca y a un aumento del retorno venoso asociado a la retención de agua y Na^+ . Entonces se genera una dilatación del ventrículo izquierdo al igual que un aumento en el radio ventricular y todo ello contribuye a un aumento importante de la tensión de la pared ventricular (Pianno, 1994).

2.1.4.1. Disfunción diastólica

Los cambios en la función diastólica suelen ocurrir en las fases tempranas del desarrollo de la hipertrofia y normalmente preceden a los cambios en la función sistólica. La disfunción diastólica se caracteriza por un retraso en la velocidad de relajación y de llenado del ventrículo izquierdo (Grossman, 1991). La relajación, o fase diastólica del ciclo cardíaco, comienza con una disminución en los niveles intracelulares de calcio por recaptación del retículo sarcoplásmico y en menor medida por una salida al exterior celular. En la hipertrofia, se produce una reducción en la velocidad de transporte de calcio por el retículo sarcoplásmico, tanto por disminución en la actividad de la bomba Ca-ATPasa, como de su densidad (de la Bastie y cols., 1990; Mercadier y cols., 1990). Todo ello podría explicar parcialmente el retraso en la velocidad de relajación y la disfunción diastólica que tienen lugar en el miocardio hipertrofico (Douglas y cols., 1989).

Como demostraron Sax y cols, (1988), el ventrículo se vuelve cada vez más duro y requiere una mayor presión de llenado para mantener un volumen de eyección similar. Esto normalmente permanece bien compensado durante el reposo, pero puede provocar síntomas de insuficiencia cardíaca durante el ejercicio. Cabe resaltar que durante el ejercicio aeróbico hay un aumento de la masa ventricular izquierda, pero la elasticidad ventricular permanece inalterada e incluso mejora. Por ello, los pacientes hipertensos y los atletas pueden tener la misma masa ventricular izquierda, pero su función diastólica es muy diferente (Staiger y cols., 1985).

2.1.4.2. Isquemia miocárdica

Una gran variedad de mecanismos patogénicos pueden ser los responsables de la isquemia miocárdica que sufren muchos pacientes con hipertrofia ventricular izquierda. Entre ellos: 1º, la hipertensión tiene una implicación directa con la patogénesis de la arterioesclerosis coronaria, la cual impide un correcto suministro de oxígeno. 2º, un aumento de la masa ventricular a su vez también requiere un mayor aporte de oxígeno. 3º, el crecimiento de la red capilar en el miocardio hipertrofico no se corresponde con el aumento de la masa ventricular (Mueler y cols., 1978; O'Keefe y cols., 1978).

El suministro sanguíneo resulta insuficiente en relación a la demanda del corazón lo que provoca situaciones de isquemia. La inadecuada llegada de oxígeno por debajo de los requerimientos mínimos, induce a una fibrosis y necrosis celular. El paciente con hipertrofia ventricular izquierda es más propenso a sufrir episodios de isquemia asintomática y arritmias ventriculares, lo que ocasiona a su vez enfermedades cardiovasculares más graves tales como insuficiencia cardíaca, infarto y muerte súbita (Strauer, 1979; Strauer, 1987; Chiariello y Perrone-Filardi, 1999).

2.1.4.3. Arritmias ventriculares

Ha sido ampliamente documentado, en pacientes con hipertrofia ventricular izquierda, la mayor prevalencia de contracciones ventriculares prematuras y arritmias más serias (Almendranal y cols., 1995). Los mecanismos electrofisiológicos específicos que producen este aumento de arritmias en la hipertrofia permanecen aún sin descifrar. Factores tales como la fibrosis intersticial, el cambio en la arquitectura miocárdica, la propagación defectuosa del impulso y el aumento de los mecanismos de reentrada, pueden ser decisivos en la arritmogénesis (Levy y cols., 1987; McLeachan y cols., 1987; Siegel y cols., 1990).

Aunque no existe una conexión entre las arritmias ventriculares y la muerte súbita, no parece descabellado asumir que focos ectópicos ventriculares en una población con alto riesgo de sufrir muerte súbita, como son los pacientes con hipertrofia ventricular izquierda, puedan dar lugar a arritmias más serias que pueden llegar a ser fatales (Cameron y cols., 1983; Bikkina y cols., 1993).

datos sugieren la presencia de otros factores de riesgo determinantes del desarrollo de la hipertrofia ventricular izquierda. Entre ellos se puede destacar:

-*Obesidad*: Un aumento de la masa corporal lleva consigo un aumento de tejido adiposo y, por tanto, un mayor esfuerzo por parte del corazón para responder a las mayores demandas metabólicas. Esta adaptación cardiaca a la obesidad, lleva al desarrollo de hipertrofia (Messerli, 1982; ; Messerli y cols., 1983; Messerli, 1986). Datos obtenidos del estudio Framingham (Levy y cols., 1988; Benjamin y Levy; 1999) han demostrado un aumento de la prevalencia de la hipertrofia de 9 a 10 veces, dependiendo del grado de obesidad.

-*Sexo*: Las mujeres tienen una menor masa ventricular izquierda para un mismo valor de presión arterial en comparación con los hombres (Gardin y cols., 1987). Este hecho indica que las hormonas sexuales pueden representar un papel importante en la adaptación del corazón frente a una determinada carga hemodinámica. Los andrógenos endógenos parecen ejercer un efecto trófico en el músculo cardiaco, como se ha demostrado en ciertos modelos animales (Koenig y cols., 1982); y en cambio los estrógenos pueden prevenir e incluso proteger frente al desarrollo de hipertrofia. Cabría esperar por tanto que, los estrógenos pudieran tener un efecto vasodilatador de la vasculatura periférica, imponiendo una menor sobrecarga hemodinámica al ventrículo izquierdo (Messerli y cols., 1987).

-*Raza*: Es sabido que los individuos de raza negra presentan una mayor prevalencia de hipertensión que los individuos de raza blanca (Frolich y Tarazi, 1979), al igual que son más propensos a sufrir más frecuentemente complicaciones asociadas, como la muerte súbita, insuficiencia cardiaca congestiva, infarto y fallo renal (McDonough y cols., 1964; Hypertension Program, 1977; Asher y cols., 1999; Potts y Thomas, 1999;).

-*Consumo de sal*: Estudios experimentales han mostrado que un alto consumo de sal en la dieta produce un aumento de la masa cardiaca, independientemente de la presión arterial. Así mismo, la restricción de sodio produce una disminución de la masa cardiaca aunque los niveles de presión arterial no sean revertidos. Tomando la excreción de sodio urinario como índice del consumo de sal en la dieta, se ha visto una fuerte

correlación entre el grado de relajación del ventrículo izquierdo y el nivel de sodio, y lo que es más, de la masa ventricular izquierda (Sen y Young, 1986; Shimieder y cols., 1988).

2.1.6. TRATAMIENTO DE LA HIPERTROFIA

La hipertrofia ventricular izquierda es un importante factor de riesgo independiente para la morbilidad cardiovascular y la mortalidad, tanto en hombres como en mujeres. Aunque en la población en general el antecedente común de hipertrofia ventricular izquierda es la hipertensión (Allen y cols., 1988; Koren y cols., 1991), otras señales no hemodinámicas influyen en su desarrollo. Todas estas señales, vía diversos mecanismos intracelulares, inducen una hipertrofia patológica que es muy diferente a la hipertrofia inducida por el ejercicio, la cuál comúnmente se conoce como “hipertrofia fisiológica”.

El conocimiento de los mecanismos moleculares de la hipertrofia cardiaca y de las señales intracelulares pueden ayudar a establecer un tratamiento adecuado. Dicho tratamiento debe ir encaminado a disminuir, o inducir una regresión de la hipertrofia ventricular izquierda, ya que su regresión está relacionada con una disminución de la morbilidad cardiovascular. De hecho, pacientes tratados con una terapia antihipertensiva en la cuál la hipertrofia persiste, tienen aumentada hasta más de cinco veces la probabilidad de sufrir complicaciones cardiovasculares, con respecto a aquellos pacientes sin hipertrofia (Koren y cols, 1991). Todos estos datos muestran la necesidad de desarrollar terapias que inhiban directamente los efectos del crecimiento, debido tanto a los estímulos hemodinámicos como los no hemodinámicos.

Actualmente no existe un tratamiento directo para la hipertrofia, su terapia pasa por tratar fundamentalmente la hipertensión causante de su desarrollo y monitorizar cuidadosamente la función del corazón. Hay numerosos agentes antihipertensivos que inducen una reducción o reversión de la hipertrofia ventricular cardiaca. Es interesante destacar que, agentes tales como la hidralazina o el minoxidil que producen reducción de la presión arterial no son capaces de revertir la hipertrofia. Esto sugiere que no es sólo suficiente la reducción de la presión arterial para revertir la hipertrofia, sino que

hay que actuar sobre otras señales no hemodinámicas como son la angiotensina II y los agentes α - y β -adrenérgicos. Cuando se administra α -metil-dopa (un agente simpático) junto con un diurético, algunos de los pacientes muestran una disminución significativa de la masa cardíaca no relacionada con los niveles de presión arterial, es decir, sin una reducción consecuente de los niveles de presión arterial. El tratamiento con inhibidores del enzima de conversión de angiotensina, antagonistas del calcio, prazosin y clonidina la reducción en la presión arterial va acompañada de una regresión de la hipertrofia cardíaca. Por otro lado, después del tratamiento con β -bloqueantes los resultados son más heterogéneos en cuanto a la reversión de la hipertrofia se refiere (Vogt y Strauer, 1995). A nivel teórico, los fármacos β -bloqueantes, son fármacos de elección en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, no sólo controlan la presión arterial y revierten la hipertrofia sino que además disminuyen la mortalidad y la morbilidad después de un infarto de miocardio, lo que probablemente es el principal factor en el desarrollo de insuficiencia cardíaca en pacientes hipertensos. Pero no sólo los bloqueantes β no selectivos han demostrado estas propiedades, el carvedilol un bloqueante no selectivo β también con efectos bloqueantes α_1 , es también un fármaco de elección en el tratamiento de la insuficiencia cardíaca derivada de una hipertensión sostenida, además muestra efectos antioxidantes y mejora el cuadro metabólico (Cleland, 1999).

En la tabla 2, se muestra una relación de los fármacos más ampliamente utilizados en la terapia antihipertensiva y que además, inducen una reversión efectiva de la hipertrofia ventricular izquierda.

Tabla 2. Agentes antihipertensivos eficaces revirtiendo la hipertrofia ventricular izquierda

CLASIFICACIÓN	FÁRMACOS ESPECÍFICOS
Bloqueantes α_1 -adrenérgicos	Prazosin
Inhibidores ECA	Captopril Enalapril Lisinopril Ramipril.....
Antagonistas de Calcio	Verapamil Diltiazem Nicardipino....
Bloqueantes β -adrenérgicos	Metoprolol Timolol Atenolol...
Agentes simpáticos	Clonidina Reserpina α -metildopa

Todos estos tratamientos van encaminados a mejorar la microcirculación y la reserva coronaria, también afectada durante la hipertrofia, aunque no todos ellos son igual de efectivos a este nivel. La administración de los antagonistas de calcio mejora la resistencia vascular coronaria, produciendo una regresión de la hipertrofia miocárdica (Leenen, 1998; Kuschnir, 1999). Inhibidores de ECA como el lisinopril, que mejoran la reserva coronaria, mediante la regresión de la hipertrofia miocárdica y de la fibrosis. Mas aún, una disminución de la densidad del volumen miocárdico y un aumento de la

densidad de capilares con nifedipino o monoxidina, han sido también demostrados en hipertensión experimental (Vogt y Strauer, 1995).

Respecto a la modulación farmacológica de la síntesis y degradación de la matriz extracelular, los IECA son los fármacos que con más éxito actúan sobre ella. La inhibición de la síntesis de colágeno tipo I por antagonistas del receptor de angiotensina II, o del receptor de mineralocorticoides en los fibroblastos cardiacos, junto con una disminución en los niveles de angiotensina II, es la llave para aumentar la degradación de colágeno. Estos son los procesos bioquímicos más importantes a tener en cuenta en la terapia farmacológica. La cardiopreención es una intervención farmacológica profiláctica mediante IECA o antagonistas de aldosterona, para prevenir una excesiva fibrosis y así controlar el remodelaje miocárdico estructural que lleva de una hipertrofia a una insuficiencia cardiaca severa. (Maisch, 1996; Devereux, 2000).

Fármacos que actúan a nivel del receptor AT₁ de angiotensina también están demostrando su gran utilidad en el tratamiento de la hipertensión arterial y de la reversión de la hipertrofia, ya que al bloquear ese subtipo de receptor y no el AT₂, permite que la angiotensina pueda seguir ejerciendo su efecto favorable en la inhibición del crecimiento celular mediado a través de ese subtipo AT₂ (Devereux, 2000). Así, estos fármacos bloqueantes del receptor AT₁ evitan los efectos patológicos de la angiotensina II y son efectivos disminuyendo la presión arterial, inhibiendo la actividad simpática y previniendo la hipertrofia cardiovascular y la insuficiencia cardiaca (Holtz, 1998; Timmermans, 1999).

Varios de los fármacos anteriormente citados, también han demostrado tener efectos como inhibidores de los factores de crecimiento implicados en la estimulación de la arterioesclerosis, como los IECAs, los antagonistas de calcio y los bloqueantes β . Además, no todos los fármacos son iguales de efectivos en todos los pacientes y a veces es necesario hacer una terapia combinada para que la regresión de la hipertrofia cardiaca tenga lugar.

Actualmente se investigan nuevas terapias para el tratamiento de la hipertensión y la hipertrofia y riesgos cardiovasculares asociados a esta última. Se ha visto que la endotelina-1, producida tanto por los miocitos como por las células endoteliales, interviene en el desarrollo de la hipertrofia miocárdica. Además su aumento contribuye al daño tisular ocasionado durante el infarto. Esto hace plantearse como una buena terapia a desarrollar, fármacos que actúen bloqueando los receptores de endotelina miocárdicos (Moreau, 1998; Miyauchi y Goto, 1999). Por otro lado, los estimulantes de los receptores de imidazolina son efectivos agentes antihipertensivos actuando a nivel central, causando vasodilatación y reducción de las resistencias vasculares periféricas. También producen una disminución de la hipertrofia generada a largo plazo. La monoxidina y la rilmenidina, son los fármacos más estudiados a este nivel y parece ser que mejoran los efectos secundarios vistos anteriormente con la clonidina, particularmente los referidos a la sedación (van Zwieten y Peters, 1999).

2.1.7. MODELOS EXPERIMENTALES UTILIZADOS PARA INDUCIR HIPERTROFIA CARDIACA

Para estudiar experimentalmente los distintos tipos de hipertrofia se han utilizado varios modelos experimentales en animales de laboratorio (Hamrell y cols., 1986). La hipertrofia inducida por la hipertensión arterial en el hombre, puede estudiarse con distintos modelos que impongan al corazón del animal una sobrecarga de presión. Esto se puede conseguir por obstrucción parcial de uno de los grandes vasos, hipertensión sistémica o pulmonar. La sobrepresión puede provocarse de forma aguda o gradual: por ejemplo, un clip no constrictor colocado en la aorta abdominal de un animal joven, se convertirá en constrictor lentamente a medida que el animal vaya creciendo. También, la infusión intravenosa de gel de sílice, monocrotalina o sefadex, induce hipertrofia de forma gradual.

Las alteraciones que en el hombre desencadenan una hipertrofia por aumento del volumen que el corazón debe bombear pueden ser: fallo en la válvula mitral, comunicación entre la arteria aorta y la vena cava, bloqueo aurículo-ventricular, etc. En los animales pueden provocarse por una fistula arteriovenosa o un defecto en el septum aurículo-ventricular. El infarto de miocardio puede imitarse mediante la ligadura de un

arteria coronaria. Así, se produce una pérdida de la función en la parte de la pared ventricular afectada y el resto del tejido miocárdico no afectado desarrollará hipertrofia.

Otras formas de provocar el desarrollo de una hipertrofia cardiaca en un animal de experimentación, para su posterior estudio, puede ser la administración crónica de ciertas sustancias como la hormona tiroidea, la hormona del crecimiento, β -agonistas o adrenocorticoides. O bien, someter a los animales a estrés, aclimatarles al frío, provocarles una infección vírica o endocarditis bacteriana. También someter a los animales a un ejercicio físico continuado como correr o nadar, induce el crecimiento del corazón. En corazones viejos, el músculo cardiaco está hipertrofiado, presentando alteraciones en la funcionalidad mecánica similares a los encontrados en la hipertrofia por sobrepresión (Hamrell y cols., 1986).

Los modelos de hipertrofia *in vivo* tienen el inconveniente del crecimiento del animal durante el progreso de la hipertrofia, que puede estar afectado por cirugía, tirotoxicosis, anemia, etc. Para evitar estos problemas, y poder evaluar el grado de hipertrofia, el peso del corazón se debe relacionar con el peso corporal. Aquí aparece otro problema, los animales permanecen estabulados, pesan más y podría dar un falso índice de hipertrofia. Esto se resuelve fácilmente al comparar los cocientes pesos cardiacos/pesos corporales de los animales en los que se ha inducido hipertrofia con otros controles que se mantengan en las mismas condiciones. Otro modo posible de evitar problemas propios de los métodos *in vivo* es mediante la estimulación de la hipertrofia en cultivo tisular, además, así se podrían estudiar los efectos de determinados agentes directamente a nivel celular (Bugaisky y Zak, 1986). Sin embargo, las células mantenidas en cultivo no están en un medio fisiológico y por tanto los resultados hay que tomarlos con precaución.

Tabla 3. Diferentes modelos experimentales realizados en animales y utilizados en la inducción de la hipertrofia cardiaca. Modificado de Bugaisky y Zak, (1986).

Sobrecarga de presión	Sobrecarga de volumen	Sobrecarga por factores variados
<p><i>Estenosis aórtica</i></p> <p>Aorta ascendente (rata: Cutilleta y cols., 1975)</p> <p>Aorta abdominal (rata: Scamps y cols., 1990; Gómez y cols., 1997; Martínez y cols., 1999)</p> <p><i>Estenosis de la arteria pulmonar</i> (gato: Ten Eik y cols., 1977)</p> <p><i>Hipertensión</i></p> <p>Isquemia renal (rata: Aronson, 1980)</p> <p>Nefrectomía + DOCA+sal (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p>Aldosterona+sal (rata: Garwitz y Jones, 1982)</p> <p>Rata espontáneamente hipertensa (Haysasi y Shibata, 1974)</p> <p>Rata Dahl Espontáneamente sensible a sal (Pfeffer y cols., 1984)</p>	<p><i>Fístula arterio-venosa</i> (rata: Dart y Holloszy, 1969)</p> <p><i>Insuficiencia aórtica</i> (conejo: Hatt y cols., 1970)</p> <p><i>Anemia</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p>	<p><i>Hipertiroidismo</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Hipoxia</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Catecolaminas</i> (rata: Bartsova y cols., 1969)</p> <p><i>Infarto</i> (rata: Thollon y cols., 1989)</p> <p><i>Ejercicio</i></p> <p>Carrera (rata: Hickson y cols., 1979)</p> <p>Natación (rata: Gülch, 1983)</p> <p><i>Desarrollo embrionario a baja temperatura</i> (pollo: Leighton y cols., 1964)</p> <p><i>Cardiomiopatía</i> (Hamster: Rossner y Sachs, 1978)</p>

2.2. ELECTROFISIOLOGÍA CARDIACA

2.2.1. CONCEPTOS BÁSICOS DE ELECTRICIDAD APLICADOS A LA BIOLOGÍA CELULAR

Los conceptos básicos de electricidad son tres: carga, movimiento de esa carga y las fuerzas que causan ese movimiento. La propiedad fundamental de la electricidad es la existencia de una carga. En los tejidos, los portadores de carga son principalmente los iones, bien positivos o negativos. La corriente es el movimiento neto de iones en una dirección determinada. La corriente puede ser generada tanto por iones positivos como negativos, por lo que la corriente positiva se define como cargas positivas moviéndose en una determinada dirección o cargas negativas moviéndose en la dirección contraria. La unidad de corriente es el Amperio.

Para definir la corriente que fluye a través de una membrana celular se necesita un concepto adicional. La corriente, (cargas positivas), que se mueve hacia el interior celular, se considera corriente de membrana negativa, (corrientes de entrada), en cambio la corriente, (cargas positivas), que se mueve hacia el exterior celular se considera corriente positiva de membrana (corrientes de salida).

El voltaje es la medida de la fuerza eléctrica que causa el movimiento de las cargas o bien la fuerza desarrollada por la carga en movimiento. También se le llama potencial, porque una carga en un determinado punto tiene una cantidad determinada de energía potencial. Normalmente lo que se mide es el voltaje de un punto respecto a otro, es decir, la diferencia de voltaje o diferencia de potencial.

Una de las relaciones más importantes en electricidad que relaciona voltaje (V) y corriente (I), es la “Ley de Ohm” que viene definida como:

$$V=RI$$

donde R es una resistencia constante al flujo de corriente. La resistencia es un impedimento que surge para dificultar el movimiento de las cargas y está definida tanto por el transportador de carga como por el material a través del cual fluye la corriente. La conductancia (g) es el inverso de la resistencia y representa la facilidad al paso de corriente. Las membranas biológicas presentan una alta resistencia con relación al medio extracelular y al citoplasma. La conductancia de la membrana depende al menos de dos componentes: a) la permeabilidad de la membrana al ion en cuestión y b) la cantidad de ion presente. La permeabilidad es una propiedad de la membrana en si misma y está presente aunque no existan iones. La corriente solo actúa si hay iones y, además, su magnitud será proporcional a la concentración.

Otra propiedad eléctrica importante en tejidos es la capacitancia. Su unidad es el Faradio (F) y se define como la cantidad de carga almacenada para cada diferencia de potencial. Para entender este concepto de almacén de carga en una membrana biológica, podemos pensar en la membrana como una barrera de alta resistencia al paso de corriente y sus dos caras están bañadas por soluciones electrolíticas de baja resistencia. Las dos soluciones electrolíticas y la membrana forman un condensador en paralelo. La habilidad de la membrana para almacenar cargas separadas esta determinada por su espesor, su constante dieléctrica y su superficie.

2.2.2. MEMBRANA CELULAR

El componente de la membrana que mayor resistencia ofrece al paso de la corriente es la capa molecular de fosfolípidos. La mayoría de estas moléculas tienen un extremo neutro y otro cargado. Con las condiciones adecuadas, estas moléculas se disponen en línea de manera que los extremos hidrófobos quedan juntos y hacia dentro y los extremos cargados hacia fuera en contacto con ambas soluciones electrolíticas. La zona hidrófoba de la bicapa tiene un espesor de 50Å . Su constante dieléctrica varía entre los valores de 4 a 5, lo que la hace ser un buen aislante. Esto unido al espesor le confiere la propiedad de actuar como un buen capacitor y los iones no pasan fácilmente a través de ella.

Las proteínas de la bicapa crean un ambiente capaz de dejar pasar agua e iones a su través y moverse de un lado a otro de la membrana. Por ello, la membrana tiene una resistencia finita al movimiento de iones y agua.

La conductancia de la membrana se define como la habilidad de la membrana para permitir el movimiento de iones en respuesta a un campo eléctrico. Como ya se citó previamente, esta conductancia depende de dos factores fundamentalmente: la permeabilidad de la membrana para el ion de interés y la concentración de iones capaces de moverse a ambos lados de la membrana (Fozzard y Arnsdorf, 1986).

2.2.3. CANALES

Los canales son el componente de la membrana que permite o facilita el paso de los iones a través de la barrera hidrófoba. Parece que los canales contienen agua en su interior, así los iones podrían estar parcialmente hidratados. Los iones se mueven por el canal en respuesta a un gradiente externo electroquímico, pero no necesariamente de forma lineal (Fenwick y cols., 1982). La mayoría de los iones interactúan con el canal en uno o varios puntos durante su paso, pero no se forman enlaces covalentes. Puede ser que más de un ion esté dentro del canal simultáneamente, pero el tiempo que un ion está parado en el canal es más corto que el tiempo de la llegada de nuevos iones para pasar a su través.

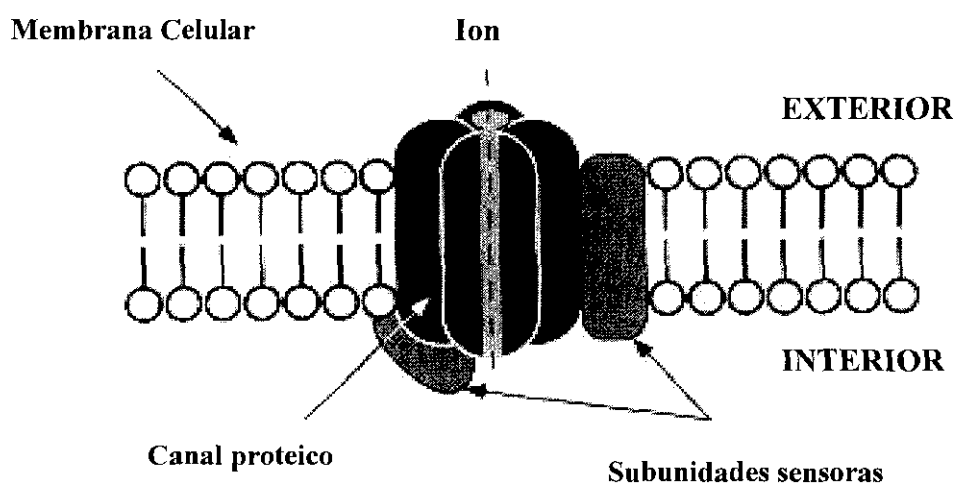


Figura 5. Esquema de un canal iónico de membrana. Modificado de Jalife y cols., 1999.

La activación de una canal es un hecho estadístico, cuya probabilidad depende de la presencia de un activador químico o un potencial transmembranal. Los canales discriminan entre iones, de tal manera que podemos hablar de canales de sodio (Na^+) o de potasio (K^+). Pero la selectividad no es perfecta y alguna corriente podría ser generada por otros iones que no sean el principal para ese canal.

Los canales de membrana están formados por proteínas o lipoproteínas. Se abren o cierran en respuesta a un cambio en el campo eléctrico de la membrana. Es plausible pensar que la apertura o cierre de un canal está causada por el movimiento de las moléculas del propio canal. Este proceso tiene analogía imaginando al canal como un poro en la membrana con una puerta que regula el paso de iones. Las primeras sugerencias sobre el comportamiento de los canales las ofrecieron los modelos de Hodgkin y Huxley, (1952), para explicar la dependencia de voltaje de la apertura y cierre del canal.

Por tanto, unos de las principales funciones del canal radica en su mecanismo de apertura y cierre, también conocida como “gating”. De hecho los canales iónicos se clasifican según sus mecanismos de apertura y cierre. Existen canales dependientes de voltaje, cuando la apertura o el cierre del poro está influida por el voltaje de membrana. Los canales de Na^+ , Ca^{2+} , y varios tipos de corrientes de K^+ envueltas en el potencial de acción son voltaje dependiente. Otro grupo de canales es el formado por los canales dependientes de ligando, es decir, se abren o cierran en presencia de un ligando químico apropiado que puede estar presente bien en el medio extracelular como intracelular. Algunos de estos ligandos son la acetil-colina y el ATP, que actúan sobre la corriente rectificadora de entrada de K^+ . En la figura 6 se muestra el mecanismo esquematizado de ambos tipos de canales.

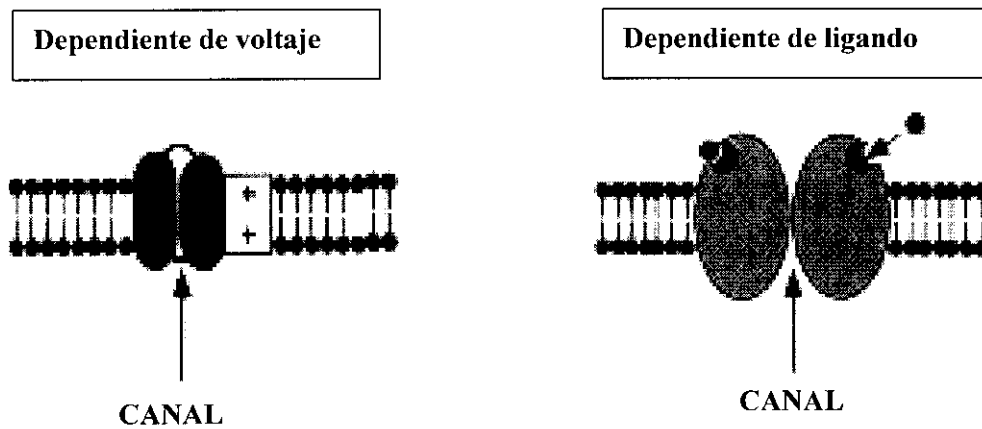


Figura 6. Esquema de un canal dependiente de ligando y de un canal dependiente de voltaje. Modificado de Jalife y cols., 1999.

El fenómeno de “gating” puede imaginarse como un cambio en la conformación de la proteína, es decir, un cambio en la estructura interna de la molécula que forma el canal en diferentes formas o estados que permiten o previenen la translocación del ion. Se podría simplificar el mecanismo de gating si imaginamos que los canales iónicos pueden encontrarse en uno de los tres estados siguientes: cerrado, abierto o inactivo. Por ejemplo, un canal puede estar cerrado en reposo y no dejar pasar iones a su través, en presencia de un estímulo adecuado el canal se abre y permite el paso de iones. En el estado inactivo, el poro está también cerrado y no permite el paso de iones. Los canales iónicos se diferencian según el número de estados que presentan así como en las diferentes transiciones que pueden darse entre dichos estados. Un canal puede tener uno o varios estados inactivos o cerrados y producirse diversas formas de transiciones entre ellos antes de llegar de nuevo a abrirse. Estos cambios son los que vienen definidos en la teoría cinética del canal. Los primeros en estudiar este fenómeno fueron Hodgkin y Huxley, (1952), viendo las bases del potencial de acción del axón gigante del calamar. La transición entre estados se podría esquematizar como se propone en la figura 7:

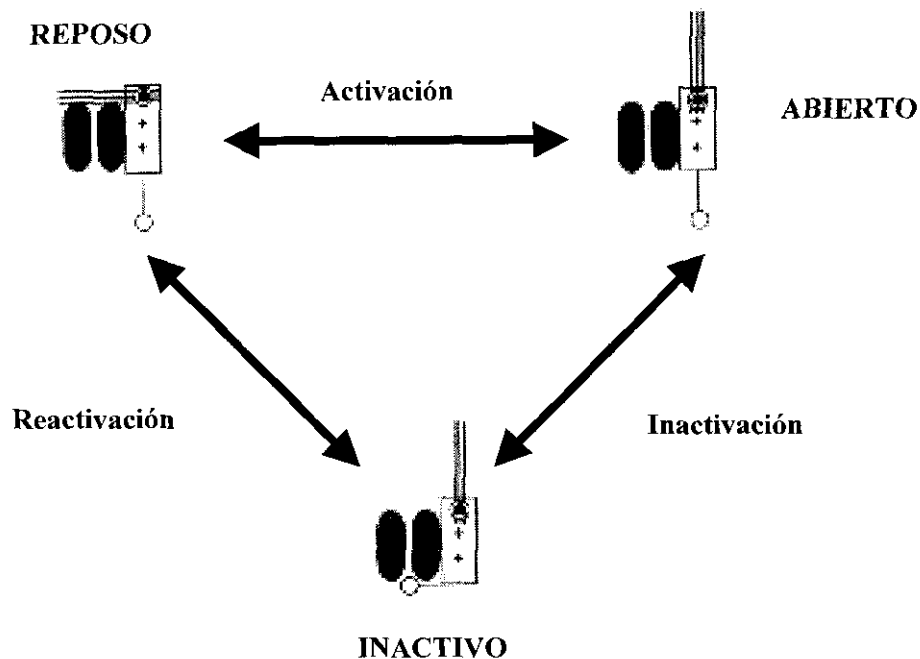


Figura 7. Transiciones entre los posibles estados de un canal. Modificado de Jalife y cols., 1999.

2.2.4. POTENCIAL DE REPOSO DE LA CÉLULA CARDIACA

El potencial de reposo de la célula cardíaca está determinado por la concentración de iones (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) a uno y otro lado de la membrana, así como por su permeabilidad para cada ion. En condiciones normales las células musculares cardíacas presentan un nivel de potencial de membrana entre -60 y -90 mV, según la zona en que nos encontremos. Existen importantes diferencias en la concentración de los distintos iones a ambos lados de la membrana. Este gradiente de concentraciones se mantiene gracias a la actividad de distintas ATPasas, principalmente la ATPasa Na^+/K^+ y el intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$, presentes en la membrana cardíaca. Los iones de Na^+ tenderán a penetrar al interior celular mientras que los iones de K^+ tenderán a salir siguiendo su gradiente de concentraciones. A niveles negativos de potencial de

membrana (potencial de reposo normal de la célula cardíaca), los canales de Na^+ están cerrados y no permiten el paso de Na^+ al interior celular. La ATPasa Na^+/K^+ está activa de manera que saca Na^+ fuera de la célula a favor de la entrada de K^+ contra gradiente en razón de 3:2 respectivamente. Además, existe un canal de K^+ cuya activación genera una corriente de salida de K^+ , I_{KI} que a potenciales negativos permanece en estado abierto y es capaz de sacar iones K^+ al exterior celular. Como consecuencia, el interior celular es un medio rico en K^+ y bajo en Na^+ , todo lo contrario que el exterior (Gadsby, 1990).

Para cada ion existe un nivel de potencial de membrana para el cuál el flujo iónico generado en respuesta al gradiente eléctrico o de concentración es nulo. Se denomina potencial de reversión. Valores de potencial por encima del potencial de reversión hacen que la corriente comience a fluir en sentido contrario.

2.2.5. POTENCIAL DE ACCIÓN CARDIACO

Cuando una célula cardíaca auricular, ventricular o del sistema de His-Purkinje se despolariza por encima de un determinado valor de potencial llamado “potencial umbral”, los canales de Na^+ , que permanecían cerrados a potencial de reposo negativo, cambian su configuración hacia el estado abierto. Esto permite la entrada de iones Na^+ al interior celular y, por lo tanto, la despolarización del potencial de membrana hacia valores positivos (de +20 mV a +35 mV). El proceso de activación de los canales de Na^+ genera una corriente de entrada de Na^+ que da lugar a la *fase cero* del potencial de acción. La magnitud de la corriente de sodio determina la amplitud y la velocidad de despolarización y, por tanto, la velocidad de conducción intracardiaca. La apertura de los canales de Na^+ es muy rápida tras lo cual el canal pasa al estado inactivo que al igual que el estado de reposo no permite el paso de iones a su través. Sin embargo, una pequeña proporción de canales de Na^+ continua abriéndose durante cientos de milisegundos (ms) después de haber sido activados, generando una corriente neta de entrada de Na^+ , que contribuirá al mantenimiento posterior de la fase de meseta del potencial de acción.

A continuación, tiene lugar la repolarización celular en la que se distinguen tres fases: La *fase 1*, o fase de rápida repolarización, que se debe a dos procesos independientes: a) la inactivación de los canales de Na^+ , y b) la activación de una corriente transitoria de salida de K^+ (I_{to}); la *fase 2* o fase de meseta es la más característica de los potenciales de acción cardiacos que a diferencia de los potenciales nerviosos dura unos 250 ms. Esta fase es resultado de un equilibrio muy fino entre: a) dos corrientes de entrada, una de Na^+ (I_{Na}) y otra de Ca^{2+} (I_{Ca}) y b) dos corrientes de salida de K (I_{Kr} e I_{Kv}). Al final de la fase de meseta los canales de Ca^{2+} se cierran y la magnitud de las corrientes de salida de K^+ aumenta, lo que da lugar a la *fase 3* del potencial de acción. Durante esta fase se produce una rápida y completa repolarización del potencial de membrana gracias a la activación de numerosas corrientes de salida de K^+ (I_{Kr} , I_{Ks} , I_{Kur} e I_{K1}).

La *fase 4* se inicia una vez que el potencial de reposo alcanza de nuevo su valor normal y finaliza al comienzo del siguiente potencial de acción. En células no automáticas esta fase es isoelectrica y, por tanto, el potencial de membrana se mantiene constante. Sin embargo, en células automáticas como las células de His-Purkinje, nodo senoauricular y nodo auriculo-ventricular, presentan durante la fase 4 una lenta despolarización que desplaza progresivamente el potencial de membrana hacia el valor de potencial umbral, hasta disparar un nuevo potencial de acción. Esta fase de lenta despolarización diastólica es consecuencia de una corriente neta de entrada de cargas positivas al interior celular, aunque las corrientes iónicas implicadas no son del todo conocidas y varían según el tejido.

El potencial de acción generado por el nodo senoauricular, se propaga por el resto de las células excitables auriculares vecinas generando en ellas nuevos potenciales de acción, que a su vez despolarizarán electrónicamente un nuevo potencial de acción en las células vecinas, y así sucesivamente a través de todo el tejido cardiaco. El disparo del potencial de acción genera la contracción celular poniendo en marcha una serie de mecanismos intracelulares que comienzan con la entrada de calcio y desembocan en la interacción de los miofilamentos de actina y miosina produciendo finalmente la contracción cardiaca.

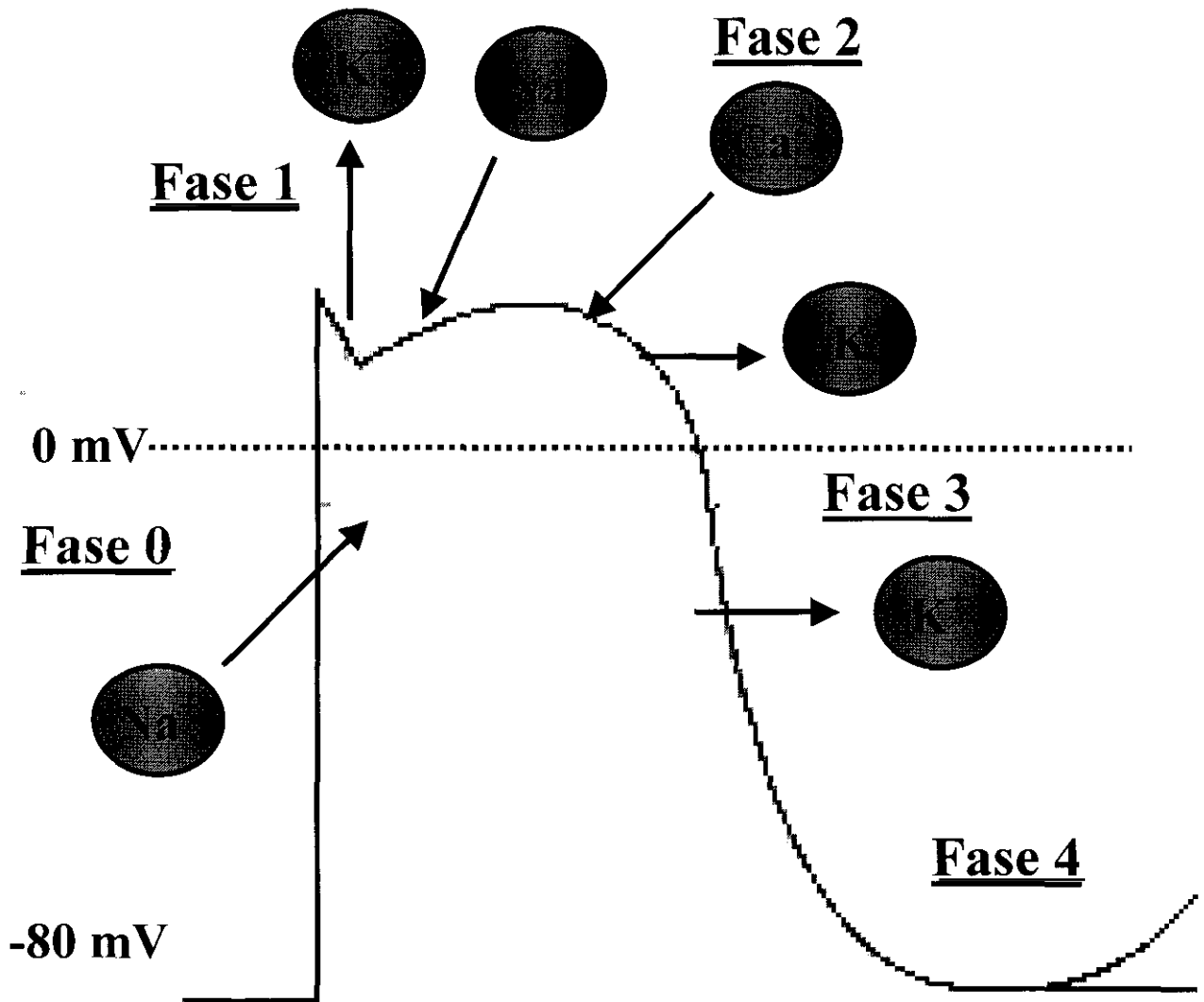


Figura 8. Esquema de un potencial de acción cardiaco.

2.2.6. CORRIENTES IÓNICAS

Corriente de sodio

La corriente de Na^+ es la que lleva a cabo la fase 0 del potencial de acción. Los canales de Na^+ se abren, tras una despolarización, permitiendo un flujo de Na^+ a favor de gradiente electroquímico hacia el interior celular. Esta despolarización causa una mayor despolarización de la membrana a una velocidad muy rápida hasta alcanzar valores positivos de potencial de membrana.

Corriente de potasio

Los canales de potasio proporcionan corrientes de salida que dan lugar a la repolarización celular. Actúan en la fase 1 del potencial de acción, en la repolarización temprana, en la fase 3, en repolarizaciones más tardías, y en la fase 4 manteniendo el potencial de reposo. Se han descrito numerosos canales potasio selectivos en preparaciones de miocitos maduros e inmaduros (Carmeliet, 1989). Entre estos diferentes tipos destacamos los siguientes grupos:

$-I_{K1}$: Corriente de rectificación de entrada. Su papel principal parece estar relacionado con el mantenimiento del potencial de reposo (Pennefather y Cohen, 1990).

$-I_{to}$: Corriente transitoria de salida de potasio. Su amplitud depende del potencial de membrana y es la responsable de la fase 1 del potencial de acción. La amplitud de esta corriente también depende de la frecuencia de estimulación.

$-I_K$: Corriente de rectificación retardada de potasio. Es importante en la fase 3 de repolarización del potencial de acción. Parece también estar implicada en la despolarización de la membrana en las células automáticas

Actualmente se han descrito dos subtipos de canales de esta corriente con diferente conductancia el I_{Kr} e I_{Ks} . Se diferencian por sus propiedades biofísicas, farmacológicas y reguladoras.

$-I_{K(ATP)}$: Corriente rectificadora de entrada sensible a los niveles citoplasmáticos de ATP. Permanece cerrado ante niveles normales de ATP pero en presencia de concentraciones menores de 0.5mM de ATP (Lederer y Nichols, 1989), como es el caso de la isquemia, estos canales se activan.

$-I_{K(ACh)}$: Corriente similar a la I_{K1} pero que se activa por la unión de la acetil-colina (ACh) a su receptor muscarínico. Es un mecanismo importante en la modulación de las propiedades eléctricas del corazón mediante estimulación vagal.

$-I_{K(Ca)}$: Canal de potasio activado por calcio, ya que se abre en presencia de altas concentraciones de Ca^{2+} citosólico que inician la contracción. Esta corriente ayuda a terminar el potencial de acción (Coraboeuf y Carmeliet, 1990).

Corrientes de Calcio

Las células cardiacas presentan otra corriente de entrada que se activa por despolarización de la membrana y que no es sensible a tetrodotoxina. Es la corriente generada por el movimiento de los iones Ca^{2+} (Fatt y Katz, 1953; Winwgrad y Shane, 1962).

Esta corriente en las células cardiacas fluye a través de dos tipos de canales, el T y el L, que comparten su alta selectividad por los iones Ca^{2+} pero tienen diferentes propiedades eléctricas, biofísicas, cinéticas y farmacológicas (Bean, 1985; Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988).

De ambas corrientes se hablará más en profundidad en el capítulo siguiente de la introducción por ser objetivo de esta Tesis, y entre ellas, en particular del canal de calcio tipo T.

Corriente de Cloro

Los canales selectivos de Cl^- dan lugar a una corriente adicional de repolarización durante la fase de meseta. Estos canales pueden ser activados por proteína-quinasas, ATP, y aumento de Ca^{2+} intracelular (Walsh, 1991, Zygmunt y Gibbons, 1991, Matsura y Ehara 1992, Ackerman y Claphan , 1993). Esta corriente ha sido a veces nombrada como una segunda corriente transitoria de salida (I_{to2}).

Corriente hiperpolarizante I_f

Parece ser una de las corrientes implicadas en generar la actividad marcapaso (Difrancesco, 1990). El subíndice f proviene del ingles “funny”, divertido, por las inusuales propiedades de esta corriente. No es una corriente específica ya que depende de Na^+ y K^+ .

2.2.7. ALTERACIONES ELECTROFISIOLÓGICAS EN LA HIPERTROFIA CARDIACA

2.2.7.1. Duración del potencial de acción y corrientes de membrana

El cambio más llamativo que se ha descrito en asociación con la hipertrofia cardiaca es una prolongación del potencial de acción (Wickenden y cols., 1998), (figura 9). Este cambio está relacionado con el desarrollo de hipertrofia en sí mismo ya que se observó en distintas especies animales y se analizó en diferentes modelos de hipertrofia experimental, como en gato (Gelband y Bassett, 1973; Houser y cols., 1981) rata (Kohya y cols., 1988; Thollon y cols., 1989; Brooksby y cols., 1993; Cerbai y cols., 1994; Gómez y cols., 1997), cobayo (Nordin y cols., 1989; Ryder y cols., 1993; Davey

y cols., 1992), conejo (Bril y cols, 1991) e incluso en el humano (Coltart y Meldrum, 1970).

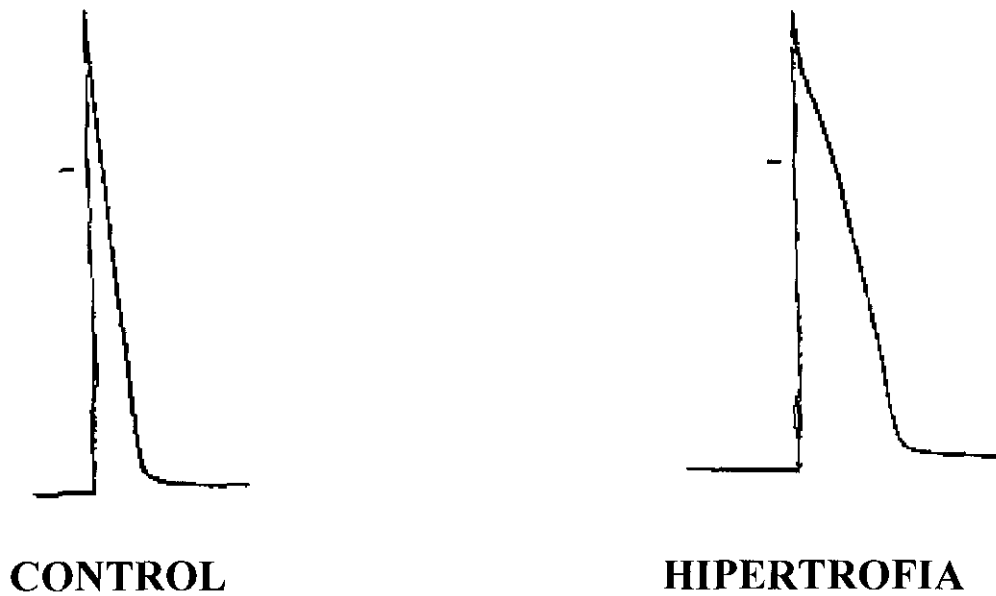


Figura 9. Comparación de dos potenciales de acción ventriculares registrados en una célula control y una célula hipertrófica de rata.

El aumento en la duración del potencial de acción se podría explicar bien por un aumento en las corrientes de entrada o bien por una reducción en las corrientes de salida o ambas cosas a la vez. Por tanto, desde finales de los años 80 hasta mediados de los 90 se publicaron numerosos estudios que comparaban las diferentes corrientes iónicas entre corazones controles e hipertróficos.

Aunque existen resultados contradictorios, la mayoría de los autores coinciden en no encontrar cambios significativos en la corriente de sodio en corazones hipertróficos (Kaufmann y cols., 1971; Bassett y Geldband, 1973; Rossner y Sachs, 1978; ; Gulch y cols., 1980; Hemwall y cols., 1984; Belichard y cols., 1989).

Por lo que respecta a la corriente I_{CaL} , ha sido ampliamente estudiada en diferentes modelos en miocitos aislados de corazones hipertróficos (Richard y cols., 1998). Parece que la amplitud de la corriente en miocitos hipertróficos es mayor que en miocitos controles, pero este aumento está relacionado con el aumento de la superficie celular, de tal manera, que al normalizar el pico de corriente por la capacitancia de membrana la densidad de corriente permanece inalterada. Existen discrepancias en cuanto a las variaciones en la corriente de calcio L en la hipertrofia, sin embargo, estas diferencias no se explican únicamente por los diferentes modelos usados ni las especies, sino también por la manipulación estadística de los datos, el grado de hipertrofia, las condiciones experimentales y la selección de las células a estudiar (Hart, 1994).

Respecto a la I_K , en uno de los primeros estudios relacionados con este campo, Kleiman y Houser, (1989), observaron una disminución de la corriente. Posteriormente, Ryder y cols., (1993), no apreciaron cambios significativos en la I_K en la hipertrofia y Brooskby y cols., (1993), también concluyeron que no es probable que las pequeñas alteraciones que ellos observaron, en su modelo, pudieran influir en la prolongación del potencial de acción.

Por otro lado la mayoría de los estudios apuntan a una reducción significativa de la corriente I_{to} . Xu y Best, (1991), observaron una disminución de la corriente en miocitos aislados de ratas con tumores secretores de la hormona del crecimiento. Cerbai y cols, (1994), también describieron una reducción de la I_{to} en miocitos procedentes de ratas espontáneamente hipertensas. Así mismo, Gómez y cols., (1997), también observaron esta disminución en corazones hipertróficos procedentes de ratas con estenosis aórtica abdominal. Beuckelmann y cols., (1993), encontraron esta corriente en células ventriculares humanas y también observaron una disminución de la I_{to} en pacientes con fallo cardiaco. Actualmente se acepta que la corriente principalmente implicada en el aumento de la duración del potencial de acción, asociado a la hipertrofia, es la I_{to} .

2.2.7.2. Incidencia de arritmias

2.2.7.2.1. *Arritmias cardiacas. Concepto y clasificación*

Las arritmias pueden surgir: a) por anomalías en la formación del impulso cardiaco (es decir, por fallo en el automatismo), b) por anomalías en la conducción del impulso o c) por una combinación de ambos. A partir de datos experimentales, se pueden deducir una serie de criterios que ayuden a identificar el origen electrofisiológico de la arritmia. Desafortunadamente, diferentes mecanismos celulares pueden compartir algunas características que los hagan difíciles de distinguir. Características como la terminación de la arritmia, así como su respuesta a diferentes agentes farmacológicos o estimulación eléctrica, se han usado comúnmente para distinguir los mecanismos celulares arritmogénicos.

A) Anormalidades en la formación del impulso

Las células del nodo senoauricular y aurículo-ventricular, así como el sistema His-Purkinje, poseen la propiedad de la automaticidad. Descargas eléctricas en forma de potenciales pueden originarse espontáneamente en estas células, en ausencia de un estímulo externo. La fase 4, o de lenta despolarización diastólica, va llevando al potencial de membrana hacia el umbral necesario para disparar un nuevo potencial de acción, y así sucesivamente.

La frecuencia de descarga de estas células está controlada por el sistema nervioso autónomo y es sensible a varias sustancias endógenas y agentes farmacológicos, así como a la estimulación eléctrica.

Muchas de las arritmias que más incidencia tienen en la población, se asocian a un **aumento de la actividad normal automática**. Un ejemplo típico son las taquicardias asociadas al ejercicio, la fiebre y la tirotoxicosis. Los ritmos acelerados auriculares y ventriculares se muestran de acuerdo a este aumento de actividad

automática, mientras que ritmos alterados en los ventrículos son probablemente resultado de un aumento de la actividad normal del sistema His-Purkinje. La ausencia de una supresión puede indicar que la arritmia es el resultado de otro mecanismo diferente a un aumento de la automaticidad, como la generación de actividad ectópica iniciada por despolarización de las células.

Las células ventriculares y auriculares no muestran actividad espontánea en condiciones normales. De todos modos **una actividad automática anormal** puede surgir como resultado de una despolarización de membrana a valores entorno los -60 y -10 mV. En la mayoría de los casos, estas despolarizaciones surgen en las células ventriculares en condiciones en las cuales la corriente de sodio está totalmente inactiva y el potencial de acción depende exclusivamente de las corrientes de entrada llevadas a cabo por los canales de calcio.

La **actividad desencadenada** o “triggered activity”, surge de las oscilaciones del potencial de membrana, que ocurren durante o inmediatamente después de un potencial de acción. Potenciales surgidos por esta actividad pueden ser fuente de nuevas respuestas de disparo y generar una actividad sostenida por sí misma.

Hay dos formas distintas de estas frecuencias desencadenadas: Las postdespolarizaciones tempranas, que ocurren en la fase 2 ó 3 del potencial de acción (EADs, early after despolarizations) y las postdespolarizaciones tardías que ocurren durante la fase diastólica (DADs, delayed after despolarizations). Un ejemplo de ellas se muestra en la figura 10.

- DADs: Surgen por una sobrecarga de Ca en el citosol, lo que inicia una corriente de entrada a través de canales no específicos dependientes de calcio. La inducción de estas DADs está asociada con causas que aumentan el calcio intracelular tales como catecolaminas, hipertrofia, isquemia, disminución del potasio extracelular o aumento del calcio extracelular.

Debido a que las DADs son sensibles a la estimulación simpática, su inducción varía mucho de unos pacientes a otros. Una vez que la actividad desencadenada se

inicia, hay normalmente una desaceleración progresiva que eventualmente puede generar la terminación espontánea de la arritmia.

-EADs: Son potenciales oscilatorios que surgen durante la fase de meseta o la fase inicial de repolarización. Ambos tipos de EADs pueden aparecer durante condiciones experimentales similares, pero difieren morfológicamente y farmacológicamente. Son el resultado de una disminución en la corriente de salida o un aumento de la corriente de entrada o ambas cosas a la vez.

Las corrientes envueltas en el mecanismo de generación de las EADs se pueden agrupar en dos tipos:

- a) Corrientes envueltas en la prolongación del potencial de acción. Puede ser debido a una reducción en las corrientes de salida o un aumento de las corrientes de entrada llevadas a cabo por Na y Ca. Es importante recordar que durante la meseta del potencial de acción la conductancia de membrana es muy baja y por tanto un pequeño cambio en la corriente neta puede derivar en un cambio significativo en el potencial de membrana y en consecuencia en EADs.
- b) Corrientes envueltas en la corriente neta de entrada. La corriente de entrada *que más probablemente está implicada en la generación de EADs es la corriente ventana de Ca*. Las corrientes ventana son corrientes estables que surgen en un rango estrecho de potenciales donde la activación y la inactivación se solapa y los canales pueden cambiar de estado conformacional fácilmente desde inactivo a cerrado y abierto. Luego los canales de calcio que se inactivaron durante el disparo del potencial de acción, pueden reabrirse en la repolarización del potencial de acción en el rango de potenciales de la corriente ventana.

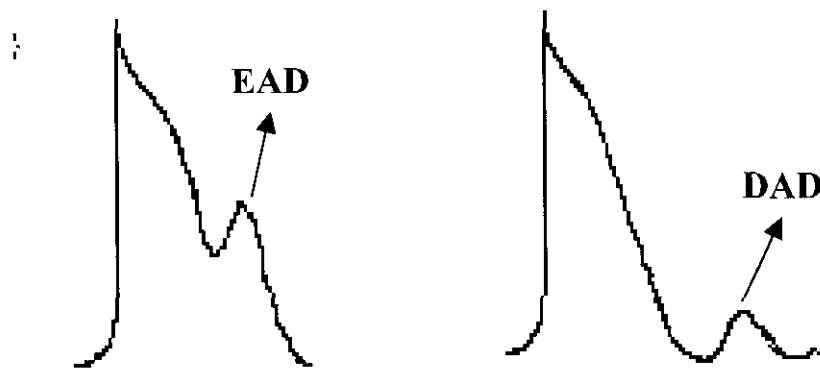


Figura 10. Ejemplo de una postdespolarización temprana (EAD) y una postdespolarización tardía (DAD).

B) Anormalidades en la conducción del impulso.

Reentradas

En condiciones normales un impulso sinusal muere tras la activación secuencial de las aurículas y de los ventrículos, ya que se queda rodeado por un tejido refractario que se acaba de excitar. La reentrada implica que el impulso no muere tras la activación completa del corazón, sino que persiste y es capaz de reexcitarlo dos o más veces.

Las condiciones necesarias para que ello suceda son: a) bloqueo unidireccional del impulso en algún lugar, b) propagación lenta del mismo por una vía alterna, c) excitación retardada del tejido distal al área de bloqueo, d) reexcitación por vía retrógrada del tejido proximal al lugar de bloqueo.

Así pues, para que exista reentrada es necesario que el tiempo que el impulso tarda en recorrer la vía alterna exceda la duración del periodo refractario más largo del circuito. Por tanto cualquier factor que acorte la duración del periodo refractario o retarde la velocidad de conducción facilitará la reentrada.

2.2.7.2.2. Mecanismos celulares de las arritmias descritas en la hipertrofia

Entre los mecanismos más comúnmente implicados en la generación de las arritmias en la hipertrofia, destacan una conducción más lenta del impulso por pérdida de células, fibrosis, y una aumento en la dispersión del periodo refractario (Pye y Cobbe, 1992; Aronson y Ming, 1993). Cambios en las corrientes de membrana también influyen y de hecho, son fundamentales en el inicio de las arritmias. El aumento de la duración del potencial de acción en sí aumenta el riesgo de despolarizaciones tempranas (January y Riddle, 1989). Así, cambios en la corriente I_{CaL} (Keung, 1989; Ryder y cols., 1991) y la aparición de la corriente I_{CaT} podrían aumentar la magnitud de la corriente de entrada al final de la fase de meseta e incrementar la probabilidad de estas despolarizaciones tempranas (Siri y cols., 1989; Xu y Best, 1990).

Postdespolarizaciones, tanto tempranas como tardías, también se ven favorecidas en modelos en los que la I_{K1} está disminuida. Las postdespolarizaciones tardías son más probables en la hipertrofia ya que la prolongación del potencial de acción disminuye la expulsión de calcio por el intercambiador Na^+-Ca^{2+} en la sístole, y esto junto con la menor capacidad de recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico en la hipertrofia, hace que la concentración de calcio en el interior celular permanezca alta durante mas tiempo (Gwathney y Morgan, 1985; Gwathney y cols., 1987; de la Bastie y cols., 1990; Bing y cols., 1991).

2.2.2.3. Contracción de los miocitos hipertróficos

Alguno de los cambios citados en las corrientes de membrana se traduce en cambios en el acoplamiento excitación-contracción (Balke y Shorofsky, 1998; Tombe, 1998). Durante la hipertrofia parece existir una disminución en la amplitud de la contracción, una mayor duración de la contracción y una reducción de la velocidad de contracción y relajación (Bailey y Houser, 1992). La prolongación de la fase de relajación en la hipertrofia parece estar relacionada con el aumento del transiente de Ca^{2+} (Gwathney y Morgan, 1985; Gwathney y cols, 1987; Bentigvegna y cols., 1991), el cuál es debido a la menor recaptación de Ca^{2+} por el retículo sarcoplásmico y la disminución de la actividad del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ (Hanf y cols., 1990).

2.3. CANALES DE CALCIO EN EL CORAZÓN

Los canales de calcio dependientes de voltaje pueden agruparse en, al menos, cinco tipos principales: T, L, N, P/Q y R (Hofmann y cols., 1994; Pérez-Reyes y Schneider, 1995; DeWaard y cols., 1996). Dichos canales se distinguen entre sí por su localización, su función, sus propiedades electrofisiológicas y biofísicas, su estructura y su farmacología. Mientras que en el sistema nervioso se encuentran distribuidos la mayoría de estos subtipos, en el corazón únicamente encontramos los canales de calcio tipo T y L.

Una primera clasificación de los canales de calcio dependientes de voltaje podría ser 1) Canales de bajo umbral (tipo T), que se activan e inactivan a potenciales de membrana cercanos al potencial de reposo, y 2) Canales de alto umbral (tipo L,N,P/Q y R) que requieren una despolarización significativa del potencial de membrana para su activación.

Los canales iónicos de membrana pueden explicarse como si fueran una clase de receptores, de tal manera, que deben poseer: 1) Sitios de unión específicos para fármacos agonistas y antagonistas, 2) Acoplamiento de la partícula efectora a estos sitios de unión, provocando la permeabilidad del canal y poniendo en funcionamiento el mecanismo de apertura y cierre del mismo, 3) Regulación homóloga y heteróloga y 4) Alteración de su expresión y función en situaciones de enfermedad. Estas características se cumplen ampliamente para el canal tipo L y también el canal tipo T se ajusta a ellas.

2.3.1 CANAL DE CALCIO TIPO L

El canal L se caracteriza por su cinética lenta, de ahí la L del inglés Long-lasting current. y de su gran conductancia. Bajo similares condiciones iónicas, la conductancia de este canal es alrededor de dos veces mayor que la conductancia para el canal T (16.0 pS vs 8.5 pS). En comparación con I_{Na} , I_{CaL} se activa a potenciales más despolarizados y su activación, inactivación y reactivación son más lentas. La corriente de calcio que entra por los canales de calcio tipo L juega un papel fundamental en el mantenimiento de la fase de meseta del potencial de acción y por otro lado es la

responsable del acoplamiento excitación-contracción. Es decir, acopla el fenómeno eléctrico de la despolarización celular a otra función de la célula cardíaca como es la *contracción*, puesto que los iones Ca^{2+} que entran por estos canales son capaces de inducir la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico (Fabiato, 1983; Hess, 1990; Katz, 1996; Gómez y cols, 1997). También, en las células marcapasos, esta corriente está relacionada con la lenta despolarización diastólica y la génesis del potencial de acción.

I_{CaL} depende del tiempo y el voltaje. La gráfica que define la dependencia de la corriente respecto al voltaje tiene forma de V (Trautwein, 1973; Isenberg y Klockner, 1982), empezándose a activar a potenciales de $-30/-20$ mV alcanzando un pico de corriente alrededor de $-10/0$ mV. Su potencial de reversión esta cercano a $+60$ mV, la constante de tiempo de activación ronda los 5-20 ms, y las constantes de tiempo de inactivación y reactivación están entre 30-300 ms. La activación en estado estacionario de esta corriente presenta una forma sigmoideal con un umbral de activación de -40 mV a -20 mV y una pendiente de orden 6-7 (Isenberg y Klockner, 1982). La dependencia de la disponibilidad de la corriente en función del potencial o inactivación en estado estacionario, también presenta una forma sigmoideal con potencial de semiinactivación entre -20 y -30 mV y una pendiente de orden -10 (Josephson y cols., 1984). Sin embargo, esta inactivación no es completa para potenciales mayores de -20 mV, debido en parte a la superposición de las curvas de activación e inactivación, también llamada *corriente ventana* (Trautwein y cols., 1975). De hecho, existen dos mecanismos de inactivación de la I_{CaL} : uno dependiente del potencial y otro dependiente del propio ion Ca^{2+} (Kohlhard y cols., 1975; Josephson y cols., 1984; McDonald y cols., 1986).

Estos canales dejan pasar otros iones divalentes como el Ba^{2+} y el Sr^{2+} y son bloqueados por Mn^{2+} , Co^{2+} , Cd^{2+} , Ni^{2+} y La^{2+} . Es característica de este canal, el aumento en la conductancia a más del doble así como, su enlentecimiento en la cinética de la corriente al sustituir el Ca^{2+} por el Ba^{2+} como ion transportador de corriente. La I_{CaL} se bloquea por fármacos antagonistas del calcio como las dihidropiridinas y además, son sensibles a los agonistas β , que producen un aumento de la corriente.

2.3.2. CANAL DE CALCIO TIPO T

2.3.2.1. Estructura

La estructura general de los canales de calcio corresponde a asociaciones heteroméricas de, por lo menos tres subunidades: α_1 , $\alpha_2\delta$, β y para músculo esquelético también γ . α_1 es la subunidad predominante, ella expresa los sitios de unión a fármacos y genera por sí misma el canal de calcio funcional. La topología de membrana de esta subunidad parece constar de cuatro dominios análogos, cada uno de ellos formado por 6 segmentos transmembranales (S1-S6), y una región entre S5 y S6 la cuál, junto con los segmentos S5 y S6 podría estar formando el poro del canal (figura 11). Además parece ser que el segmento S5 contiene un alto contenido de residuos cargados positivamente, y podría estar implicado en el componente sensor de carga del canal (Triggle, 1997).

La subunidad β parece que actúa fundamentalmente modificando las propiedades funcionales de la subunidad α_1 , aumentando su expresión, modificando su cinética de activación e inactivación, cambiando su dependencia del voltaje y alterando su sensibilidad a fármacos (DeWaard y cols., 1994; Gurnett y Campbell, 1996).

Los canales de calcio de bajo umbral están peor caracterizados (como es el canal T) debido a que no existían bloqueantes específicos del canal. Aún así la estructura general debe corresponder a la anteriormente descrita con ligeras variaciones.

Por otra parte, la caracterización molecular del canal T ha sido establecida muy recientemente por Pérez-Reyes y cols., (1998a). La secuencia está bastante bien conservada entre especies, en especial los residuos cargados están particularmente bien conservados. En la figura 11 se observa la estructura esquematizada para el canal de calcio. La secuencia el canal se puede encontrar en el último artículo publicado por Pérez-Reyes y cols., (1998b).

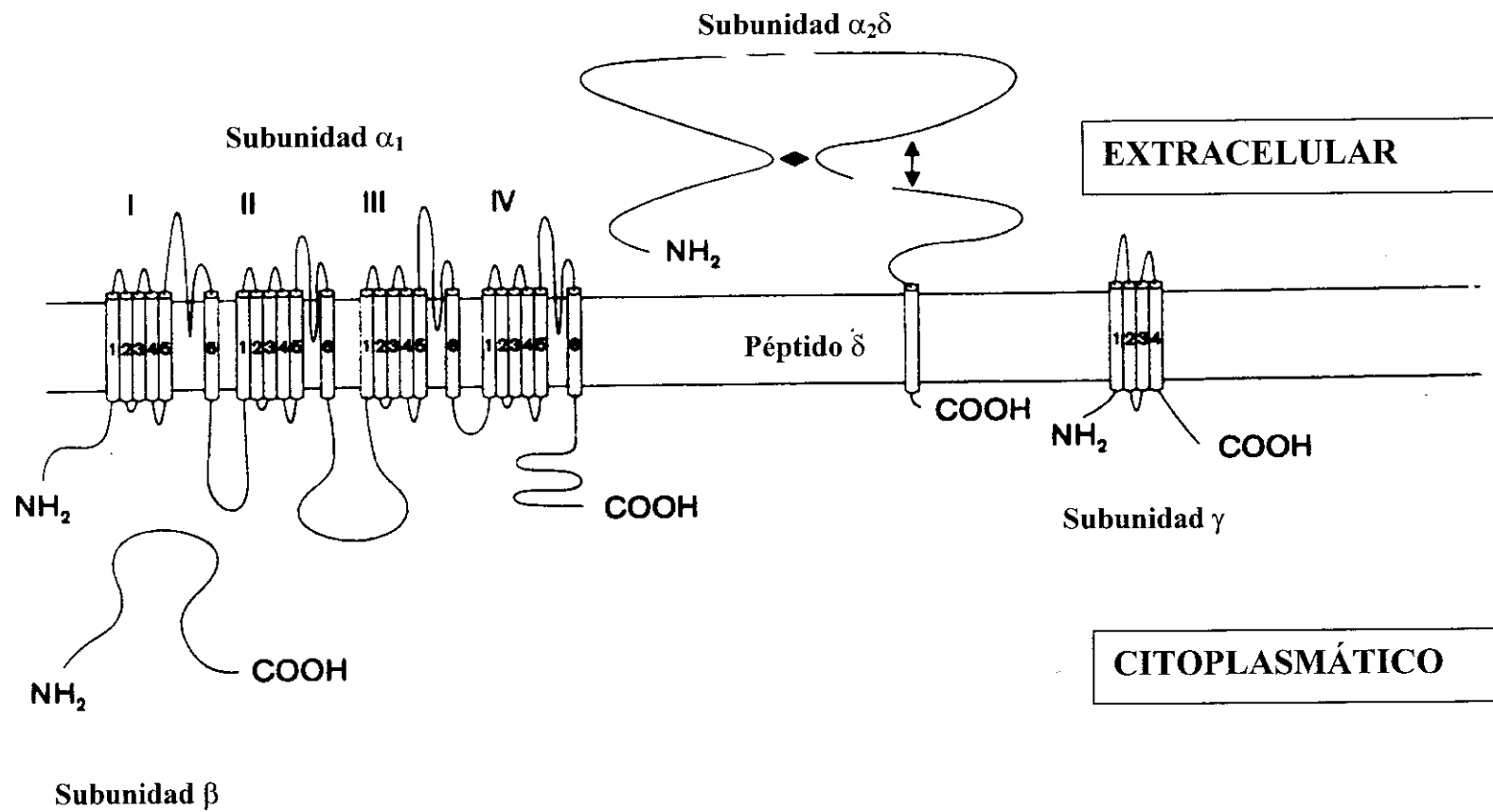


Figura 11. Estructura esquematizada de un canal de calcio y sus subunidades. Modificado de Triggle, (1997).

2.3.2.2. Propiedades cinéticas y características generales

La corriente de calcio tipo T se caracteriza por su bajo umbral de activación (-70 mV), su rápida inactivación y su requerimiento de un potencial de fijación de membrana negativo para su registro. Al contrario que la corriente de calcio tipo L, su cinética no se modifica cuando se sustituye el calcio por el bario como ion transportador de carga y es mucho menos sensible a las dihidropiridinas como el nitrendipino. Mediante estudios electrofisiológicos de canal único en células auriculares y de Purkinje de perro se ha podido observar que la conductancia unitaria de este canal esta alrededor de 7.5 pS usando 110 mM de Ba²⁺ comparada con los 20.6 pS del canal de calcio tipo L (Bean, 1985; Hagiwara y cols., 1988; Vassort y Alvarez, 1994).

La corriente de calcio tipo T muestra una cinética de activación e inactivación muy rápida que además es fuertemente dependientes de voltaje (Xu y Best, 1992). El pico máximo de corriente se muestra en torno a los -30 o -20 mV según los tejidos, en contraste con la corriente L que lo muestra alrededor de 0 mV, y su umbral de activación esta alrededor de -50 mV. Su potencial de reversión, debido a su especial relación corriente voltaje puede ser estimado entre 10 mV y 60 mV, sin mostrar corriente de salida a despolarizaciones más positivas (Hagiwara y cols., 1988; Hirano y cols., 1989; Kawano y DeHaan, 1989; ; Tseng y Boyden, 1989; ; Alvarez y Vassort, 1992; Balke y cols., 1992 Furukawa y cols., 1992). Por otro lado, otra propiedad característica de este canal está relacionada con las propiedades de apertura y cierre del canal, de manera que la corriente se activa e inactiva mas rápidamente a mediada que aumentamos el valor de despolarización (Fow y cols., 1987; Droogmans y Nilius, 1989; Chen y Hess, 1990; Balke y cols., 1992).

En la mayoría de las células cardiacas, el pico de I_{CaT} es aproximadamente una quinta parte del pico de corriente para I_{CaL} y por ello contribuye en muy baja medida al total de corriente de calcio y al flujo de entrada de calcio durante el potencial de acción. La densidad de la corriente T varía de unas especies a otras e incluso de unas zonas a otras el corazón. En células auriculares caninas en presencia de 5mM de Ca²⁺, el pico de corriente de I_{CaT} es de 24 ± 7 pA (Bean, 1985), es decir aproximadamente 0.34 pA/pF de densidad (Hagiwara y cols., 1988; Alvarez y Vassort, 1992). Este valor puede ser aun

menor en células ventriculares, mientras que en células automáticas puede estar por encima de 2 pA/pF (Hagiwara y cols., 1988; Bois y Lenfant, 1991; Kawano y DeHaan, 1991). Más aún, en corazones de embrión de pollo, se han descrito densidad de corriente de 4.2 pA/pF en comparación con 2.1 pA/pF para I_{CaL} (Kawano y DeHaan, 1989). Una mayor densidad de I_{CaT} que de I_{CaL} ha sido también observada en algunas células auriculares de rana (Alvarez y Vassort, 1992).

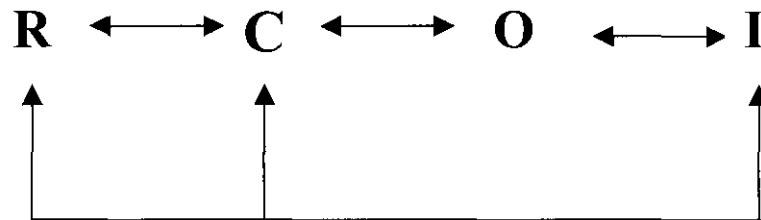
Mediante el estudio combinado de corrientes macroscópicas y unitarias, bajo condiciones similares a las condiciones fisiológicas, se ha estimado que la densidad de canales T en células ventriculares de cobayo es de 0.1-0.3 mm^{-2} , es decir alrededor de 1700 canales T por célula (Droogmans y Nilius, 1989; Balke y cols., 1992).

El curso temporal de la inactivación de la corriente T se desarrolla de una forma monoexponencial con una estricta dependencia de voltaje. La cinética de inactivación se caracteriza por ser independiente del paso de iones de Ca^{2+} a través del canal; las diferentes amplitudes de corriente T tras los cambios en los potenciales de fijación en la cinética de inactivación, tienen idénticos cursos de tiempo de corriente y son independientes del ion transportador de carga. El Ba^{2+} puede sustituir al Ca^{2+} sin alterar la cinética de inactivación. Esto junto al hecho de que varias concentraciones de calcio cambian el pico de amplitud pero no el tiempo de corriente, indica que la I_{CaT} presenta una inactivación no sensible al calcio (Bean, 1985; Hirano y cols., 1989; Tseng y Boyden, 1989; Alvarez y Vassort, 1992; Balke y cols., 1992).

Los estudios cinéticos que comparan la dependencia de voltaje de ambas corrientes de calcio T y L, ajustan los datos a una función de distribución de Boltzmann. Siguiendo este ajuste, la corriente T muestra una pendiente similar a la corriente L y su curva de inactivación está desplazada hacia la izquierda alrededor de 40 mV respecto a la corriente L con un V_{50} de -60 mV (Tseng y Boyden, 1989; Tygat y cols., 1990; Alvarez y Vassort, 1992; Balke y cols., 1992; Cohen y cols., 1992). La inactivación en estado estacionario es función del potencial de membrana y está marcadamente influenciada por la concentración de calcio extracelular (Hirano y cols., 1989) y por la temperatura, aunque la I_{CaT} parece ser mucho menos sensible a los cambios de temperatura que la I_{CaL} (Nobile y cols., 1990). La corriente ventana que se pone de manifiesto por el solapamiento de las curvas de activación e inactivación es

diferente para el canal T que para el canal L (Hagiwara y cols., 1989; Wu y Lipsius, 1990; Xu y Best, 1990; Bois y Lenfant, 1991; Fermini y Nathan, 1991).

Reuniendo los datos obtenidos por diferentes autores en el estudio cinético de la corriente T, respecto diferentes puntos de vista, se ha propuesto un modelo simple de 4 estados para explicar la cinética de apertura y cierre del canal:



Donde R, representa el estado de reposo, C el estado cerrado, O el estado abierto e I el estado inactivo del canal. El paso directo entre I y C o R podría explicar porque el fenomeno de facilitación no ha sido observado en el estudio de la corriente T (Vassort y Alvarez, 1994).

Tabla 4. Comparación entre las propiedades iónicas de los canales T y L.

Propiedades	T	L
Conductancia (pS)	7-10	11-25
Activación	Baja (>-70)	Alta (>-30)
Inactivación	Rápida	Lenta
Inactivación por Ca	No	Si
Inactivación dependiente de Voltaje	Si	Si
Permeabilidad	Ca=Ba	Ba>Ca

2.3.2.3. Efecto de los iones divalentes sobre la I_{CaT}

Muchos iones divalentes son capaces de disminuir e incluso bloquear ambas corrientes de calcio. Algunos muestran un efecto mayor sobre un canal que sobre el otro, siendo utilizada esta propiedad para diferenciar la corriente L de la corriente T, (siempre teniendo en cuenta que no son perfectamente selectivos por ninguno de los dos canales). Así el níquel, parece ser mucho más efectivo que el cadmio, inhibiendo la I_{CaT} (Nilius y cols., 1985; Mitra y Morad, 1986; Bonvallet, 1987; Hagiwara y cols., 1988) y viceversa, el cadmio bloquea más eficientemente el canal L que el Ni^{2+} (Alvarez y Vassort, 1992). De manera similar, el Magnesio, (Bonvallet, 1987; Lipsius, 1990), reduce más la corriente T, pero el gadolinio, inhibe I_{CaT} aproximadamente diez veces menos que I_{CaL} . (Tygatt y cols., 1991). Estas propiedades parecen ser comunes para I_{CaT} en todas las células cardíacas investigadas hasta el momento.

La sustitución del Ca^{2+} por el Ba^{2+} aumenta muy significativamente la corriente L y además retrasa marcadamente su inactivación. En cambio, como se ha comentado anteriormente, esta sustitución de iones no afecta a la corriente T.

Otros estudios dedicados a ver el efecto de los cambios en la concentración de protones, han descrito que un aumento en la concentración externa de protones produce una disminución de ambas corrientes I_{CaT} e I_{CaL} , mientras que la alcalinización los aumenta. De todas formas, alteraciones en el pH interno no tienen efecto sobre I_{CaT} (Tygat y cols., 1990b). Los cambios en I_{CaT} son atribuidos a: a) cambios en la conductancia unitaria y la probabilidad del canal de encontrarse en su estado abierto; y b) la tritización de las cargas negativas de la superficie, que afecta tanto a la activación como a la inactivación del canal.

2.3.3. IMPORTANCIA FISIOLÓGICA DE LA CORRIENTE DE CALCIO TIPO T

Con el paso del tiempo el canal T cardiaco ha ido adquiriendo mayor importancia y un mayor número de artículos se han ido publicando estudiando sus propiedades y función, pero a pesar de todo debido a su pequeña amplitud y su solapamiento con otras corrientes, sus implicaciones fisiológicas aún no están muy bien definidas.

2.3.3.1. Acoplamiento excitación-contracción

En el tejido cardiaco, también se ha sugerido la participación del canal T en la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, como parte del acoplamiento excitación-contracción (Morad y Cleeman, 1987). De todos modos, la cantidad de calcio entrante via los canales de calcio T parece ser insuficiente para inducir la liberación de Ca^{2+} desde el retículo sarcoplásmico, y esta función es mayormente atribuida a la activación de la corriente L (Sipido y cols., 1998).

El papel de la corriente T en el acoplamiento estímulo-secreción, parece estar mucho más clara. La secreción de aldosterona por la médula adrenal es poco sensible a pequeños cambios en la concentración de K plasmático, probablemente debido al flujo de entrada de calcio mantenido a través de los canales de calcio tipo T, cuya inactivación no es completa a las pequeñas despolarizaciones del potencial de membrana, por la presencia de esa corriente ventana ya mencionada (Cohen y cols.,

1988; Fox y cols., 1987). Los canales T también parecen estar implicados en la secreción de lactotrofinas por la glándula pituitaria (DeRiemer y Sackmann, 1986). De manera similar, Ertel y cols., (1997), han sugerido que los canales T podrían estar implicados en la secreción de catecolaminas desde las células de médula adrenal, y que este proceso está aumentado en ratas espontáneamente hipertensas, en donde se ha descrito una mayor densidad de canales T.

2.3.3.2. Actividad rítmica

Los canales de calcio tipo T se han caracterizado por su rápida activación e inactivación y su bajo umbral. La relación con el voltaje en estado estacionario para la activación e inactivación está desplazado hacia potenciales más negativos con respecto a la corriente L. Esta última propiedad hace que esta corriente pueda participar en la actividad marcapasos del corazón. Tanto una disminución de la corriente repolarizadora de salida como un aumento de las corrientes despolarizadoras de entrada, controlan la fase de lenta despolarización diastólica, la cuál ocurre entre los -80 y -40 mV. En este rango de potencial, I_{CaT} es una buena candidata para proporcionar parte de las cargas de entrada.

En el tejido cardiaco, el papel de I_{CaT} ha sido ya demostrado en células nodales de conejo y en células de Purkinje (Bean, 1985; Hagiwara y cols., 1988; Doerr y cols., 1989), aunque hay autores como Hirano y cols., (1989), que consideran que el rango de activación de I_{CaT} podría ser demasiado positivo para tener un papel determinante en la actividad marcapasos. De todas maneras cabe destacar que, las células marcapasos o células que muestran automatismo, suelen presentar una mayor densidad de I_{CaT} (Pelzer y cols., 1992). Tratamientos con Ni^{2+} , que reduce más I_{CaT} que I_{CaL} han demostrado que producen una inhibición de la fase de lenta despolarización diastólica y por tanto un enlentecimiento de la actividad marcapasos en células automáticas (Escande y cols., 1987; Hagiwara y cols., 1988; Wu y Lipsius, 1990), lo que corrobora el papel de I_{CaT} en este sentido (figura 12).

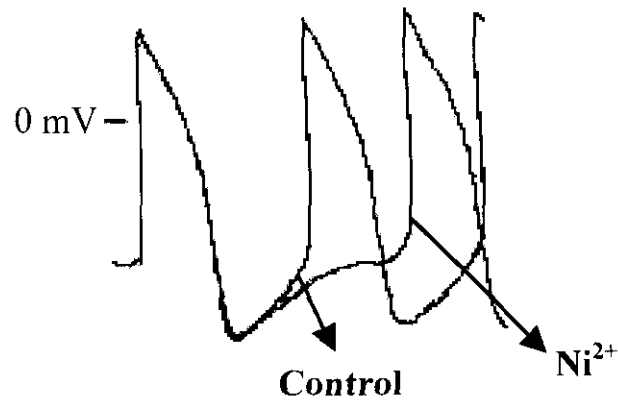


Figura 12. Efecto del Ni^{2+} sobre la fase de lenta despolarización diastólica del potencial de acción en una célula del nodo senoauricular de conejo. Modificado de Hagiwara y cols., (1988).

En condiciones normales, en células ventriculares y auriculares, I_{CaT} tiene una función menos clara en la actividad eléctrica cardíaca. La corriente de Na , de mayor amplitud, que se activa a potenciales similares junto con la corriente I_{CaL} con una inactivación más lenta, son las que aparentemente actúan en el mantenimiento del potencial de acción. Aún así, estudios realizados con Ni^{2+} y nifedipino han revelado que existe corriente T durante la fase temprana del potencial de acción (Arreola y cols., 1991).

En condiciones como la la isquemia, en que las células están parcialmente despolarizadas, la corriente de I_{Na} está marcadamente inactivada, más que I_{CaT} cuya curva de inactivación está 10 mV menos hiperpolarizada. En este caso, I_{CaT} podría facilitar la actividad a potenciales relativamente menos negativos.

Por otro lado, debido a la dependencia de voltaje de esta corriente T, podría hacerla participe en varios tipos de arritmias como las postdespolarizaciones tardías (DADs) y las postdespolarizaciones tempranas (EADs). Esto está relacionado con la corriente ventana que se obtiene en el solapamiento de la activación e inactivación en estado estacionario de la corriente T, que fluye a potenciales de unos 35 mV más negativos que para la corriente L, y por tanto proporciona una corriente sostenida que facilitaría la aparición de este tipo de arritmias (Vassort y Alvarez, 1994; Ertel y cols, 1997; Triggle 1997).

2.3.3.3. Crecimiento y desarrollo

Los canales de calcio tipo T parecen estar íntimamente relacionados con los procesos de crecimiento celular tanto en condiciones fisiológicas como patofisiológicas. La corriente T es abundante en el corazón fetal (Baily y Houser, 1992) y en un estudio sobre los cambios postnatales en las corrientes de calcio se ha visto que la densidad de corriente L no varía de las tres a las catorce semanas, mientras que la corriente T muestra un pico de densidad a las 5 semanas tras el nacimiento, momento en el que se está produciendo la máxima velocidad de crecimiento del cuerpo entero y del corazón (Beam y Knudson, 1988; Shimara y Bournmaud, 1991), y luego tiende a disminuir llegando incluso a desaparecer (Xu y Best, 1992). Esto indica que la expresión de los canales T está controlado por mecanismos endógenos más que por inervación motora.

Esta expresión transitoria de los canales T en las células en desarrollo, o al menos su reducción en células adultas, apoya la relación del canal T con el desarrollo y el crecimiento. Como se ha comentado anteriormente, I_{CaT} se expresa de manera transitoria entre los 5 y 15 días, período de tiempo en el cual las células están proliferando y tienen pérdidas transitorias de contractilidad. La corriente de calcio L permanece constante durante este período de tiempo. La disminución en la corriente T se atribuye mayoritariamente a cambios en la densidad de canales sin alteraciones en la conductancia del canal o su mecanismo de apertura y cierre (Xu y Best, 1992).

Apoyando estos hallazgos también se encuentra el hecho de que I_{CaT} aumenta bajo la influencia de factores que estimulan el crecimiento de los miocitos. En ratas adultas con tumores secretores de hormona de crecimiento, se ha visto un aumento de hasta tres veces en la densidad de corriente T respecto a los animales controles, sin cambios en sus propiedades cinéticas (Xu y Best, 1990). La densidad de corriente T también se ha visto aumentada significativamente en miocitos ventriculares procedentes de hámster con cardiomiopatía, mientras que no se encontró diferencia en la función de los canales L (Sen y Smith, 1994). La endotelina-1 aumenta la entrada de calcio a través de los canales T en miocitos ventriculares de rata neonatal (Furukawa y cols., 1992).

Para terminar, se ha publicado que la corriente de calcio tipo T está también asociada a procesos de hipertrofia por sobrepresión ya que células ventriculares de gato adulto que en condiciones normales no expresan canal T, cuando proceden de corazones hipertróficos sí presentan esta corriente (Nuss y Houser, 1993). Esto implica una mayor entrada de calcio que podría inducir una sobrecarga que diera lugar a arritmias y necrosis celular, procesos asociados a la patología hipertrófica.

2.3.4. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA

Aunque la farmacología del canal de calcio tipo L está muy bien investigada, en su mayor parte debido a la importancia terapéutica de los antagonistas de este canal, no existe una literatura clara de la farmacología del canal de calcio tipo T.

2.3.4.1 Antagonistas del calcio

Los fármacos clásicos antagonistas del calcio pertenecen a tres clases químicas fundamentalmente (Vanhoutte, 1987): 1) Dihidropiridinas (nifedipina, amlodipina, etc), 2) Fenilalquilaminas (Verapamil) y 3) Benzotiazepinas (Diltiazem). La eficacia de los fármacos varía de un grupo a otro, al igual que los efectos secundarios observados para cada uno. Las dihidropiridinas, potentes vasodilatadores, tienden a producir taquicardia refleja, dolor de cabeza y edema en las extremidades inferiores. Los compuestos no dihidropiridínicos, tienden a producir inotropía negativa y no pueden usarse en

pacientes que tengan comprometida la función miocárdica (Chew y cols., 1981; Packer y cols., 1987). Todos estos problemas han motivado la búsqueda de nuevos antagonistas de calcio con un modo de acción diferente y sin estos efectos secundarios.

Un antagonista de calcio óptimo debería cumplir las siguientes propiedades: a) producir vasodilatación sin producir una taquicardia refleja, b) disminuir levemente el ritmo cardiaco, c) no desarrollar inotropía negativa, d) provocar el mínimo de efectos secundarios y e) presentar una farmacocinética adecuada. Todo esto dio lugar a una serie de test llevados a cabo por F. Hoffmann-La Roche, que finalizaron con el descubrimiento en 1986 del Mibefradilo (Clozel y cols., 1997).

2.3.4.1.1. Dihidropiridinas

A pesar de que inicialmente distintos artículos describieron una ausencia de sensibilidad a los efectos agonistas y antagonistas de las dihidropiridinas, tanto en tejido cardiaco como en otros tejidos, varios artículos más recientes han demostrado que sí que existe una inhibición de I_{CaT} usando concentraciones similares o un poco mayores que las utilizadas para inhibir I_{CaL} (Yaari y cols., 1987; Akaike y cols., 1989; Loirand y cols., 1989; Tseng y Boyden, 1989; Kuga y cols., 1990; ; Alvarez y Vassort, 1992; Cohen y cols., 1992; Rubio y cols., 1993). Hasta la fecha, solo un estudio ha descrito un aumento de I_{CaT} con Bay K, una dihidropiridina agonista de calcio, pero en menor medida que el aumento ejercido sobre la corriente I_{CaL} (Alvarez y Vassort, 1992). Se ha establecido que la interacción fármaco-receptor es aproximadamente de 1:1, la misma observada para el amiloride, compuesto que se ha visto que reduce la corriente I_{CaT} (Tygat y cols., 1990). El valor de la IC_{50} está en el rango de micromolar para las dihidropiridinas pero varía marcadamente de unos compuestos a otros.

2.3.4.1.2. Mibefradilo

El mibefradilo es un fármaco que se presentó como un antagonista selectivo de los canales de calcio tipo T, con una mayor selectividad vascular que cardiaca. El bloqueo efectivo de los canales de calcio tipo T hace que nos sea más fácil reconocer el papel de este tipo de canales en el sistema cardiovascular. Así el mibefradilo produce

vasodilatación con acciones inhibitorias adicionales sobre la pared de los vasos sanguíneos, y el grosor del ventrículo izquierdo. Las características de un bloqueo selectivo de los canales de calcio tipo T incluyen una selectividad vascular, la ausencia de un efecto inotrópico negativo y la reducción de la proliferación subendotelial. El mibefradilo produce además, un aumento del flujo coronario sin aumentar el consumo de oxígeno miocárdico y mejorando la perfusión subendocárdica.

Respecto a su estructura química, el mibefradilo es un nuevo bloqueante de los canales de calcio que no pertenece a ninguno de los grupos anteriormente mencionados (Osterrier y Holck, 1989). Se diferencia tanto en su estructura química y sus propiedades farmacológicas, como por su mecanismo de acción.

Es un derivado del tetrazol. Su estructura es 1S,2S-2-[(3-benzimidazol-2il-propil)-metilamino]-etil-6-fluoroisopropil-1,2,3,4,-trehidronaftalen-2-il-ester-hidroclorato (1:2), el cuál funciona como un enantiómero solo (Clozel y cols., 1996). Su peso molecular es de 568.56, es estable químicamente e insensible a la luz. Su pKa para el grupo benzoimidazol es de 4.8 y para la amina terciaria de 5.5. Se trata de un polvo blanco con sabor amargo, inodoro y soluble en agua (Noll y Lüscher, 1998).

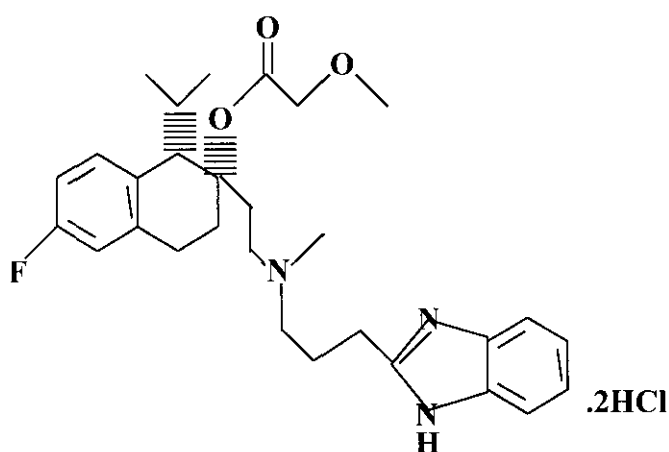


Figura 13. Estructura química del mibefradilo.

Principales propiedades farmacológicas

En contraste con el verapamil, el mibefradilo es bastante selectivo para la vasculatura y mucho más potente relajando el músculo liso vascular que el músculo cardíaco o esquelético (Taira, 1987; Osterrier y Holck, 1989). La afinidad del mibefradilo para el músculo liso vascular también varía según la naturaleza del músculo, así sus efectos son más pronunciados en las arterias coronarias que en el íleon (Bian y Hermsmeyer, 1993). Esta selectividad por las arterias coronarias podría explicar la baja incidencia de efectos secundarios, relacionados con la relajación del músculo liso periférico, observados tras un tratamiento con mibefradilo (Lacourciere y cols., 1997).

El mibefradilo aumenta el flujo coronario en una amplia variedad de modelos como cobayo (Osterrier y Holck, 1989), perros (Clozel y cols., 1989; Orito y cols., 1993) y ratas (Hefti y cols., 1990). Utilizando la técnica de Langerdorff, se ha descrito que el mibefradilo causa un aumento del flujo coronario de más del 84%, de manera concentración dependiente (Clozel y cols., 1990). Un efecto dilatador potente también se ha observado en perros conscientes, aumentando el flujo coronario hasta un 103% (Karila-Cohen y cols., 1996). Además el mibefradilo, tiene un efecto protector de las arterias coronarias epicárdicas por una vasoconstricción inducida mediante la ergonovina, test utilizado para predecir la enfermedad coronaria espástica en el humano (Waters y cols., 1961). Este efecto dilatador sobre las coronarias del mibefradilo es parcialmente independiente del endotelio (30%), hecho importante si tenemos en cuenta que la mayoría de los pacientes tratados con antagonistas de calcio también presentan una disfunción endotelial.

Aún así, al igual que los clásicos antagonistas de calcio, el mibefradilo también interfiere con las respuestas dependientes de endotelio y disminuye las contracciones provocadas por varios estímulos (Boulanger y cols., 1994a). Mibefradilo, también produce una relajación dependiente de endotelio mediante un aumento de la liberación de factores relajantes derivados de endotelio (Boulanger y cols., 1994b).

Aunque el mibefradilo actúa de manera semejante a las dihidropiridinas en cuanto a su efecto vasodilatador, no produce el reflejo baroceptor de estas últimas, y como consecuencia no induce taquicardia. En la rata consciente, el mibefradilo moderadamente disminuye el ritmo cardiaco de manera comparable al verapamil o al diltiazem (Veniant y cols., 1991).

En humanos, el mibefradilo también disminuye el ritmo cardiaco de manera dosis dependiente, produciéndose una caída de unas 6-10 pulsaciones/min, con la dosis de 100 mg en pacientes hipertensos. Existe una correlación bastante buena entre este efecto y la dosis administrada (Schmitt y cols., 1992; Bermink y cols., 1996).

A pesar de su potente efecto vasodilatador, el mibefradilo no produce un efecto inotrópico negativo, excepto a concentraciones muy altas, (10 veces mayores que las utilizadas para su efecto máximo dilatador coronario). Esta observación ha sido realizada en varios modelos animales como ratas, cobayos perros y conejos (Osterrier y Holck, 1989; Clozel y cols., 1990; Ezzaher y cols., 1991). En ningún caso hay señal de disminución en la contracción, excepto esa pequeña disminución del ritmo cardiaco antes descrita.

Estos resultados han sido confirmados en humanos. El mibefradilo actúa como un potente vasodilatador y disminuye el ritmo cardiaco pero sin disminuir la contractilidad. Esto ha sido observado tanto en voluntarios normales (Schmitt y cols., 1989), como en pacientes hipertensos (Schmitt y cols., 1992) o en pacientes con angina de pecho (Portegies y cols., 1991; Rosseau y cols., 1996). Dosis de 200 mg (dos veces mayor que la dosis terapéutica recomendada) no está asociada con efectos inotrópicos negativos ni con una disminución en el volumen de eyección ventricular izquierdo.

El tratamiento de la hipertensión con antagonistas del calcio, en particular con dihidropiridinas, estimula los sistemas simpático y renina-angiotensina (Bellet y cols., 1987; Lindqvist y cols., 1994). El aumento de los niveles plasmáticos de catecolaminas, renina y aldosterona se opone a su acción antihipertensiva. Con el mibefradilo, dicha estimulación neurohormonal no existe o es mínima (Bühler, 1997). Incluso en modelos *in vitro*, el mibefradilo parece inhibir la secreción de hormonas como la aldosterona (Barrett y cols., 1997; Rossier y cols., 1997).

Esta ausencia de estimulación neurohormonal también ha sido observada en humanos, en donde no se han visto cambios significativos en los niveles de catecolaminas y aldosterona circulantes (Muntinga y cols., 1996). Esto contrasta con los tratamientos de larga duración con dihidropiridinas, donde existe una elevación de los niveles plasmáticos de dichas hormonas (Lindqvist y cols., 1994).

Mecanismo de acción

De forma opuesta a como se comportan los clásicos antagonistas de calcio, el bloqueo del mibefradilo es preferentemente sobre los canales de calcio tipo T, aunque en los últimos años también se ha descrito un bloqueo sobre los canales de calcio tipo L (Lacinova y cols., 1995; Abernethy, 1997; Sarsero y cols., 1998; Karam y cols., 1999; Mocanu y cols., 1999; Parent de Curzon y cols., 2000). Aun así, parece ser unas 10-30 veces más selectivo por el canal T que por el L (Mishra y Hermsmeyer., 1994), tanto en vasos como en el corazón (Bernadeu y Ertel., 1997; Mangoni y cols., 1997). En neuronas de hipocampo de rata también se ha visto que es selectivo sobre el canal T, pero como es un fármaco que no atraviesa la barrera hematoencefálica no se consideran sus acciones neurológicas.

A nivel cardiaco el canal T se encuentra, en condiciones normales, en las células nodales con función marcapasos y no está presente en células ventriculares. Debido a que las células nodales son las encargadas de mantener el ritmo cardiaco y los miocitos ventriculares se encargan más de mantener la contractilidad del corazón, el bloqueo de los canales de calcio tipo T lleva a una dilatación de las arterias coronarias y disminución del ritmo cardiaco sin cardiodepresión asociada (Clozel y cols., 1997).

Por otro lado el bloqueo del canal T del sistema endocrino por mibefradilo, explica la reducida estimulación neurohormonal observada con este fármaco (Ertel y cols., 1997). El bloqueo de la inducción de la entrada de calcio mediante estimulación hormonal vía canales dependientes de receptor, también se ha propuesto como mecanismo de acción alternativo (Cheglakov y cols., 1997).

Otro efecto del mibefradilo, en células de músculo vascular, parece ser mediado a través de la PKC, lo que parece estar relacionado con una liberación de Ca^{2+} sostenida, especialmente asociada a la inhibición el crecimiento y de la remodelación vascular (Mishra y Hermsmeyer, 1994b; Hermsmeyer y Miyagawa, 1996; Hermsmeyer 1998).

Como no ha sido hasta muy recientemente, que el canal T ha sido clonado, poco o nada se sabe sobre el sitio de unión del mibefradilo al canal de calcio tipo T. En cambio, actualmente se conoce que el mibefradilo se une al canal de calcio tipo L por un sitio de unión diferente a aquellos descritos para fenilquilaminas, dihidropiridinas o benzotiazepinas (Mishra y Hermsmeyer, 1994a; Rutledge y Triggle, 1995; Clozel y cols., 1997; Noll y Lüscher, 1998).

La dependencia de voltaje y de frecuencia del bloqueo por mibefradilo, tanto para el canal T como para el L, ha sido estudiada en células auriculares de cobayo (Liang-min y Osterrier, 1991; Bernardeu y Ertel., 1997) y miocitos cultivados neonatales (Misra y Hermsmeyer, 1994). Estos estudios sugieren que el mibefradilo se une preferentemente a un estado abierto del canal. En miocitos de cobayo, se ha visto que el bloqueo del canal L es fuertemente dependiente de voltaje, siendo más potente cuando las células se mantienen a un potencial de -50 mV que de -80 mV (Liang-min y Ostierrier, 1991).

Al ser un fármaco que parece ser más potente a potenciales menos electronegativos, tiene un efecto limitado en células miocárdicas (potencial de reposo alrededor de -80 mV) comparado con las células vasculares (potencial de reposo alrededor de -50 mV), y así explicar el cuadro farmacológico favorable que presenta el mibefradilo, como un potente vasodilatador sin presentar un efecto inotrópico negativo (Clozel y cols., 1997).

Posibles usos clínicos

A) Hipertensión

Las propiedades antihipertensivas del mibefradilo, derivadas de su potente efecto vasodilatador, han sido demostradas en modelos de ratas hipertensas, ratas espontáneamente hipertensas, ratas con hipertensión renal y ratas Doca, con una dieta rica en sal (Hefti y cols., 1990; Ménard y cols., 1997). En todos ellos, el mibefradilo resulta más potente que cualquier otro antagonista de calcio. Ensayos en humanos también han sido realizados demostrando igualmente su mayor efecto frente a fármacos como el diltiazem, nifedipino o amlodipino (Massie, 1997). Además, presenta un menor cuadro de efectos secundarios (Waeber, 1998).

B) Angina de pecho y procesos isquémicos

En varios modelos experimentales, ya se ha descrito el potente efecto antiisquémico del mibefradilo, caracterizado por una mejora de la circulación coronaria y de la función contráctil en la región isquémica sin alterar el funcionamiento ventricular (Clozel y cols., 1989; Guth, 1992; Bilman, 1992; Roux y cols., 1996). El mibefradilo inhibe la entrada de calcio en los miocitos isquémicos sin alterar la conducción y la contracción cardíaca. Esto se podría explicar, por el bloqueo ejercido por el mibefradilo en la entrada de calcio en células despolarizadas. Como consecuencia de que el tejido isquémico está despolarizado, el mibefradilo puede ejercer una acción selectiva para esta región con mínimos efectos cardiodepresivos (Janse y Kleber, 1981).

En estudios clínicos en pacientes con angina de pecho, el mibefradilo tiene un efecto probado antianginal y antiisquémico (Portegies y cols., 1991; Bakx y cols., 1995). La mejora en la función contráctil en estos pacientes, es el resultado de una *disminución de la presión arterial y el ritmo cardíaco, que a su vez son los principales determinantes de la demanda miocárdica de oxígeno y la mejora de la circulación coronaria.* La acción del mibefradilo en estos casos depende de la dosis utilizada, y no produce tolerancia (Massie, 1997), por lo que parece ser mejor tratamiento que el realizado con amlodipino o diltiazem (Kobrin y cols., 1998).

C) Infarto de miocardio e insuficiencia cardíaca

El uso de los antagonistas del calcio en infarto de miocardio está muy limitado debido al efecto inotrópico negativo que producen, lo cuál es un importante inconveniente, particularmente, si la función miocárdica está previamente deprimida. El mibefradilo no muestra este efecto sobre el inotropismo, incluso en modelos animales con la función cardíaca comprometida, parece que la supervivencia la prolonga de una forma semejante a los IECA. Cabe destacar también , que el mibefradilo produce una disminución marcada de la masa ventricular y de la densidad de colágeno (fibrosis), aunque un poco menos marcada que tras el tratamiento con IECAs (Mulder y cols., 1998; Mulder y cols., 1997). Se ha propuesto, que es precisamente ese bloqueo selectivo sobre los canales de calcio tipo T, lo que contribuye a su diferente cuadro farmacológico con respecto a otros antagonistas de calcio (Elkayam, 1998; Mulder y cols., 1998;). Es posible que el efecto beneficioso del mibefradilo, sea parcialmente independiente de la vía hemodinámica y actúe directamente al nivel de corazón, a través de la prevención de la hipertrofia cardíaca por bloqueo de los canales (Xu y Best, 1990; Nuss y Houser, 1993) y mediar la respuesta frente a señales hipertróficas (Furukawa y cols., 1992; Wang y cols., 1993)), y/o la prevención de arritmias (Mulder y cols., 1998).

D) Efecto antiproliferativo

La hipertensión está asociada al remodelaje cardíaco caracterizado por hipertrofia, disminución de la reserva coronaria y fibrosis. El mibefradilo alivia estos síntomas en varios modelos de hipertensión, bajando la presión arterial (Karam y cols., 1996; Vacher y cols., 1996; Veniant y cols., 1995) y previniendo el crecimiento anómalo de los tejidos dañados asociado al desarrollo de arterioesclerosis.

En ratas hipertensas tratadas con mibefradilo, la reversión de la hipertrofia y la fibrosis parece estar relacionado con una acción directa sobre el crecimiento del miocito y del fibroblasto (Karam y cols., 1996). Además, el mibefradilo previene la infiltración de monocitos en el subendotelio de la aorta (Gray y cols., 1993) y reduce la formación de neointima después de una lesión vascular (Schmitt y cols., 1995). Los IECAs también disminuyen la formación de neointima, pero mediante un mecanismo de acción diferente (Schmitt y cols., 1996). La inhibición del ECA parece inhibir la migración de

celular de músculo liso vascular de la media a la neointima, mientras que el mibefradilo inhibe la proliferación celular (Fingerle y cols., 1995). Los antagonistas de calcio clásicos tampoco previenen la formación de la neointima a dosis que genera una caída similar en los niveles de presión arterial (Nyborg y Mulvany, 1985; Schmitt y cols., 1995). Por todo ello, los efectos antiproliferativos del mibefradilo parecen ser debidos fundamentalmente a su bloqueo específico sobre los canales de calcio tipo T (Ertel y cols., 1997).

E) Efectos adversos

Después de su lanzamiento como agente antihipertensivo y antianginoso en 1997, se dieron a conocer serias interacciones farmacocinéticas y farmacodinámicas con otros fármacos, que normalmente se administran a pacientes con enfermedades cardiovasculares. A pesar de que se hicieron las modificaciones apropiadas en la prescripción y el prospecto del mibefradilo, las interacciones continuaron ocurriendo, de manera que el fármaco fue retirado del mercado definitivamente en 1998, después de un estudio realizado en pacientes con insuficiencia cardíaca congestiva donde se describía un aumento de la mortalidad en los pacientes tratados con mibefradilo (Mullins y cols., 1998). Este aumento en la mortalidad, era debido a la interacción con otros fármacos. Si echamos la vista atrás, se podría concluir, que varias de estas interacciones se podrían haber predicho basándose en datos previos a su puesta en el mercado, pero debido a los numerosos aspectos beneficiosos que presentaba no se le dio más importancia a los riesgos. Todo este asunto hizo pensar que antes de poner en el mercado un fármaco, es necesario un exhaustivo conocimiento de las interacciones farmacológicas durante la fase III del ensayo clínico y que un fármaco con alto potencial de interacción representa un riesgo aunque se incluya una advertencia adecuada en la información del producto (Krayenbuhl y cols., 1999).

Actualmente se han visto interacciones del mibefradilo con fármacos como el verapamil (Cleophas y cols., 1999), β -bloqueantes (Rogers y Propic, 1998), digoxina y amiodarona (Levine y cols., 2000), diltiazem y estatinas (Schmassmann D y cols., 1998; Wombolt y cols., 1999), especialmente en pacientes de edad avanzada. Los síntomas mayoritariamente descritos son somnolencia, dolor de cabeza, sedación, edema, bradicardia y bloqueo aurículo-ventricular. *In vitro*, los estudios indican que el

mibefradilo inhibe a los citocromos P450, 1A2, 2D6 y 3A4 aumentando los niveles plasmáticos de los fármacos metabolizados por alguno de estos isoenzimas (Ernst y Kelly, 1998).

Aun así, múltiples estudios continúan haciéndose entorno al mibefradilo y sus propiedades a diferentes niveles ya que sigue siendo un fármaco muy válido como bloqueante de los canales de calcio tipo T.

2.3.4.2. Antiarrítmicos y otros compuestos

La mayoría de los agentes antiarrítmicos producen una inhibición de I_{CaT} . Muchos otros compuestos también inhiben el canal T, entre ellos están alcoholes como el octanol y mentol (Swandulla y cols., 1987; Llinás y Yarom, 1986), neurolépticos como la clorpromacina (Yaari y cols., 1987), el diurético amiloride (Cohen y cols., 1992), el ácido retinoico (Bosma y Sidell, 1988), un derivado de la vitamina A, la tetrametrina (Tsunoo y cols., 1988), un insecticida, el U92032 (Xu y cols., 1993), y la concavalina A, una lecitina (Ivens y Deitmer, 1986).

Los glucósidos carditónicos como la ouabaina aumentan I_{CaT} , al igual que I_{CaL} , en el ventrículo de cobayo (LeGrand y cols., 1990) y en la aurícula de rana (Alvarez y Vassort, 1992). Alteraciones en el residuo glicólico a nivel de los residuos cargados producen efectos opuestos en I_{CaT} respecto a I_{CaL} . Por ejemplo, el residuo cargado positivamente del dodeciltrimetilamonium aumenta I_{CaT} y disminuye I_{CaL} . Lo contrario, se observa cuando se sustituye por el residuo cargado negativamente el dodecilsulfato (Post y cols., 1991).

En la mayoría de los casos, los efectos de los fármacos sobre I_{CaT} ocurren sin modificar la dependencia de voltaje. Pero otras veces, como en el caso de las dihidropiridinas, se produce un cambio hacia la izquierda de la dependencia de voltaje, aunque siempre, este efecto es mucho menor sobre I_{CaT} que sobre I_{CaL} . (Cohen y cols., 1988; Hagiwara y cols., 1988; McCarthy y Cohen, 1989; Kuga y cols., 1990).

Por otro lado, estos fármacos tienen acciones más potentes sobre otro tipo de receptores y canales, y son esencialmente no selectivos para el canal T. De todos modos, todos ellos son también activos sobre los canales L, lo que sugiere algunas similitudes fundamentales en cuanto a los sitios de unión del fármaco entre los canales T y L.

2.3.4.3. Neurotransmisores

Varios neurotransmisores parecen regular I_{CaT} . La falta de efecto del agonista β -adrenérgico isoproterenol ha sido utilizado como criterio para distinguir ambas corrientes de calcio, aunque esta observación no es consistente (Bean, 1985; Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Tygat y cols., 1988; Alvarez y Vassort, 1992) ya que hay autores que han descrito un aumento de I_{CaT} por efecto del isoproterenol (Mitra y Morad, 1986). Aun así, el aumento mediado por isoproterenol sobre I_{CaT} es independiente de la elevación en el contenido de AMPc, que es el mecanismo de acción descrito para el canal L (Alvarez y Vassort, 1992).

Más asociado parece estar el aumento del recambio del fosfatidilinositol y la consecuente activación de la PKC, para explicar el mecanismo de acción por el cual los neurotransmisores modulan I_{CaT} (Furukawa y cols., 1992). Entre ellos, están los agonistas α_1 (Marchetti y cols., 1986), el ATP (Alvarez y Vassort, 1992), la angiotensina II y la endotelina-1 (Twombly y cols., 1988; Furukawa y cols., 1992; McCarthy y cols., 1993). Un acoplamiento funcional del canal T a las proteínas G también parece ocurrir en la modulación del canal (Scott y cols., 1990).

El neuropéptido Y, induce una inhibición del canal T mediado a través de proteínas G, ya que el tratamiento previo con toxina pertussis bloquea el efecto del NPY sobre la corriente (Ewald y cols., 1988; Walker y cols., 1988). De igual modo, el tratamiento con pertussis también previene la inhibición de I_{CaT} inducida por acetilcolina y noradrenalina (Kasai, 1992). La endotelina también ejerce su efecto a través de proteínas G mientras que el mecanismo por el cual se produce el efecto del ATP, aumentando I_{CaT} , permanece sin conocerse.

En la mayoría de los casos, la modulación de I_{CaT} por neurotransmisores en el tejido cardíaco parece ocurrir sin alteraciones en las propiedades cinéticas de la corriente (Kawano y cols., 1989).

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MODELO EXPERIMENTAL DE HIPERTROFIA CARDIACA

La hipertrofia ventricular izquierda fue inducida por estenosis de la aorta abdominal según la técnica inicialmente descrita por Cutilleta y cols, (1975), y utilizada con éxito en nuestro laboratorio (Gómez y cols., 1997). Ratas macho jóvenes de la raza Sprague-Dawley, con pesos comprendidos entre los 150-175g, se anestesiaron vía intraperitoneal, con pentobarbital sódico (50mg/Kg). Una vez dormidas, el abdomen se desinfectó con alcohol etílico de 96° y se abrió primero la piel y después el músculo siguiendo la línea alba. El intestino se retiró, para permitir el acceso a la aorta abdominal y se colocó entre algodones empapados en suero fisiológico para evitar su desecación. La aorta abdominal se limpió de tejido conectivo y una vez aislada, se colocó en ella un clip de plata de 0.3 mm de apertura, justo antes de la bifurcación de las arterias renales. Mediante este clip, se produce una sobrepresión que va aumentando progresivamente a medida que el animal va creciendo. Posteriormente el intestino se colocó en su sitio y, se cerró el abdomen y la piel con sutura continua. Durante los cuatro días posteriores a la operación se administró amoxicilina (30mg/Kg) en el agua de bebida, evitando así posibles infecciones.

Cada animal se pareó con otro de la misma edad y peso, el cuál sufrió la misma operación, a excepción de que no se le colocó ningún clip. Este grupo es el que se utilizó como control, ya que trabajos anteriores han demostrado que no existe ninguna diferencia entre animales que han sufrido una operación simulada, y los no han sufrido dicha operación (Aronson y Nordin, 1984).

Los animales fueron alimentados *ad libitum* hasta 9 semanas después de la operación, momento en el cuál se les sacrificó para la realización de los experimentos. En ese momento, los animales no presentaban ningún síntoma de insuficiencia cardiaca (congestión pulmonar, edemas, ascitis, etc). Para evaluar la hipertrofia utilizamos el cociente resultante de dividir el peso en mg del corazón entre el peso total del animal en g. Sólo fueron seleccionados para los experimentos los corazones hipertróficos en los

que este cociente fue igual o superior al 25%, comparado con el cociente de animales controles (Scamps y cols., 1990).

3.2. MÉTODO DE OBTENCIÓN DE MIOCITOS CARDIACOS AISLADOS: TÉCNICA DE DISOCIACIÓN

La disociación de las células cardíacas se hizo siguiendo el método descrito anteriormente por Cerbai y cols, (1994), con pequeñas modificaciones. Una vez que los animales cumplieron 9 semanas tras la intervención, se les administró 4 IU/g de heparina por vía intraperitoneal. Diez minutos después se les anestesió con pentobarbital sódico (50 mg/Kg), de acuerdo con las regulaciones europeas. Una vez que los animales fueron anestesiados se procedió a la extracción del corazón el cuál se pesó y se colocó en un aparato de Langerdorff, para su perfusión retrógrada a través de la aorta (la perfusión se realizó utilizando una bomba peristáltica, Gilson miniplus 3, que mantenía el flujo constante a 8ml/min.). Todas las soluciones que pasaron estaban oxigenadas y a una temperatura de 35-36 °C.

El corazón se perfundió primeramente durante 10 minutos con una solución sin calcio tamponada con HEPES, para limpiarlo y detener su latido. Posteriormente, se perfundió durante 15 minutos con la misma solución a la que se añadió colagenasa Worthington tipo II (60 IU/ml) y 1mg/ml de albúmina bovina (BSA. Sigma), ajustando el flujo de la bomba a 5ml/min.

Tras este tiempo, en el cuál el corazón comenzó a reblandecerse, se extrajo el corazón del Langerdorff y se separaron el ventrículo izquierdo junto con el septum. Se cortaron en pequeños trocitos y se comenzaron a agitar suavemente en la misma solución tamponada con HEPES a la que se añadió calcio 0.1 mM, permitiendo la disgregación de las células. A los diez minutos, se recogió la primera fracción celular, el tejido se resuspendió nuevamente en la solución anterior durante otros 10 min. con el fin de recoger una segunda fracción celular, y así sucesivamente hasta 4-5 fracciones.

Las células se dejaron sedimentar en un baño a 35-36°C, se decantaron y se resuspendieron en una solución preparada para su mantenimiento, ya listas para la realización de los experimentos.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (24-26°C) en células tolerantes al calcio, las cuales eran viables durante 9-10 horas después de la disociación. Con este método más de un 70% de las células obtenidas tanto de corazones controles como hipertróficos eran aptas para su estudio electrofisiológico.

3.3. TÉCNICAS ELECTROFISIOLÓGICAS

Las técnicas electrofisiológicas tienen como objeto el estudio de los fenómenos eléctricos ligados al funcionamiento de ciertos tejidos, considerados bien en su conjunto o bien como células aisladas. Si se introduce o se pone en contacto un microelectrodo de cristal relleno de una solución electrolítica con una célula, se podrá medir el potencial y las corrientes iónicas, si está unido a un voltímetro o un amperímetro respectivamente.

De acuerdo con la ley de Ohm, se puede medir la corriente que fluye a través de la membrana si controlamos el voltaje (Voltage-clamp) o medir el voltaje si controlamos la corriente (Current-clamp). El método de fijación de corriente, permite medir las variaciones en el voltaje a consecuencia de la aplicación de una corriente externa, es decir, se pueden obtener potenciales de acción. Con el método de fijación de voltaje se pueden estudiar las corrientes iónicas que fluyen al potencial que se determine durante el experimento.

Durante las décadas de los años 60-70, la corriente de calcio que pasaba a través de los canales voltaje dependientes se determinaba mediante técnicas macroscópicas en preparaciones multicelulares, gracias a la introducción de un microelectrodo de cristal relleno de solución conductora, en una pequeña porción de tejido bañado por una solución fisiológica y oxigenada (Beeler y McGuigan, 1978). Se utilizaba la técnica de fijación de voltaje (clamp de voltaje), pero surgían inconvenientes que no permitían aislar una corriente como I_{Ca} de otras corrientes iónicas involucradas en la génesis del potencial de acción cardiaco, ya que era muy difícil modificar el medio externo.

Además, tanto por el reducido espacio de difusión, como por la heterogeneidad eléctrica espacial debida a la complejidad morfométrica, y la propagación de la corriente a las células vecinas, se hacía muy difícil el control adecuado de voltaje.

3.3.1. PATCH-CLAMP

Todos los inconvenientes antes expuestos fueron minimizados gracias a dos importantes avances técnicos surgidos en la década de los 80: la posibilidad de aislar miocitos cardiacos y la utilización de la técnica de “parche de membrana” (patch-clamp), y que permite registrar la corriente que fluye a través de todos los canales de la célula (corriente macroscópica) o la que fluye a través de un único canal (corriente microscópica).

En 1976, Neher y Sakman publicaron la primera corriente grabada de una membrana biológica. En 1981, describieron el método de “sello gigante” (giga seal) mejorado (Hamills y cols., 1981) y ya en 1982 cerca de 25 laboratorios publicaron artículos utilizando esta técnica. En solo unos años, la mayoría de los mejores laboratorios que trabajaban en biofísica de membranas cambiaron de las técnicas macroscópicas a las microscópicas. El método de “parche de membrana” (patch-clamp), se llamó así porque con él se estudian las corrientes que pasan a través de una porción (parche) de membrana y su descubridores Neher y Sackman fueron merecedores del premio Nobel de Medicina en 1991.

3.3.1.1. Configuraciones de patch-clamp

El registro de las distintas corrientes iónicas se realiza mediante una pipeta de succión (con un diámetro interno de punta aproximado de $2.5\mu\text{m}$), rellena de una solución conductora similar al líquido intracelular en unos casos o al líquido extracelular en otros, dependiendo de la configuración de patch-clamp utilizada. Tanto en esta solución interna como en las soluciones externas que bañan la célula, se pueden añadir bloqueantes o moduladores farmacológicos de determinadas corrientes, según interese para el registro que se desee hacer.

La ejecución de la técnica se realiza en varios escalones que dan lugar a cuatro posibles configuraciones con diferentes tipos de registros (figura 14).

On-cell patch

El primer paso consiste en acercar la punta de la pipeta a la célula (siempre con presión positiva en el interior para evitar que la punta de la pipeta se ensucie al entrar en contacto con el líquido que baña a las células), hasta que rochemos suavemente la superficie membranal. A continuación, y tras aplicar un cierto grado de presión negativa, mediante una suave aspiración, se consigue la formación de un sello de alta resistencia (10-100 gigaohms) en el punto de contacto entre la membrana y los bordes de la pipeta. En este momento nos encontramos en la configuración de *cell attached* en la cuál podemos estudiar las corrientes que pasen a través de ese pequeño parche de membrana delimitado por la pipeta. Así es posible estudiar el parche en su sitio (*on cell patch*). Se registra corrientes de calcio unitarias del canal que está en el parche. La mayor desventaja de esta configuración radica en, que no permite conocer el potencial de membrana celular ni modificar la composición del medio intracelular.

Whole-cell

Todos los experimentos que se muestran en la presente Tesis Doctoral han sido realizados utilizando la configuración de célula entera (*whole-cell*). Para ello, una vez que llegamos a la configuración de *cell attached*, se ejerce un succión desde el interior de las pipeta consiguiendo la rotura del sello, quedando el interior de la pipeta en contacto con el interior celular. Así, se estudia la corriente que pasa a través de toda la membrana celular, por lo que el número de canales que intervienen es el total, la corriente es mayor y tenemos menos peligro de interferencias con el ruido eléctrico. La corriente registrada es proporcional a: la corriente unitaria, el número de canales y la probabilidad de apertura de estos canales.

El medio extracelular y el intracelular pueden ser controlados, de forma que podamos estudiar una corriente aislada añadiendo adecuados bloqueantes para el resto de las corrientes, o simplemente sustituyendo los iones que no interesen por otros que no atraviesen la membrana celular. El medio intracelular, puede ser controlado en parte,

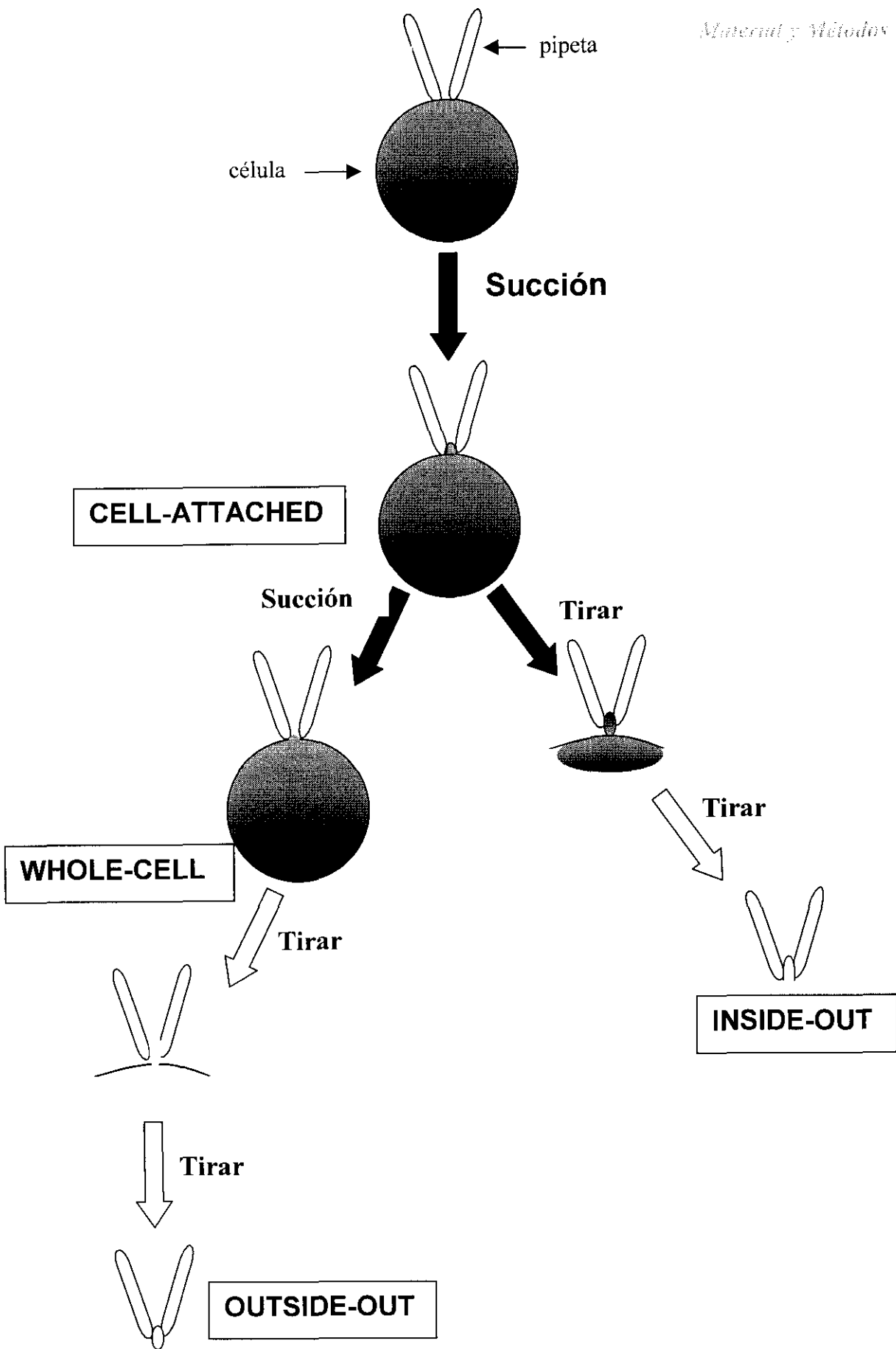


Figura 14. Esquema de las configuraciones de la técnica de patch-clamp

3.3.2. EQUIPO UTILIZADO

Las corrientes de membrana fueron registradas utilizando la configuración de célula entera. El equipo de fijación del voltaje (Voltage-clamp), constaba de un amplificador modelo Axopatch 1D con un preamplificador “Headstage CV-4 1/100” (Axon Instruments, Foster City, CA USA) controlado por un ordenador (IBM PC-AT) equipado con una tarjeta de conversión analógico digital Labmaster TL 1 (125kHz). Las corrientes de membrana se registraron con la ayuda de un programa de ordenador comercial, pClamp versión 6.0.4 (Axon Instruments).

Las pipetas de patch-clamp fueron fabricadas a partir de capilares de hematocrito de 1.5 de diámetro externo y cristal blando, con un estirapipetas programable modelo P-97 (Sutter Instruments Co.). Cuando las pipetas se rellenaron de solución interna presentaban una resistencia de punta entre 0.9 a 2 MΩ. La resistencia en serie final antes de la compensación era de 2 a 8 MΩ (el 60-80% de las resistencias en serie eran compensadas).

3.3.3. SOLUCIONES EMPLEADAS

3.3.3.1. Disociación de miocitos

La solución que se utilizó para la disociación de los corazones tanto controles como hipertróficos, fue una solución que no contenía calcio y estaba tamponada con HEPES para mantener el pH. Sobre esta misma solución se fueron añadiendo en las diferentes etapas, colagenasa, albúmina o calcio.

Las iniciales HEPES vienen de ácido N-(2-hidroxietil) piperazina N-(2-etansulfónico).

La composición viene descrita en la siguiente tabla:

Tabla 5. Composición de la solución de disociación

Reactivo	Peso molecular	Concentración (mM)
HEPES	238.3	10
Glucosa	180.2	10
Taurina	125.15	20
NaCl	58.44	120
KH ₂ PO ₄	136.1	1.2
KCl	74.55	10
MgCl ₂	203.3	1.2
PH=7.2con NaOH		

3.3.3.2. Mantenimiento de células ya disociadas

La solución sobre la que se depositaron las células una vez aisladas fue una solución de Tyrode modificada y adecuada para el mantenimiento de las células viables durante las horas que duraron los experimentos. A esta solución se le añadieron 2 mg/ml de albúmina bovina (BSA, sigma) y CaCl₂ 0.5 mM.

Su composición se muestra en la tabla 6:

Tabla 6. Composición de la solución de mantenimiento de las células

Reactivo	Peso Molecular	Concentración (mM)
NaCl	58.44	130
KCl	74.55	5.4
NaH ₂ PO ₄	138	0.4
MgCl ₂	203.3	0.5
HEPES	238.3	25
CO ₃ HNa	84.01	5
Glucosa	180.2	22
Insulina		10 U/L
PH=7.2 con NaOH		

3.3.3.3. Solución externa de registro

Esta solución tiende a imitar la composición del medio extracelular, con las modificaciones pertinentes para poder poner de manifiesto la corriente de calcio, en especial de I_{CaT} , sin interferencias por parte de otras corrientes que se activen a los mismos potenciales.

Para eliminar la corriente de sodio, este ion se sustituyó de forma equimolar por colina. De este modo, se eliminaron las corrientes de potasio activadas por sodio, corrientes transitorias generadas por la bomba Na^+/K^+ (Lefevre y cols., 1991) y corrientes provocadas por el intercambiador Na^+/Ca^{++} . Se añadió 4-amino piridina (4-AP), para bloquear la corriente transitoria de salida de potasio, y lo más importante, en todo momento del experimento, la solución de registro llevaba tetrodotoxina (TTX) a la concentración de $30 \mu M$, para bloquear efectivamente la corriente de entrada de sodio,

la cuál al activarse a potenciales similares a I_{CaT} podría dar lugar a confusiones y resultados erróneos.

Su composición se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 7. Composición de la solución de registro

Reactivo	Peso molecular	Concentración (mM)
Colina Cl	139.6	140
CsCl	168.37	5
Glucosa	180.16	5.5
HEPES	238.3	5
MgCl ₂	203.3	0.5
4-Amino Piridina	99.12	2
CaCl ₂	147	5
PH=7.4 con CsOH		

3.3.3.4. Solución interna

La solución interna debe ser compatible con el medio extracelular, respetando en la medida de lo posible su composición iónica. La concentración de calcio libre intracelular es muy baja (del orden de 10^{-8} M), por lo que sólo se puede mantener en ese rango mediante el uso de queladores del calcio. En nuestros experimentos, se utilizó el EGTA (ácido etilén glicol bis (β -aminoetil éter) NNN'N' tetraacético). Esto facilitaba alcanzar la configuración de célula entera (Marty y Neher, 1983) y minimizar las corrientes activadas por calcio, así como la corriente del intercambiador $Na^+ - Ca^{++}$. El

potasio, principal ion en la composición del medio intracelular, se sustituyó por cesio, para el registro de la corriente de calcio, eliminando las corrientes de salida de potasio. Por el mismo motivo también se añadió TEA (cloruro de tetraetilamonio). Además, se utilizaron compuestos de alto valor energético, ATP, GTP y fosfocreatina, para mantener, durante un mayor intervalo de tiempo la célula en condiciones óptimas, tratando de impedir el fenómeno de “run-down”, o desaparición de la corriente con el tiempo.

La composición de la solución interna utilizada en los experimentos fue la siguiente:

Tabla 8. Composición de la solución interna

Reactivo	Peso Molecular	Concentración (mM)
EGTA	380.4	10
CsCl	168.37	100
TEA	165.7	20
HEPES	238.3	10
MgCl ₂	203.3	5
GTPNa ₂	523.2	0.4
ATPNa ₂	551.15	5
Fosfocreatina	255.1	5
CaCl ₂	147	0.06
PH=7.2 con CsOH		

3.3.4. PROTOCOLO EXPERIMENTAL PARA EL REGISTRO DE LAS CORRIENTES DE CALCIO

Una alícuota de la suspensión de células ventriculares que permanecían en la solución de mantenimiento, se colocó sobre una cámara de registro montada en la platina de un microscopio invertido Olympus IMT-2. Se dejaron pasar 5 min. para permitir que las células se depositaran y se fijaran al fondo del cubre objetos de cristal, que formaba el fondo de la cámara. Una vez pasado este tiempo, las células se perfundieron, con las soluciones de registro modificadas o no por la adición de diferentes fármacos, según el interés del experimento a realizar, a un flujo constante de 2 ml/min. El flujo se controló mediante una bomba peristáltica Eyela MP 3, de 4 vías para permitir el cambio rápido de una solución a otra.

Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente, para enlentecer las cinéticas de las corrientes objeto de estudio y poderlas separar de las corrientes capacitivas, además de mejorar el control del voltaje.

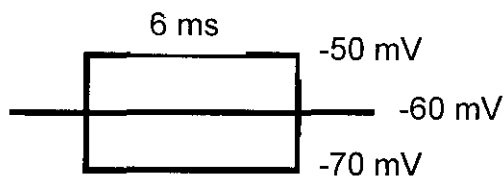
Los registros eléctricos se realizaron utilizando el método de patch-clamp en su configuración de célula entera, descrito anteriormente. La pipeta rellena de la solución interna (ver sección soluciones) y con presión positiva, se introdujo en el líquido de perfusión. En esta posición, se ajustó a cero la diferencia de potencial entre el exterior y el interior de la pipeta, de forma manual. Seguidamente, se situó la punta de la pipeta sobre la superficie celular mediante un micromanipulador (Narishigue), se eliminó la sobrepresión y se ejerció una presión negativa mediante succión para conseguir la formación de un sello de alta resistencia, lo cual se vio en un osciloscopio Techtronix 5110. Durante todo el tiempo se habían estado dando pulsos de 5 mV, y en el osciloscopio se registraba la respuesta a este potencial entre el interior de la pipeta y el líquido de perfusión. Una vez formado el sello, ya no se observó ninguna corriente en respuesta al potencial aplicado, debido a la gran resistencia del sello conseguido.

El siguiente paso consistió en la ruptura del sello, mediante la aplicación de una succión brusca, accediendo al interior celular (se produce la ruptura de la porción de membrana delimitada por los bordes de la pipeta). En este momento ya nos

encontrábamos en la configuración de célula entera, y antes de comenzar el registro electrofisiológico, se dejaron pasar unos 5 min. para permitir la diálisis del líquido intracelular con el líquido de la pipeta y la estabilización de las corrientes.

3.3.4.1. Medida de la capacitancia y resistencia en serie

La capacitancia de membrana (C_m) se midió en cada célula. Se puso de manifiesto aplicando pulsos de voltaje de ± 10 mV de 6 ms de duración, desde su potencial de reposo (potencial de la célula cuando la corriente era 0).



La capacitancia es una medida indirecta de la superficie celular ($1 \mu\text{F}/\text{cm}^2$) y se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$C_m = \tau_c I_0 / \Delta V_m [1 - (I_\infty / I_0)]$$

donde τ_c es la constante de tiempo de caída de la capacitancia, I_0 es el máximo valor de la amplitud de corriente, ΔV_m es el valor del pulso de voltaje y I_∞ es la amplitud de corriente al final del pulso (Reuter y Scholz, 1977).

La resistencia en serie se calculó a partir del mismo registro, mediante la ecuación:

$$R_s = \tau_c / C_m$$

donde R_s es la resistencia en serie.

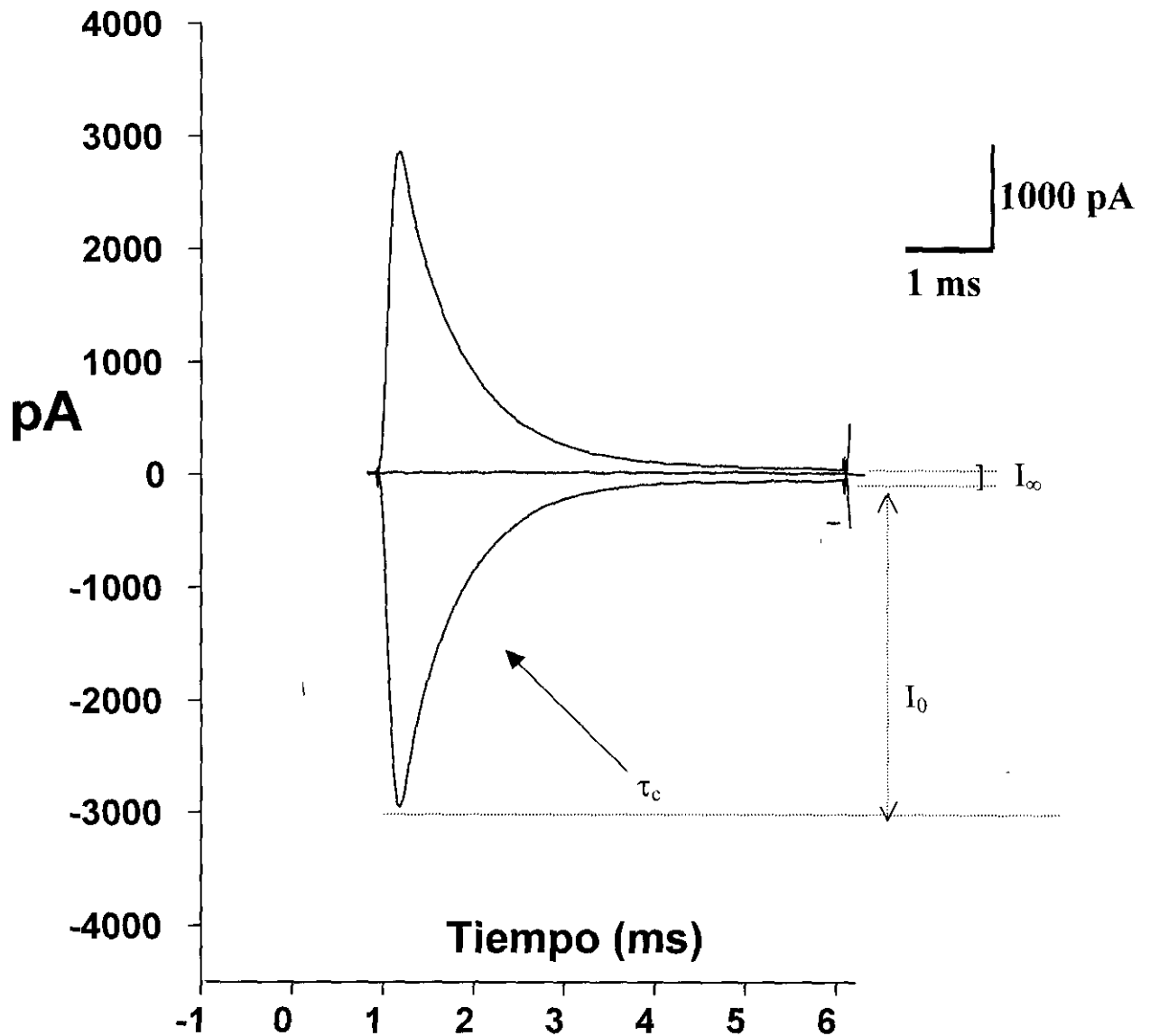
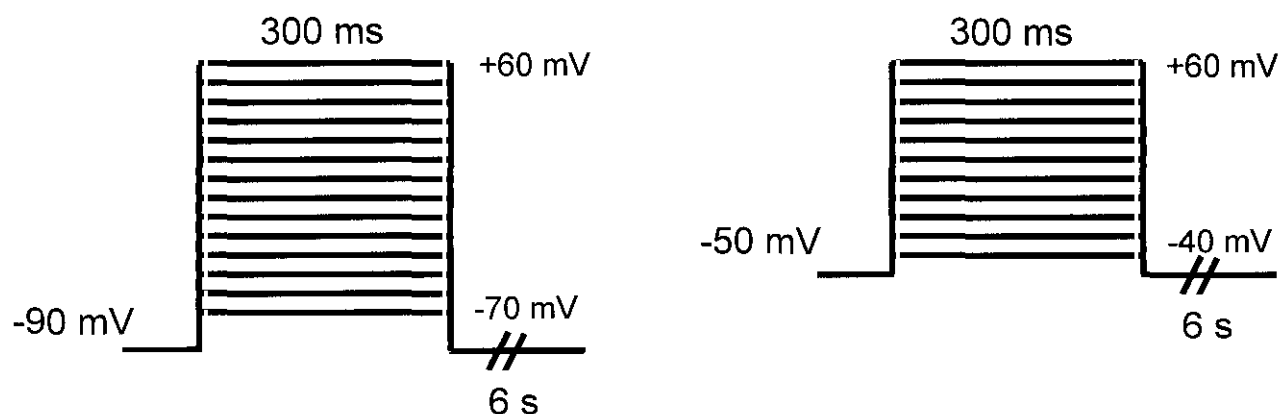


Figura 15. Ejemplo de un trazo de capacitancia celular y los parámetros para su correcto análisis.

3.3.4.2. Medición de las corrientes. Relación corriente-voltaje

Los registros de corriente se iniciaron 5-10 min. después de la ruptura del sello y los experimentos se completaron a los 20 min. Las células que mostraban el fenómeno de “run-down” se descartaron.

Las corrientes de calcio I_{CaT} e I_{CaL} , se pusieron de manifiesto aplicando pulsos de voltaje en incrementos de 10 mV, durante 300 ms, siendo el intervalo de tiempo entre pulsos de 6 s. Los pulsos se aplicaron primero desde un potencial de fijación (PF) de -90 mV (14 pulsos desde -70 mV a $+60$ mV), y posteriormente desde un PF de -50 mV (11 pulsos desde -40 mV a $+60$ mV).



Como I_{CaT} es una corriente que se activa cuando el PF es muy negativo, a un PF de -50 mV está completamente inactiva, y por tanto a -50 mV sólo se puso de manifiesto la corriente I_{CaL} pura. A un PF de -90 mV se obtuvo una corriente que es mezcla de las dos corrientes I_{CaT} más I_{CaL} . Así la corriente I_{CaT} se puede presentar como la corriente diferencia obtenida a cada pulso, es decir, la corriente resultante de restar las corrientes obtenidas al PF de -90 mV menos las obtenidas al PF de -50 mV.

Para poder comparar entre las distintas células, las corrientes se expresan como densidad de corriente. Esta densidad se calcula a partir de la amplitud de corriente normalizada por la capacitancia de la membrana. La amplitud se obtuvo como la resta entre la corriente medida al pico máximo de corriente menos la corriente medida al final del pulso (Figura 16).

La representación de la densidad de corriente obtenida para cada pulso de voltaje, es la denominada “curva corriente-voltaje” y muestra la dependencia de voltaje de la corriente estudiada. Para las corrientes de calcio esta curva tiene forma de U.

3.3.4.3. Tiempo al pico y curso temporal de la inactivación

El tiempo al pico se midió desde el comienzo del pulso hasta el pico máximo de corriente (Figura 16). El curso temporal de la inactivación se analizó mediante el ajuste matemático de la caída de la corriente con el tiempo.

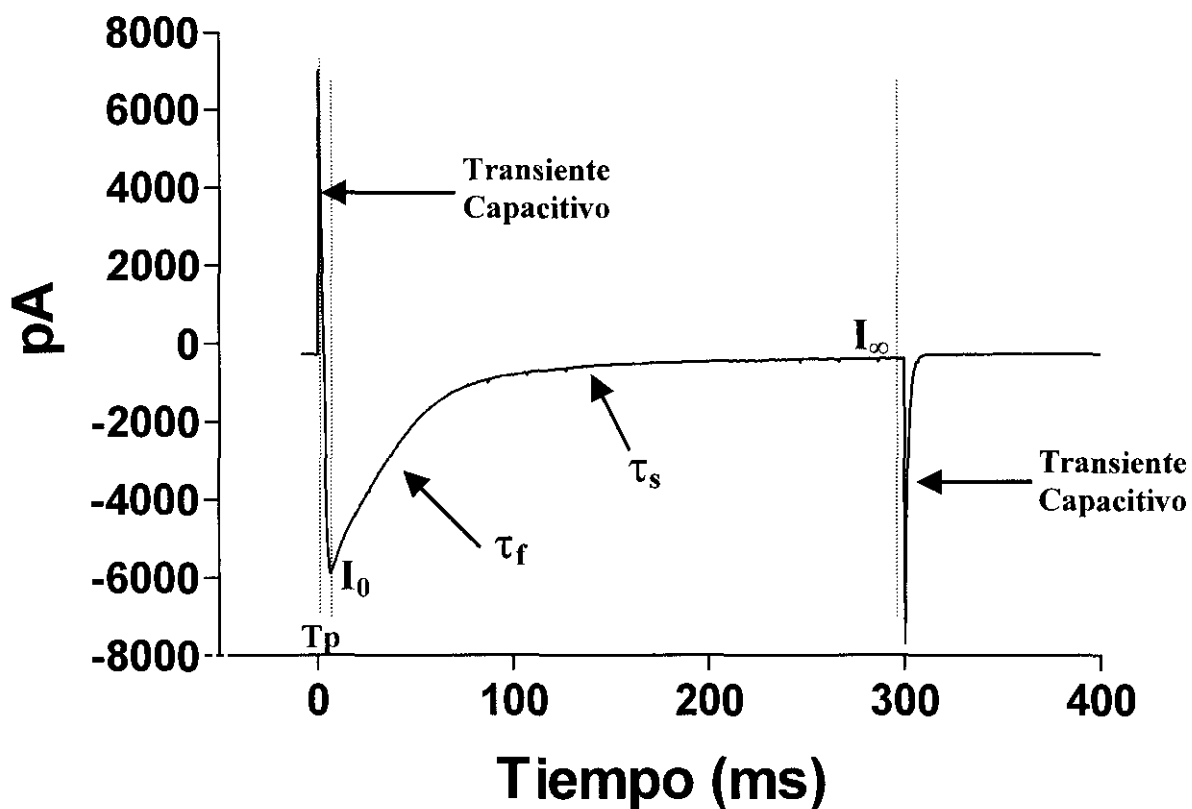
La mejor correlación para la corriente I_{CaL} , se obtuvo con una ecuación biexponencial (Scamps y cols, 1990) con dos constantes de tiempo, una rápida y otra lenta:

$$I_t = A_f \exp (-t/\tau_f) + A_s \exp (-t / \tau_s) + A_c$$

donde I_t es la amplitud total de la corriente de entrada; A_f y A_s , son las amplitudes de los componentes rápido y lento respectivamente; A_c , es el componente independiente del tiempo; y τ_f y τ_s , son las constantes de tiempo rápida y lenta.

En cambio, la corriente I_{CaT} se ajustó mejor a una ecuación monoexponencial con sólo una constante de tiempo (τ) y su amplitud respectiva (A), (Hagiwara y cols., 1988).

$$I_t = A \cdot \exp (-t/\tau) + A_c$$



$$\text{Amplitud de corriente} = I_0 - I_\infty$$

$$\text{Densidad} = \frac{\text{Amplitud}}{C_m}$$

Figura 16. Ejemplo de un trazo de corriente a -10 mV y los parámetros para su análisis.

3.3.4.4. Activación en estado estacionario

La dependencia del voltaje de la activación en estado estacionario, se analizó utilizando los valores de conductancia calculados de acuerdo con las siguientes ecuaciones (Isenberg y Klöckner, 1982):

$$G = I_0 / (V_m - V_{rev})$$

$$d_\infty (V_m) = G / G_{max}$$

donde G es la conductancia calculada al potencial de membrana V_m , I_0 es el pico de la corriente de calcio y V_{rev} es el potencial de reversión aparente obtenido mediante extrapolación del valor de potencial al cuál la corriente es cero desde la zona lineal del brazo ascendente de la curva corriente-voltaje. $d_\infty(V_m)$ es el parámetro de activación en estado estacionario de la I_{Ca} y G_{max} es el valor de conductancia máxima.

Los datos de $d_\infty(V_m)$ se ajustaron a una función de distribución de Boltzmann de la forma:

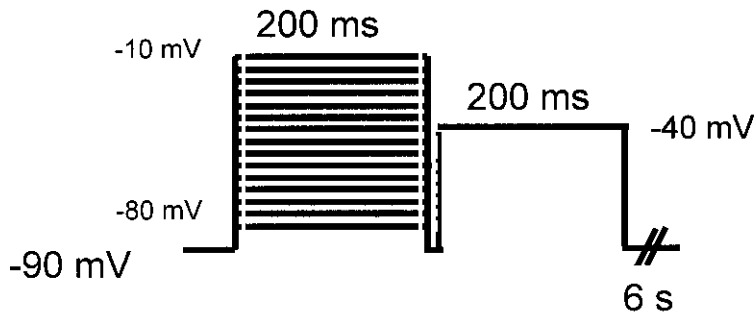
$$d_\infty (V_m) = 1 / [1 + \exp (V_{50} - V_m) / K]$$

donde V_{50} es el potencial al cual la I_{Ca} está activada a la mitad de su valor máximo y K es la pendiente de la curva de activación en el punto de inflexión. Puesto que en el tiempo hasta la obtención del valor de pico utilizado es posible alguna inactivación y los valores de V_{50} y K son extrapolados, estos datos se deben considerar como una aproximación.

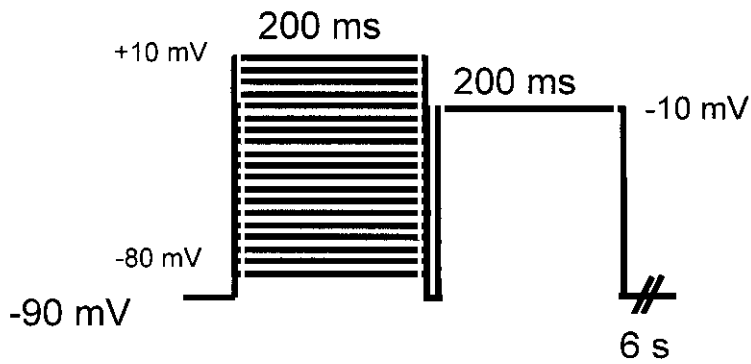
3.3.4.5. Inactivación en estado estacionario

La dependencia de voltaje de la inactivación en estado estacionario se determinó usando un protocolo de doble pulso. Desde un potencial de fijación de -90 mV, se aplicaron pulsos condicionantes de 200 ms en incrementos de 5 mV. Después de cada pulso condicionante se volvió al PF durante 3 ms, para permitir mayor separación entre la corriente y la variante capacitiva, y seguidamente se dio un pulso test a un potencial

fijo durante 200 ms para obtener bien I_{CaT} o I_{CaL} . Para I_{CaT} el pulso test fue a -40 mV (potencial al que obtenemos prácticamente corriente T pura) y los pulsos condicionantes fueron desde -80 a -10 mV (15 pulsos). Para I_{CaL} , el pulso test fue a 0 mV para los corazones controles y -10 mV para los corazones hipertróficos (por ser el valor de potencial al que se obtuvo el máximo de densidad de corriente respectivamente), y los pulsos condicionantes variaron desde -80 mV a $+10$ mV (19 pulsos).



I_{CaT}



I_{CaL}

Los datos obtenidos fueron normalizados dividiendo la corriente test entre el máximo de corriente obtenida al aplicar el protocolo anterior. La dependencia de voltaje de la inactivación podría ser aproximada a una función de distribución de Boltzmann de la forma:

$$I / I_{\max} = \{1 + \exp [(V_{50} - V_c) / K]\}^{-1}$$

donde V_c es el voltaje del pulso condicionante, V_{50} es el potencial al cual la conductancia está inactivada al 50% y K es la pendiente en el punto de inflexión.

3.4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados que se exponen en esta Tesis Doctoral han sido expresados como Media \pm EEM (error estándar de la media). Las comparaciones entre grupos se realizaron mediante el test de la t de Student o el análisis de varianza seguido de un test de comparaciones múltiples, según sea el caso. Valores de $p < 0.05$ fueron considerados significativos.

4. RESULTADOS

4.1. CARACTERÍSTICAS MACROSCÓPICAS

Los experimentos para la caracterización e identificación de la corriente I_{CaT} se realizaron en corazones procedentes de 63 ratas hipertróficas y 30 ratas controles. La inducción de la hipertrofia y la disociación de los corazones se hizo tal y como se explicó anteriormente en la sección “Material y Métodos”.

A las 9 semanas de la operación se sacrificaron los animales y se extrajeron los corazones procediendo a la obtención de las células aisladas. Para realizar los experimentos sólo se consideran como corazones hipertróficos, aquellos corazones en los que el cociente peso corazón/peso corporal fue mayor del 25%, comparado con los controles.

Como se puede observar en la tabla 9, los pesos de los animales sometidos a una estenosis aórtica (470 ± 6.44 g), no fueron significativamente distintos a los pesos de los animales controles (461 ± 10.91 g). En cambio, si comparamos el peso de los corazones de los animales a los que se les indujo la hipertrofia (2.49 ± 0.09 g), con el peso de los corazones procedentes de animales controles (1.74 ± 0.05 g), se observa como los corazones procedentes de animales a los que se les había inducido una estenosis de la aorta abdominal fueron significativamente superiores con una $p < 0.001$. Como consecuencia, se obtiene que la relación entre el peso del corazón y el peso corporal (cociente) para cada grupo, expresado como mg de corazón por g de animal, es significativamente mayor para el grupo de las ratas con estenosis aórtica (control, 3.7 ± 0.05 vs hipertrofia, 4.92 ± 0.06 mg/g; $p < 0.001$). Esto nos indica que los animales sometidos a la estenosis aórtica habían desarrollado hipertrofia cardiaca. El incremento en el peso del corazón es de un 43% y el del cociente de un 30% respecto a los animales controles.

Tabla 9. Características de los animales controles e hipertroficados.

	Peso Animal (g)	Peso Corazón (mg)	Cociente (mg/g)	N
CONTROL	461.1±10.90	1.74±0.05	3.7±0.05	30
HIPERTROFIA	470.7±6.44	2.49±0.09 ***	4.92±0.06 ***	63

Cociente, cociente entre el peso del corazón en mg y el peso del animal en g. Los datos están expresados como las medias \pm el EEM. *** $p < 0.001$ control vs hipertrofia.

Como era de esperar, la medida de la capacitancia (C_m) confirmó la hipertrofia de los miocitos aislados, al estar relacionadas con la superficie celular. La capacitancia de las células procedentes de corazones hipertroficados (318.91 ± 8.60 , $n=87$) fue significativamente mayor que la C_m de células procedentes de corazones controles (225.35 ± 13.00 , $n=41$) con una $p < 0.001$. Esto supone un incremento de un 41% en el tamaño celular de los miocitos de corazones hipertroficados frente a los controles, lo cual nos confirma que los animales con estenosis de la aorta abdominal desarrollaron, además de una hipertrofia cardiaca global, una hipertrofia a nivel celular.

4.2. ANÁLISIS DE LAS CORRIENTES DE CALCIO EN MIOCITOS VENTRICULARES PROCEDENTES DE CORAZONES NORMALES E HIPERTRÓFICOS

4.2.1. CORRIENTES DE CALCIO EN MIOCITOS VENTRICULARES AISLADOS DE CORAZONES DE RATAS CONTROLES.

Las corrientes de calcio se pusieron de manifiesto siguiendo los protocolos detallados en la sección anterior (ver material y métodos, protocolo experimental). Una vez conseguida la configuración de célula entera y tras dejar estabilizar el sello durante cinco minutos, se comenzó el registro de la corriente. Para ello, se sometió a la célula a pulsos despolarizantes, desde dos potenciales de fijación (PF) diferentes, -90 mV y -50 mV. Dado las características de activación de las corrientes de calcio T y L descritas ya por otros autores (Alvarez y Vassort, 1992; Balke y cols., 1992), cuando el potencial de fijación fue de -90 mV, la corriente resultante de la despolarización de la membrana desde -70 mV a +60 mV, reflejó el calcio que entra a la célula tanto a través de los canales de calcio tipo T, si los hubiera, como de los canales de calcio tipo L. Por el contrario, cuando el potencial de fijación fue de -50 mV la corriente que se obtuvo al despolarizar la célula desde -40 mV hasta +60 mV refleja únicamente el calcio que entra a la célula a través de los canales de calcio tipo L. Por consiguiente, la substracción de las corrientes obtenidas a un mismo pulso de voltaje pero a los dos diferentes potenciales de fijación, permite aislar la corriente I_{CaT} (Bean, 1985; Hagiwara y cols., 1988; Balke y cols., 1992).

En la Figura 17, se muestran los trazos de corriente obtenidos a los pulsos de -40 mV, -30 mV y +30 mV, desde los potenciales de fijación de -90 mV y -50 mV así como la corriente diferencia a esos potenciales, en una célula control representativa del total. Se observa como la amplitud de la corriente es dependiente del pulso test pero no del potencial de fijación utilizado. Las corrientes obtenidas a esos pulsos son muy similares a ambos potenciales de fijación, y por tanto la corriente diferencia es nula.

Al analizar la relación “densidad de corriente -voltaje” de las corrientes de calcio registradas (Figura 18) a los PFs de -90 (círculos blancos) y 50 mV (cuadrados blancos), se observa como ambas curvas son muy semejantes. Los experimentos se realizaron en un total de 41 células ventriculares, y en la figura se muestra la media de densidad obtenida para cada punto de potencial \pm EEM. La corriente de calcio que se puso de manifiesto tuvo un umbral de activación alrededor de -35 mV, y mostró el pico máximo de corriente a 0 mV. La densidad de corriente en ese punto corresponde a -14.9 ± 0.89 pA/pF para un PF = -90 mV y -15.30 ± 0.93 pA/pF a un PF = -50 mV. El potencial de reversión aparente de la corriente fue +60 mV. Como I_{CaT} se define a partir de la substracción entre las corrientes obtenidas a -90 mV, menos las obtenidas a -50 mV, se puede concluir que las células ventriculares de corazones controles carecen de corriente diferencia o I_{CaT} .

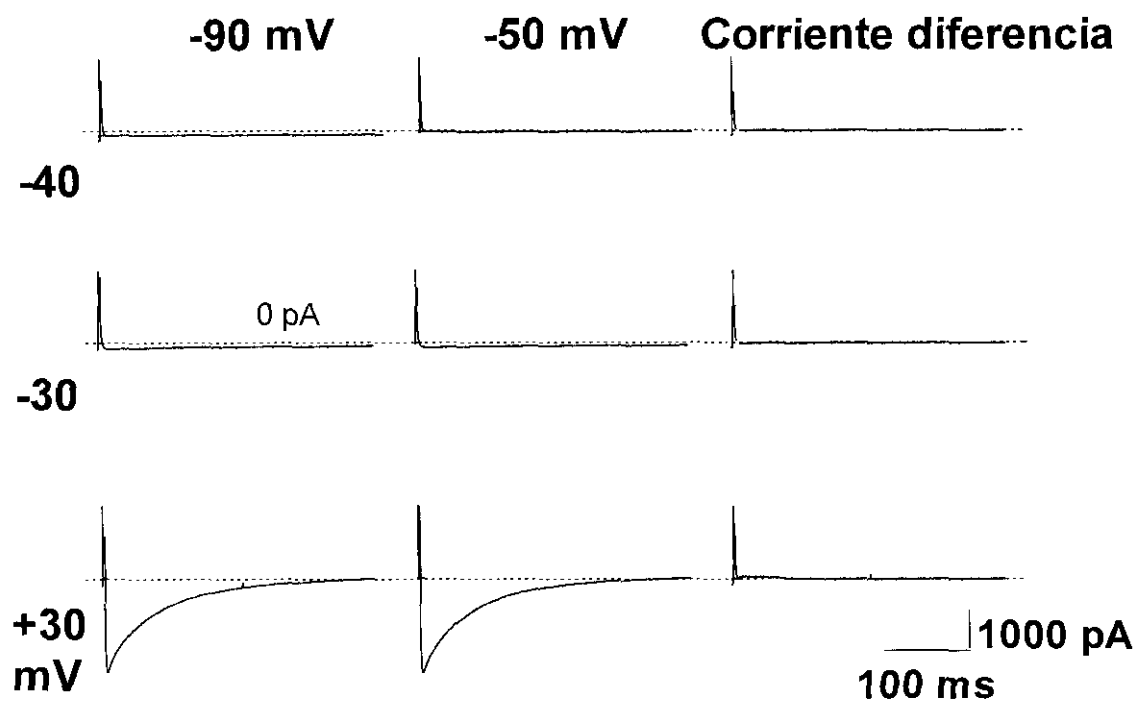


Figura 17. Trazos representativos de las corrientes de calcio en una célula ventricular control ($C_m = 165$ pF). Los trazos se obtuvieron a los pulsos test despolarizantes de -40 , -30 y $+30$ mV, desde los PF de -90 y -50 mV. La substracción de las corrientes obtenidas ambos PFs da lugar a la corriente diferencia. La amplitud de las corrientes de calcio se muestra dependiente del voltaje del pulso test pero independientes del PF utilizado.

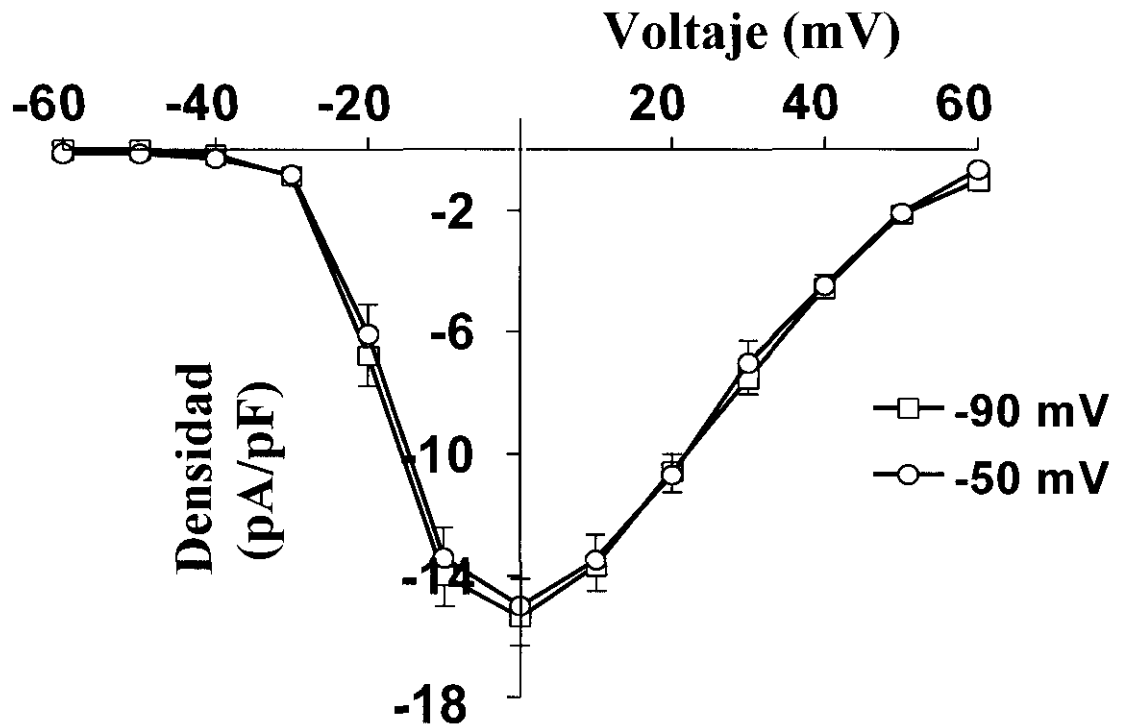


Figura 18. Relación densidad de corriente frente al voltaje de la corriente de calcio obtenida al PF de -90 mV (○) y al PF de -50 mV (□) en 41 células ventriculares controles. Las curvas de densidad de corriente son similares tanto al PF de -90 mV como al PF de -50 mV, por lo tanto I_{CaT} definida como la substracción de las corrientes obtenidas a -90 mV menos las corrientes obtenidas a -50 mV (I_{CaL} pura), es inexistente en las células ventriculares de corazones controles. Los datos se presentan como media \pm EEM.

4.2.2. CORRIENTES DE CALCIO EN MIOCITOS VENTRICULARES AISLADOS DE CORAZONES HIPERTRÓFICOS

Una vez comprobado que no hay corriente de calcio I_{CaT} en los miocitos ventriculares de corazones controles, el siguiente paso fue estudiar la posible existencia de I_{CaT} en las células ventriculares hipertróficas.

La figura 19, muestra trazos de corrientes de membrana obtenidos de una célula hipertrófica representativa del total. El registro de las corrientes de calcio en las células hipertróficas se realizó del mismo modo que el descrito para los miocitos ventriculares aislados de corazones controles. La figura muestra los trazos de corriente obtenidos al despolarizar la membrana a -40 , -30 y $+30$ mV desde los PFs de -90 mV y -50 mV. Se observa que los trazos de corriente mostrados al PF de -90 mV son mayores que los registrados desde el PF de -50 mV. Así, se puede obtener una corriente diferencia al substrair los trazos de corriente obtenidos a -50 mV de los obtenidos a -90 mV. Es decir, existe efectivamente una corriente diferencia que presumiblemente es I_{CaT} .

La figura 20 muestra la relación “densidad de corriente-voltaje” de las corrientes de calcio registradas en 87 células ventriculares hipertróficas. Las corrientes se pusieron de manifiesto mediante pulsos despolarizantes de 300 ms de duración desde -70 mV a $+60$ mV, en incrementos de 10 mV, cuando el PF era de -90 mV o desde -40 mV a $+60$ mV cuando el PF era -50 mV. Cuando se utilizó el PF de -90 mV, pulsos despolarizantes por encima de -50 mV indujeron una corriente de entrada que fue aumentando progresivamente según incrementaba el pulso despolarizante. Sin embargo, al PF de -50 mV, el pulso a -40 mV no indujo ninguna corriente de entrada y los pulsos despolarizantes de -40 mV a $+30$ mV mostraron una corriente de entrada siempre de menor densidad que la obtenida para los mismos pulsos al PF de -90 mV. Por tanto, la diferencia entre la corriente registrada a -90 mV y la registrada a -50 mV, representado como triángulos blancos en la figura 20, demuestra la existencia de una corriente de entrada de las características de I_{CaT} en estas células ventriculares aisladas de los corazones hipertróficos.

Dicha corriente diferencia, (figura 20, recuadro), comienza a activarse a -50 mV y presenta un pico de corriente a -20 mV (-3.79 ± 0.23 pA/pF), siendo su potencial aparente de reversión $+50$ mV.

Por lo que respecta a la corriente I_{CaL} , es decir a la corriente obtenida cuando despolarizamos la membrana (de -40 a $+60$ mV) desde un PF de -50 mV (figura 20, cuadros negros), tiene un umbral de activación a -30 mV, el pico máximo de corriente se produjo a -10 mV con una densidad de -14.31 ± 0.58 pA/pF y mostró un potencial de reversión alrededor de $+60$ mV.

De todo este conjunto de resultados se puede concluir que realizando la sustracción entre la corriente de calcio que se registra al PF de -90 mV, menos la corriente de calcio que se registra al PF de -50 mV, se obtiene una corriente diferencia que únicamente se encuentra en células ventriculares de corazones hipertróficos y no en las células ventriculares de corazones controles. Esta corriente diferencia es presumiblemente la corriente de calcio tipo T.

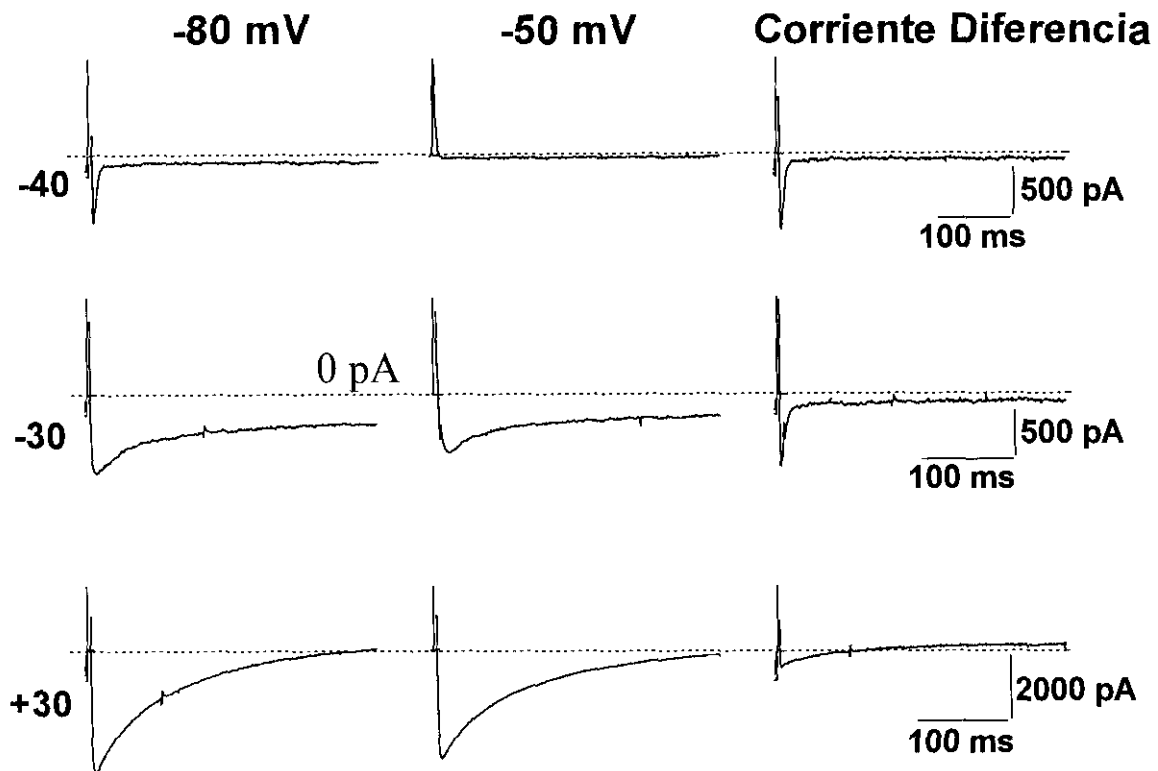


Figura 19. Trazos representativos de las corrientes de calcio registradas en pulsos test despolarizantes de 300 ms de duración a -40, -30 y +30 mV desde un PF de -90 y -50 mV, en una célula hipertrófica ventricular (capacitancia celular de 327 pF). La corriente total de calcio se manifestó a -90 mV e I_{CaL} pura se obtuvo a -50mV. La sustracción de las corrientes obtenidas para cada pulso test (-40, -30 y +30 mV), entre ambos PFs, genera una corriente diferencia, es decir, confirma la existencia de I_{CaT} . Las corrientes obtenidas al despolarizar la membrana a -40, -30 y +30 mV desde el PF de -90 son mayores en todos los casos a las obtenidas a esos pulsos desde -50 mV.

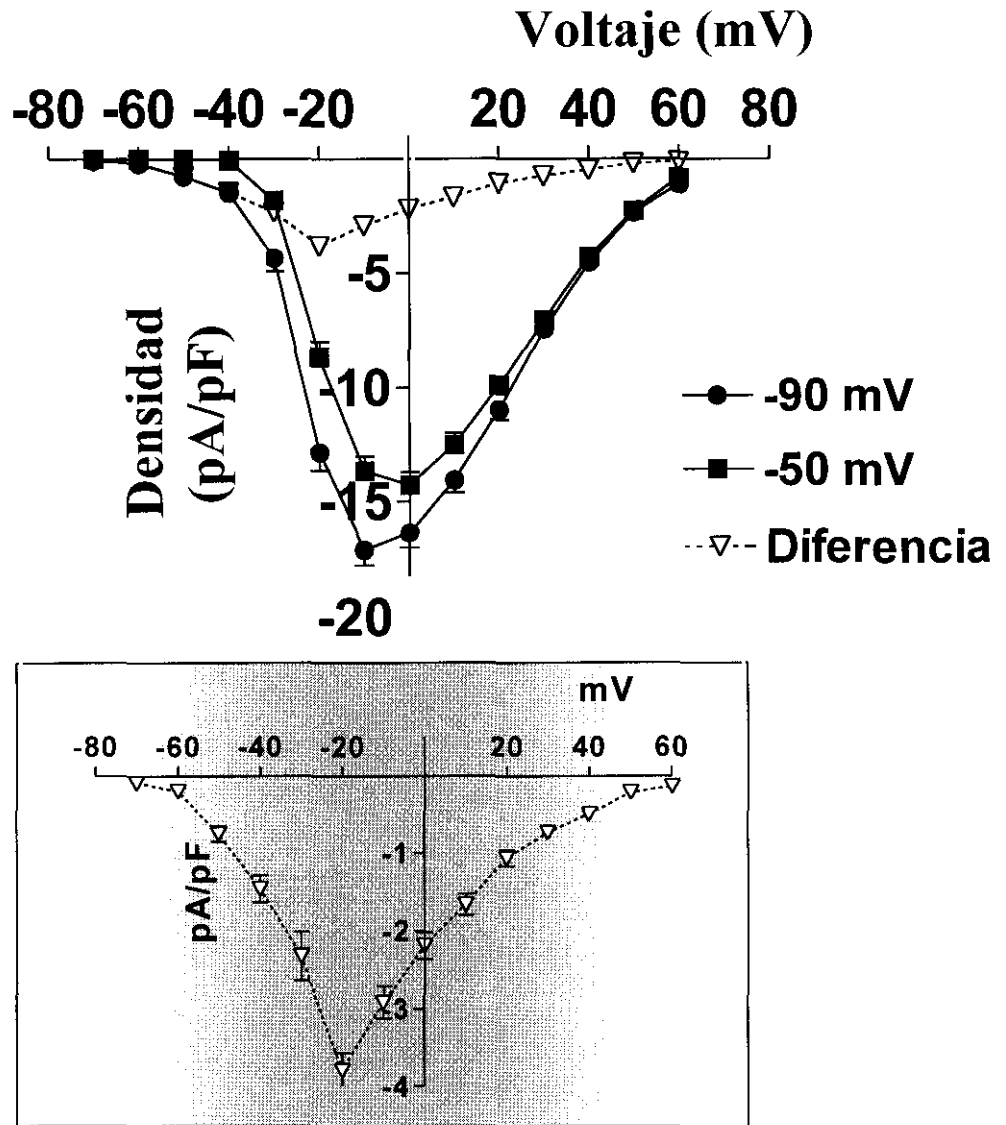


Figura 20. Relación densidad de corriente-voltaje de las corrientes de calcio registradas a diferentes pulsos de voltaje desde un PF de -90 mV (●) y -50 mV (■) en 87 células ventriculares hipertróficas. La curva de densidad de corriente a -50 mV fue menor en la mayoría de los puntos a la curva obtenida a -90 mV. Por ello, la substracción de las corrientes a -50 mV de las corrientes obtenidas a -90 mV, muestran la existencia de una corriente I_{CaT} (V), en células aisladas de miocitos ventriculares hipertróficos. El recuadro muestra más detalladamente la relación corriente-voltaje para I_{CaT} . Los datos se representan como la media \pm EEM.

4.3. CARACTERIZACIÓN DE I_{CaT} . COMPARACIÓN CON I_{CaL}

Una vez descrita en nuestras células ventriculares hipertróficas, la presencia de una corriente diferencia y estudiada su dependencia de voltaje, se prosiguió con el estudio de dicha corriente viendo sus propiedades cinéticas, activación e inactivación en estado estacionario, corriente ventana, curso temporal de la activación e inactivación, permeabilidad del canal y propiedades de bloqueo con la finalidad de comprobar que la corriente que habíamos observado en nuestras células hipertróficas correspondía a la corriente I_{CaT} .

4.3.1. CINÉTICA DE LA CORRIENTE I_{CaT} DEPENDIENTE DE VOLTAJE

4.3.1.1. Activación en estado estacionario

La dependencia de voltaje de la activación en estado estacionario, se analizó utilizando los valores de conductancia obtenidos de la forma anteriormente descrita en la sección de protocolo experimental de material y métodos, y ajustados posteriormente a una función de distribución de Boltzmann. Así obtuvimos los valores de V_{50} , es decir el valor de potencial al cual la corriente está al 50% de su activación, y K , la pendiente de la curva en el punto de inflexión.

Los resultados obtenidos de la activación en estado estacionario con respecto al voltaje, vienen resumidos en la tabla 10, y representados en la figura 21, tanto para la corriente T como para la corriente L en control e hipertrofia.

La dependencia de voltaje de la activación para la corriente I_{CaL} , se estudió en 8 células controles y 6 células hipertróficas y viene representada como la conductancia normalizada (cociente entre la conductancia obtenida en cada pulso de corriente y el máximo valor de conductancia) vs el potencial de membrana (figura 21). El análisis

cinético mostró que tanto en control (círculos) como en la hipertrofia (cuadrados), I_{CaL} se activó a potenciales por encima de -30 mV y estuvo totalmente activada alrededor de $+25$ mV. Tanto la curva obtenida para la corriente en células controles como la obtenida para células hipertróficas eran muy semejantes y mostraron parámetros cinéticos similares. El potencial al cuál se produjo el 50% de la activación (V_{50}) fue -13.90 ± 1.10 mV para células controles, y -15.00 ± 1.40 mV para células hipertróficas. La pendiente (K) fue de 2.80 ± 0.20 mV para las células controles y 3.90 ± 0.50 mV para las células hipertróficas. Como consecuencia, se puede ver que no existen cambios significativos en la activación de I_{CaL} entre células de los animales controles y células de los animales hipertróficos.

Con respecto a la activación en estado estacionario de I_{CaT} (figura 21, triángulos negros), los resultados obtenidos en 6 células hipertróficas, mostraron una corriente que se activó a potenciales por encima de -60 mV y que se encontró totalmente activada a 0 mV, a diferencia de I_{CaL} que comenzaba a activarse por encima de -30 mV y estaba totalmente activada a $+25$ mV. La V_{50} para I_{CaT} fue de -20.60 ± 3.20 mV. El valor de la pendiente no varió entre ambas corrientes siendo la K para I_{CaT} de 3.70 ± 0.70 mV y 3.90 ± 0.70 mV para I_{CaL} .

Tabla 10. Parámetros de la activación en estado estacionario en control e hipertrofia.

	V_{50} (mV)	K (mV)	N
I_{CaT}	-20.60 ± 3.20	3.70 ± 0.70	6
I_{CaL} Hipertrofia	-15.00 ± 1.40	3.90 ± 0.70	6
I_{CaL} Control	-13.90 ± 1.10	2.80 ± 0.20	8

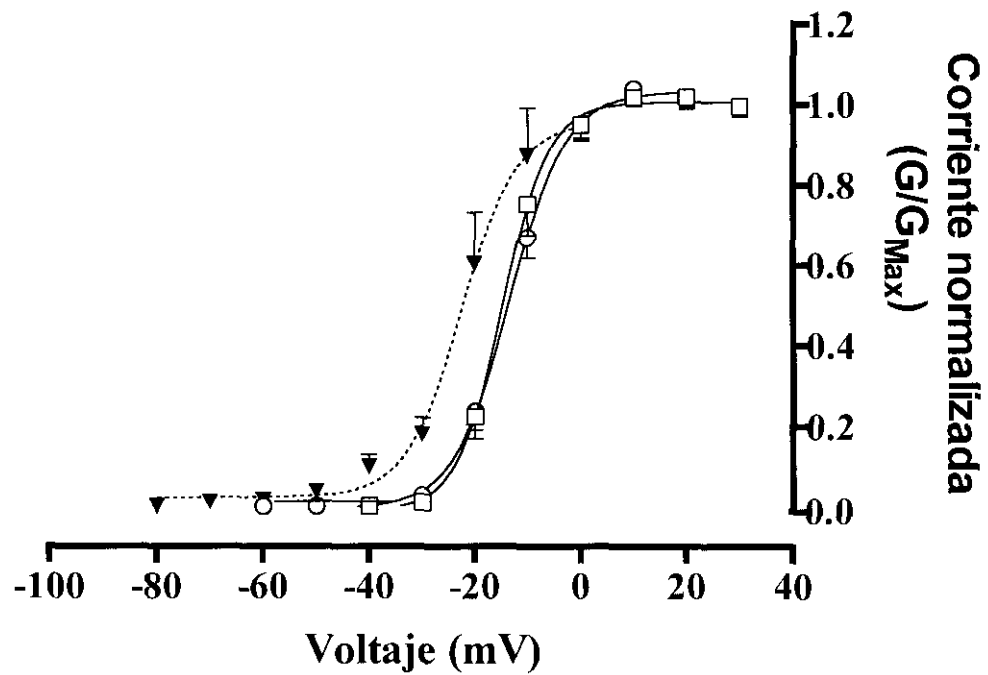


Figura 21. Activaciones en estado estacionario. I_{CaT} (\blacktriangledown), I_{CaL} en hipertrofia (\square), I_{CaL} en control (\circ). Los valores se representan como media \pm EEM.

4.3.1.2. Inactivación en estado estacionario

La inactivación en estado estacionario dependiente de voltaje, se determinó usando el protocolo de doble pulso, ya detallado en la sección correspondiente de material y métodos. Los datos se normalizaron dividiendo la corriente obtenida con el pulso condicionante entre la corriente obtenida de mayor valor y se ajustaron posteriormente a una función de distribución de Boltzmann, obteniendo los valores de V_{50} y K para la inactivación. Los resultados obtenidos se resumen en la tabla 11 y en la figura 22.

La inactivación resultó ser función del potencial de membrana en las células controles (círculos) e hipertróficas (cuadrados) para ambas corrientes. La corriente disminuyó según aumentaba el valor del pulso preconditionante.

La dependencia de voltaje de la inactivación se realizó en 9 células control y 9 células hipertróficas. En este caso los parámetros de la inactivación para I_{CaL} quedaron desplazados hacia la izquierda de manera significativa en la hipertrofia. La V_{50} fue de -19.40 ± 0.10 mV para las células controles y -31.70 ± 1.70 mV para las células hipertróficas, ($p < 0.001$). La K fue de -4.50 ± 0.10 mV para el control y -3.90 ± 0.40 mV para la hipertrofia.

La inactivación de la corriente I_{CaT} , resultó ser muy diferente a la obtenida para la corriente I_{CaL} , de manera que, la V_{50} para I_{CaT} resultó ser de -55.40 ± 1.10 mV. La K fue de -5.40 ± 0.60 mV. Estos valores concuerdan con los valores descritos anteriormente, para la inactivación en estado estacionario para I_{CaT} (Alvarez y Vassort, 1992).

Tabla 11: Parámetros de la inactivación en estado estacionario en control e hipertrofia.

	V50 (mV)	K (mV)	N
I _{CaT}	-55.40 ± 1.10	-5.40 ± 0.60	9
I _{CaL} Hipertrofia	-31.70 ± 1.70	-3.90 ± 0.40	9
I _{CaL} Control	-19.40 ± 0.10**	-4.50 ± 0.10	9

** p<0.01 hipertrofia vs control.

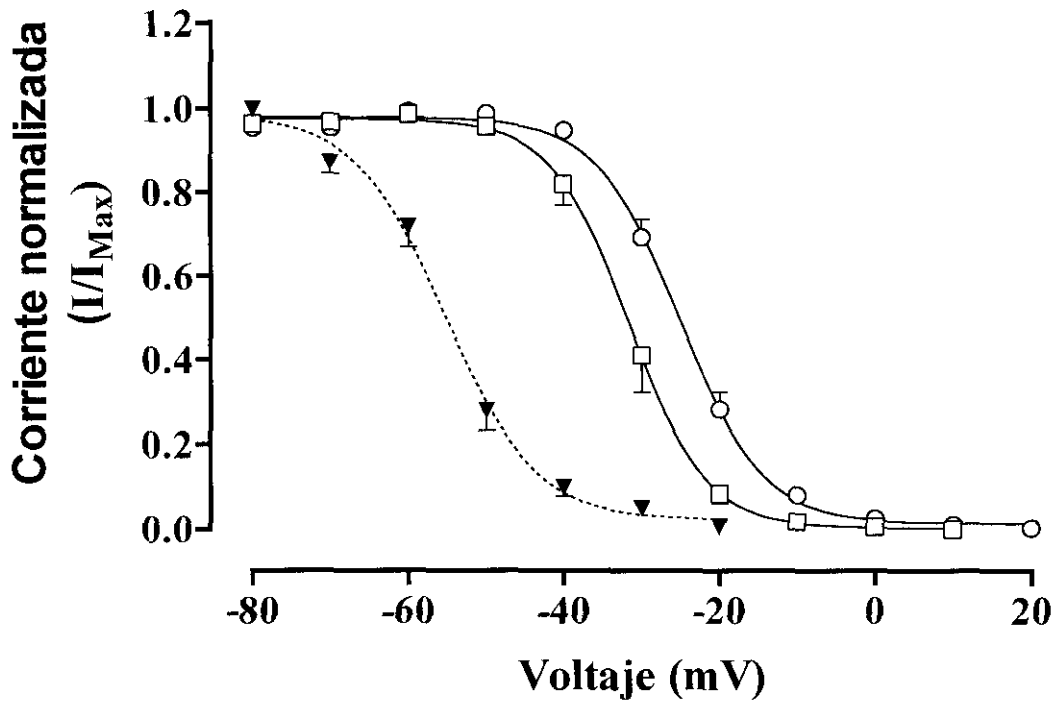


Figura 22. Dependencia del voltaje de la inactivación en estado estacionario. I_{CaT} (▼), I_{CaL} hipertrofia (□) y I_{CaL} control (○). Valores expresados en media ± EEM.

4.3.1.3. Corriente Ventana

La superposición o el producto entre la activación y la inactivación en el estado estacionario nunca es nula, ni para I_{CaT} ni para I_{CaL} , lo que indica la existencia de una corriente ventana. A potenciales más negativos de la corriente ventana, los canales se distribuyen entre los estados cerrado e inactivo. Para potenciales positivos, lo suficientemente altos para pasar el intervalo de potenciales de la ventana, los canales se distribuyen preferentemente en el estado activo. Sólo dentro del intervalo de potenciales de la corriente ventana, un canal puede estar teóricamente en cualquier estado del ciclo; abierto, cerrado o inactivo, lo que genera una corriente estable que fluye a esos potenciales (Hirano y cols., 1989; Shorofsky y January, 1992). Se genera así, un flujo de entrada de calcio que va aumentando los niveles de calcio intracelular, pudiendo contribuir en la regulación de las subsiguientes contracciones y a la aparición de arritmias en el corazón.

La corriente ventana obtenida para I_{CaT} y I_{CaL} fue diferente en cada caso, como podemos constatar en la parte superior de la figura 23 que compara la superposición de las curvas de activación e inactivación para I_{CaT} e I_{CaL} . Para el caso de I_{CaT} la corriente ventana fluiría en un rango de potenciales comprendido entre -60 y -20 mV, mientras que para I_{CaL} este rango se encontró comprendido entre -30 y 0 mV.

La parte inferior de la figura 23, compara la superposición de las curvas de activación e inactivación para I_{CaL} en control (círculos) e hipertrofia (cuadrados). El intervalo de voltaje para ambas fue de -40 a $+20$ mV para la corriente en células controles, y -30 a 0 mV para células hipertróficas.

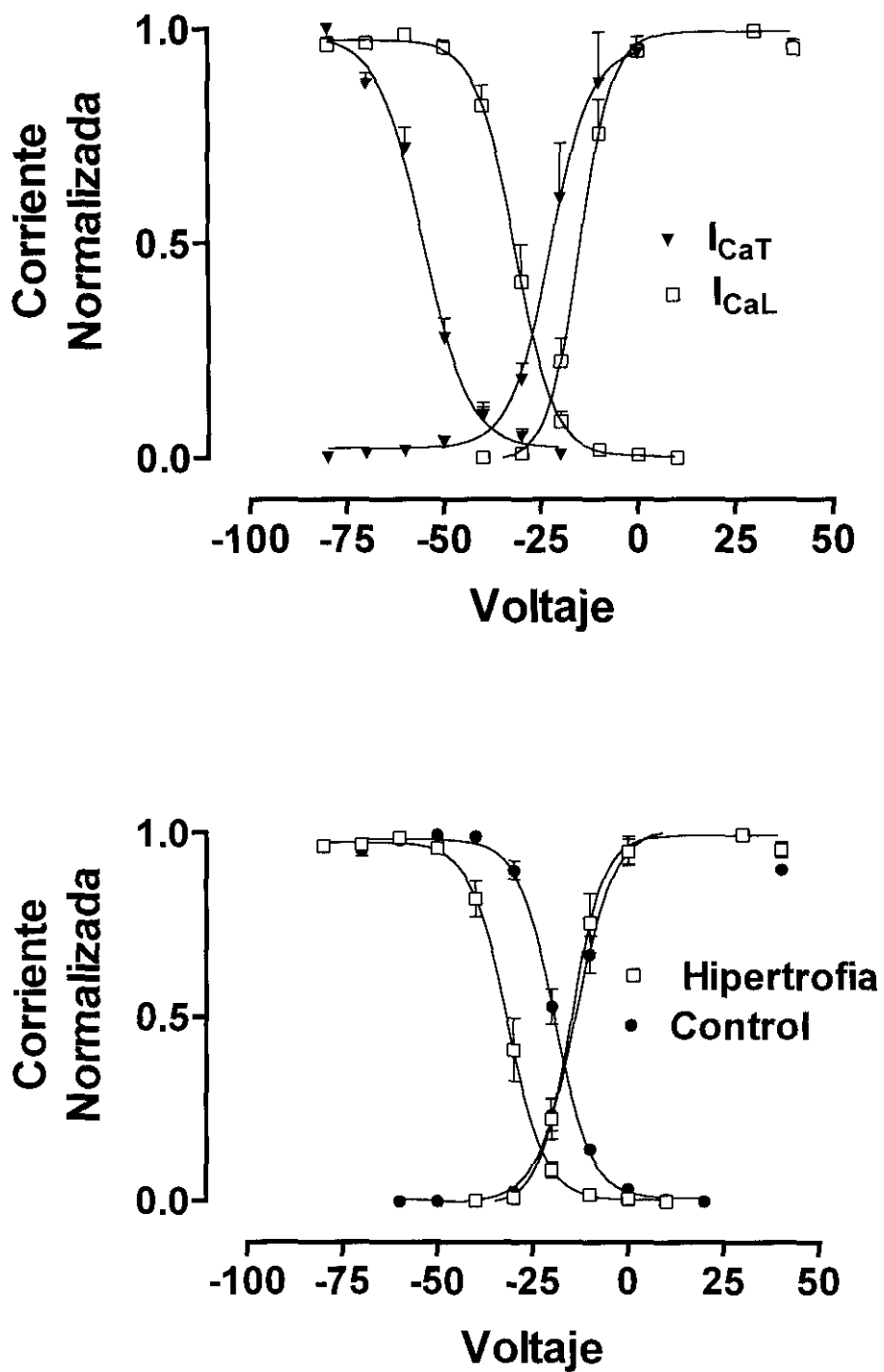


Figura 23. Parte superior, superposición de la activación e inactivación de I_{CaT} (\blacktriangledown) y de I_{CaL} (\square). Parte inferior, superposición de la activación e inactivación de I_{CaL} , en control (\bullet) e hipertrofia (\square). Valores presentados en media \pm EEM.

4.3.2. TIEMPO AL PICO Y CURSO TEMPORAL DE LA INACTIVACIÓN

Otra forma de caracterización de la corriente diferencia, aparte de los parámetros cinéticos de la activación y la inactivación en estado estacionario, es analizar el tiempo que tarda en activarse la corriente y el curso temporal de la inactivación. Así obtenemos nuevas evidencias para la identificación de la corriente diferencia como I_{CaT} , ya que ambos parámetros ya han sido descritos para dicha corriente. Por otra parte, también se estudiaron los mismos parámetros para I_{CaL} con el fin de comparar ambas corrientes y observar las diferencias.

Para I_{CaT} , ambos parámetros se midieron en la corriente obtenida al pulso despolarizante de -40 mV desde el potencial de fijación de -90 mV, porque es precisamente en ese punto donde obtenemos una corriente de amplitud óptima y además nos asegura que es corriente I_{CaT} prácticamente pura ya que a ese mismo pulso despolarizante pero desde el potencial de fijación de -50 mV no se registra corriente alguna y la corriente diferencia sería igual que la obtenida a -90 mV. Se midió el tiempo desde el comienzo del pulso hasta el máximo de corriente (Tiempo al pico, T_p) y también se estudió la cinética de caída por el ajuste del trazo (desde el pico hasta el final del pulso) a una función matemática monoexponencial con una constante de tiempo, τ , y su amplitud correspondiente, A (ver sección de material y métodos para mayor explicación).

Sólo recordar en este apartado la ecuación a la cual se ajustó el curso temporal de la inactivación de I_{CaT} :

$$I_t = A \cdot \exp(-t/\tau) + A_c$$

Para I_{CaL} , se midió el T_p y la cinética de caída de la corriente, en los trazos de 0 mV al potencial de fijación de -50 mV, donde la corriente L es pura y está totalmente activada. Para esta corriente, la cinética de caída se ajustó a una función matemática

biexponencial con dos constantes de tiempo, una rápida (τ_f) y otra lenta (τ_s) y sus amplitudes correspondientes, A_f y A_s .

$$I_t = A_f \exp(-t/\tau_f) + A_s \exp(-t/\tau_s) + A_c$$

4.3.2.1 Tiempo al pico

El T_p de I_{CaT} resultó más rápido que para I_{CaL} , siendo de 5.50 ± 0.30 ms para I_{CaT} y en cambio para I_{CaL} fue de 7.21 ± 0.80 ms para células controles y 8.13 ± 0.30 ms para células hipertroficas, no siendo significativa la diferencia entre hipertrofia y control.

4.3.2.2. Curso temporal de inactivación

Después de la rápida activación, I_{CaT} mostró también una inactivación rápida con una τ de 41.98 ± 5.05 . I_{CaL} mostró una inactivación que fue inicialmente rápida, seguida de una caída más lenta hacia la línea de corriente cero. Las constantes de tiempo para ambas corrientes, junto con sus respectivas amplitudes y el T_p , vienen resumidas en la tabla 12. No se ven diferencias significativas en I_{CaL} entre control e hipertrofia.

Tabla 12. Parámetros del curso temporal de la activación y la inactivación.

	T_p (ms)	τ (ms)		A. (pA)		N
I_{CaT}	5.5±0.3	41.98±5.050		-215.50±30.15		32
	T_p (ms)	τ_f (ms)	τ_s (ms)	A_f (pA)	A_s (pA)	N
I_{CaL} control	7.2±0.8	13.9±1.2	90.7±12.9	-1920±169	-739±64.7	17
I_{CaL} hipertrofia	8.1±0.3	14.9±1.1	147.7±32.6	-3230±292	-710±58.4	32

T_p , tiempo al pico; τ , constante temporal de inactivación; A, amplitud; N, n° experimentos; τ_f , constante temporal rápida de inactivación; τ_s , constante temporal lenta de inactivación; A_f , A_s , amplitud de los componentes rápido y lento respectivamente.

4.3.3. PERMEABILIDAD DEL CANAL DE CALCIO

Algunas de las propiedades específicas de cada canal se derivan de su diferente comportamiento frente a los cationes inorgánicos. Tanto los canales de calcio tipo T como los de tipo L son permeables al Bario pero se comportan de diferente manera. Ha sido ampliamente documentado el efecto que produce la sustitución del calcio por el bario como ion transportador en los canales de calcio tipo L. Esta sustitución aumenta de manera muy notable la densidad de corriente de I_{CaL} , y retrasa marcadamente su inactivación (Bean, 1985; Argibay y cols., 1988; Alvarez y Vassort, 1992; Shorofsky y January, 1992; Sen y Smith, 1994).

En cuanto a I_{CaT} , sabemos que su inactivación se desarrolla de una manera monoexponencial con una estricta dependencia de voltaje y la cinética de inactivación es independiente del paso de calcio a través del canal. I_{CaT} se ha mostrado como una corriente independiente del ion transportador. Así, el Ba^{2+} puede sustituir al Ca^{2+} sin alterar su cinética de inactivación ni aumentar su conductancia, ya que éste es un canal que no presenta una inactivación dependiente de calcio (Bean, 1985; Hirano y cols., 1989; Tseng y Boyden, 1989; Vassort y Alvarez, 1994; Ertel y cols., 1997).

Por todo lo expuesto anteriormente, realizamos una serie de experimentos en los que sustituimos el calcio en el medio extracelular por una concentración equimolar de bario, y estudiamos la densidad máxima de corriente al despolarizar la membrana desde un PF de -50 mV hasta -10 mV (I_{CaL}) y desde un PF de -90 mV hasta -20 mV (I_{CaT}) en presencia de una solución extracelular que contenía 5 mM de calcio (barras blancas) ó 5 mM de bario (barras negras) (figura 24).

La densidad de corriente obtenida para I_{CaL} en el pico de corriente a -10 mV, utilizando Ca^{2+} como ion transportador de carga fue de -10.80 ± 1.5 pA/pF. Este valor se aumentó por encima del doble cuando sustituimos el Ca^{2+} por el Ba^{2+} , de manera que en estas condiciones la densidad de corriente fue de -24.80 ± 5.1 pA/pF, en 5 células hipertróficas. En cambio, la densidad de corriente obtenida en esas mismas 5 células para

I_{CaT} fue de -3.40 ± 0.32 pA/pF cuando el ion presente era Ca^{2+} y -3.20 ± 0.90 pA/pF cuando pusimos Ba^{2+} como ion transportador, medido en el pico de esta corriente a -20 mV. Es decir, el canal de calcio tipo T no presenta selectividad a bario frente al calcio y su conductancia permanece inalterada, mientras que el canal de calcio tipo L sí presenta dicha selectividad, aumentando su conductancia y permeabilidad al bario en un 129% frente al calcio.

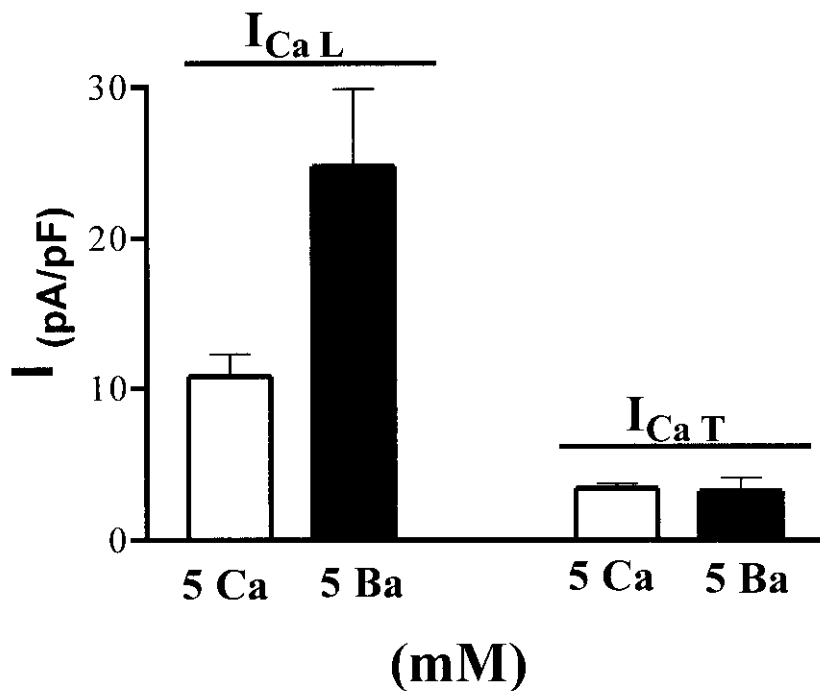


Figura 24. Densidad de corriente obtenida para I_{CaT} y I_{CaL} utilizando 5mM de calcio como ion transportador (barras blancas) o bario (barras negras). Las corrientes fueron medidas en el pico de corriente de la relación corriente-voltaje, -10 mV para I_{CaL} y -20 mV para I_{CaT} , en 5 células ventriculares hipertróficas. Datos representados como media \pm EEM.

La corriente de calcio tipo T, encontrada en las células ventriculares hipertróficas, se caracteriza por su dependencia del voltaje, su cinética y su no selectividad al bario frente al calcio. Además, por la superposición de las curvas de activación e inactivación, presenta una corriente ventana, que fluye entre los potenciales de -60 mV a -20 mV, importante en la posible relación de la corriente de calcio tipo T con la mayor incidencia de arritmias en la hipertrofia.

4.4. BLOQUEANTES DE LA CORRIENTE I_{CaT}

4.4.1. BLOQUEO POR NÍQUEL

Como ya se citó previamente en la introducción, numerosos estudios han demostrado que la corriente I_{CaT} , presenta una mayor sensibilidad al $NiCl_2$ que la corriente I_{CaL} (Nilius, 1985; Mitra y Morad, 1986; Hagiwara y cols., 1988; Furukawa y cols., 1992).

Por ello, en otra serie de experimentos, se estudió el efecto de una concentración de $50 \mu M$ de $NiCl_2$, sobre las corrientes de calcio y así obtener un dato más para la diferenciación y caracterización de I_{CaT} .

Un ejemplo típico del efecto inhibitorio de Ni^{2+} se muestra en la figura 25. En la figura 25A se muestran los trazos obtenidos de las corrientes de membrana de una célula hipertrófica, antes y después de la adición de $NiCl_2$ $50 \mu M$. Los pulsos despolarizantes a -40 mV desde un potencial de fijación de -90 mV pusieron de manifiesto una corriente de entrada que está ausente al potencial de fijación de -50 mV. De la sustracción de las corrientes que se obtuvieron a ambos potenciales de fijación se obtuvo I_{CaT} . Cuando se trató a la célula con Ni^{2+} , esta corriente fue prácticamente eliminada.

En la figura 25B, se describe la relación “densidad de corriente-voltaje” de las corrientes de Ca^{2+} obtenidas a los potenciales de fijación de -90 y -50 mV y la corriente diferencia obtenida en 7 células. En el panel izquierdo se demuestra la existencia de corriente I_{CaT} en los miocitos ventriculares hipertróficos (triángulos blancos), de manera similar a como se mostró en la sección anterior de los resultados. En el panel derecho de la figura, se muestra el efecto del Ni^{2+} . Tanto la corriente que se obtuvo al potencial de fijación de -90 mV (círculos negros) como la que se obtuvo a -50 mV (cuadrados negros), son muy semejantes y por tanto no hay corriente diferencia posible, es decir I_{CaT} es inhibida por el níquel.

Estos datos no hacen más que confirmar que la corriente de Ca^{2+} puesta de manifiesto a -50 mV consiste fundamentalmente en I_{CaL} , mientras que la corriente diferencia es efectivamente I_{CaT} .

El Ni^{2+} desplaza 10 mV la dependencia de voltaje hacia la derecha, es decir, a potenciales más positivos y disminuye fundamentalmente la corriente obtenida a -90 mV, mientras que la corriente I_{CaL} a -50 mV se ve disminuida en mucha menor medida.

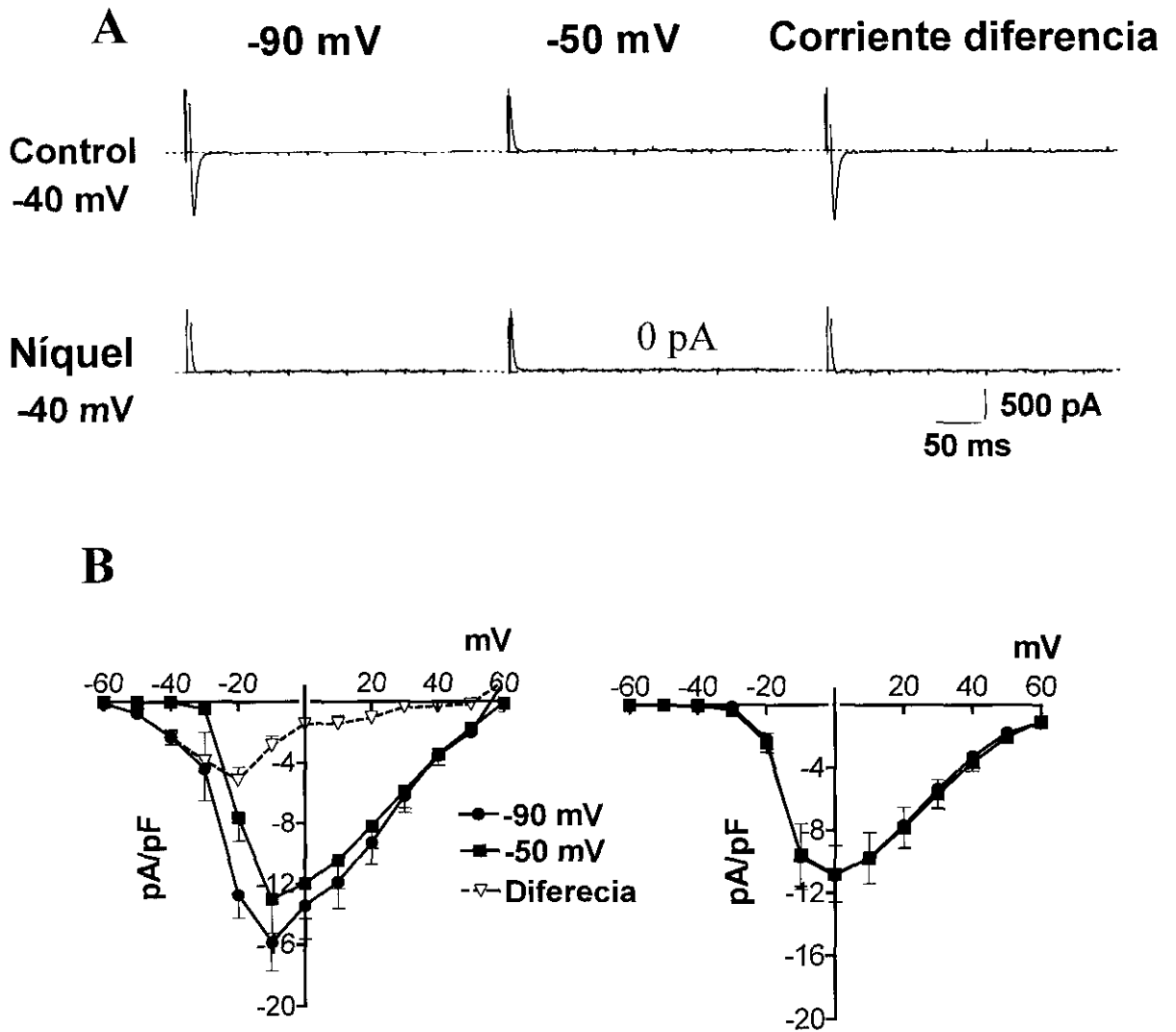


Figura 25. Efecto del Ni^{2+} sobre I_{CaT} y I_{CaL} . **A**, trazos representativos de las corrientes de Ca^{2+} registradas en una célula hipertrófica ventricular ($C_m = 370 \text{ pF}$), en ausencia y presencia de $\text{NiCl}_2 \text{ } 50\mu\text{M}$. **B**, relaciones “corriente-voltaje” de las corrientes de Ca^{2+} registradas a diferentes potenciales obtenidas en 7 células hipertróficas. A la izquierda se representan las corrientes en condiciones control y a la derecha en presencia de Ni^{2+} . Datos presentados en media \pm EEM.

4.4.2. BLOQUEO POR MIBEFRADILO

El mibefradilo es un nuevo bloqueante de los canales de calcio derivado del tetrazol, no perteneciente a ninguna de las familias clásicas de los antagonistas del calcio. En el momento de la realización de esta Tesis Doctoral, este fármaco estaba en pleno auge ya que se presentó como un bloqueante selectivo de los canales de calcio tipo T. Por ello, creímos conveniente estudiar el efecto del mibefradilo sobre I_{CaT} , para que nos confirmara una vez más la naturaleza de la corriente diferencia obtenida en las células hipertróficas, como I_{CaT} . Pero además, y en vista de los resultados que fuimos obteniendo, quisimos ver el efecto del mibefradilo sobre la corriente de calcio tipo L y poder caracterizar electrofisiológicamente el efecto sobre ésta.

4.4.2.1. Efecto sobre I_{CaT}

La corriente de calcio I_{CaT} , se midió en las células ventriculares aisladas de corazones hipertróficos y se puso de manifiesto siguiendo los protocolos antes explicados en el capítulo de “Material y Métodos. Se aplicaron pulsos despolarizantes desde dos potenciales de fijación diferentes, -90 mV y -50 mV, de 300 ms de duración a intervalos de tiempo de 6 s entre pulsos. 14 pulsos despolarizantes desde -80 mV a +60 mV desde un PF de -90 mV, donde se obtiene un registro de corriente de calcio que es mezcla de corrientes I_{CaT} e I_{CaL} , y 11 pulsos despolarizantes desde -40 mV a +60 mV desde un PF de -50 mV, obteniéndose una corriente de calcio que es I_{CaL} pura. De la substracción de los pulsos obtenidos a ambos potenciales obtenemos I_{CaT} . Tras la obtención del registro control la célula se perfundió con la misma solución pero con una concentración añadida de 1 μ M de mibefradilo. Después de 5 min. de perfusión con el fármaco (para asegurarnos su efecto), se volvió a repetir el protocolo experimental.

En estas condiciones, se observa como el mibefradilo produjo una inhibición prácticamente total de la corriente I_{CaT} , como vemos en la figura 26 donde se muestran los trazos de corriente al pulso despolarizante de -40 mV, en una célula hipertrófica representativa del total. Previamente al paso del fármaco, se observó una corriente al PF de -90 mV que no estaba presente al PF de -50 mV y que por tanto, al hacer la diferencia, originaba una corriente que era I_{CaT} . Una vez que el mibefradilo hace efecto esta corriente quedó casi abolida. Si posteriormente se lava el efecto del fármaco pasando la solución de registro libre de mibefradilo durante 5-10 min., la corriente I_{CaT} se recupera parcialmente.

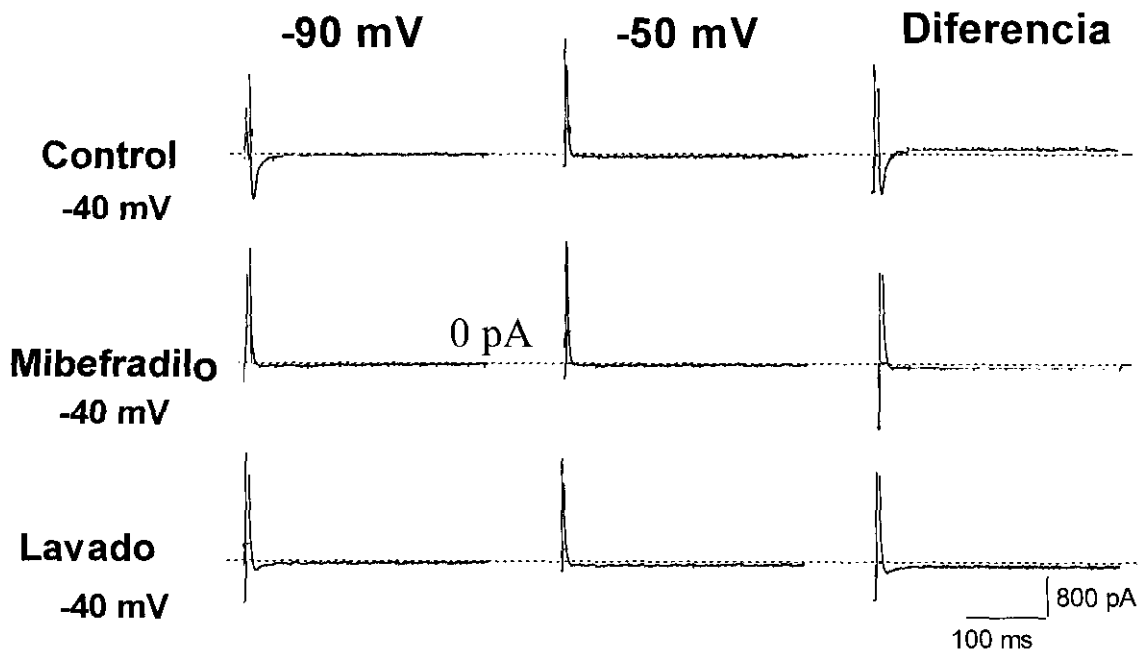


Figura 26. Trazos representativos de la corriente de calcio tipo T a -40 mV en ausencia y presencia de mibefradilo y tras 10 min. de lavado, en una célula hipertrófica ($C_m = 273$). El mibefradilo produce una inhibición de la corriente casi total que comienza a recuperarse tras el lavado.

La curva de densidad de corriente en relación con el voltaje se pudo realizar sin ningún problema en el registro de las corrientes control previo al paso de mibefradilo, en un total de 10 células hipertróficas. Al intentar realizar la misma curva para el efecto de mibefradilo nos encontramos con que se puede realizar la curva densidad de corriente-voltaje tanto para el potencial de fijación de -90 mV como para -50 mV, pero no para la diferencia o corriente I_{CaT} , ya que se observa que el efecto del mibefradilo es dependiente de voltaje, actuando de forma diferente a -90 mV que a -50 mV, y así la diferencia se obtiene tal y como se muestra en la figura 27.

Por todo ello, no podemos ver el efecto del mibefradilo sobre la corriente I_{CaT} a todos los potenciales y sólo nos valemos del efecto que produce a -40 mV en el potencial de fijación de -90 mV. A ese potencial el valor medio de I_{CaT} en un total de 10 células en condiciones controles es de -0.84 ± 0.30 pA/pF y tras la perfusión con mibefradilo se produce una inhibición significativa a -0.14 ± 0.04 pA/pF, es decir, la inhibe en un 83% (figura26).

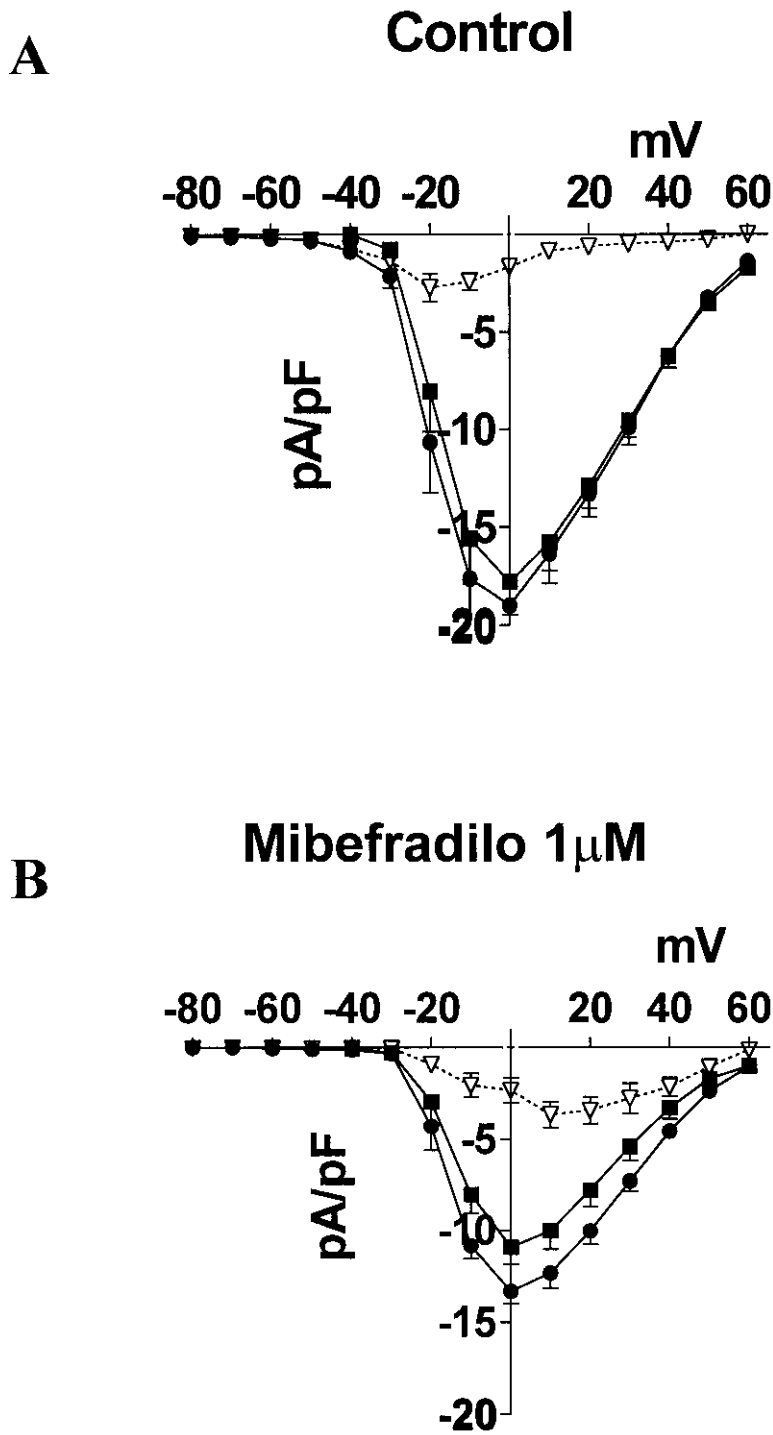


Figura 27. Relación densidad de corriente-voltaje **A**, en control y **B**, tras la perfusión con mibefradilo, en 10 células hipertróficas. ●, a -90 mV; ■, a -50 mV; ▽, corriente diferencia. Los datos se representan como media \pm EEM.

4.4.2.2. Efecto sobre I_{CaL}

Relación densidad de corriente-voltaje

Estudiando el efecto de mibefradilo sobre la corriente I_{CaL} en estas células hipertróficas obtenemos los resultados expuestos en la figura 28. El efecto de mibefradilo depende del potencial de fijación, de manera que es más potente bloqueando la corriente L desde el PF de -50 mV, donde prácticamente en todos los puntos produce una inhibición significativa, mientras que a -90 mV sólo produce una inhibición significativa en los pulsos en los que esta muy presente el canal de calcio tipo T y después a pulsos más despolarizantes aunque disminuye la corriente no lo hace de forma estadísticamente significativa.

El porcentaje de inhibición de la corriente I_{CaL} por efecto del mibefradilo $1\mu\text{M}$, fue de un 50% al pulso de 0 mV para el PF de -50 . En cambio al PF de -90 mV en la hipertrofia la inhibición de I_{CaL} fue únicamente de un 30%.

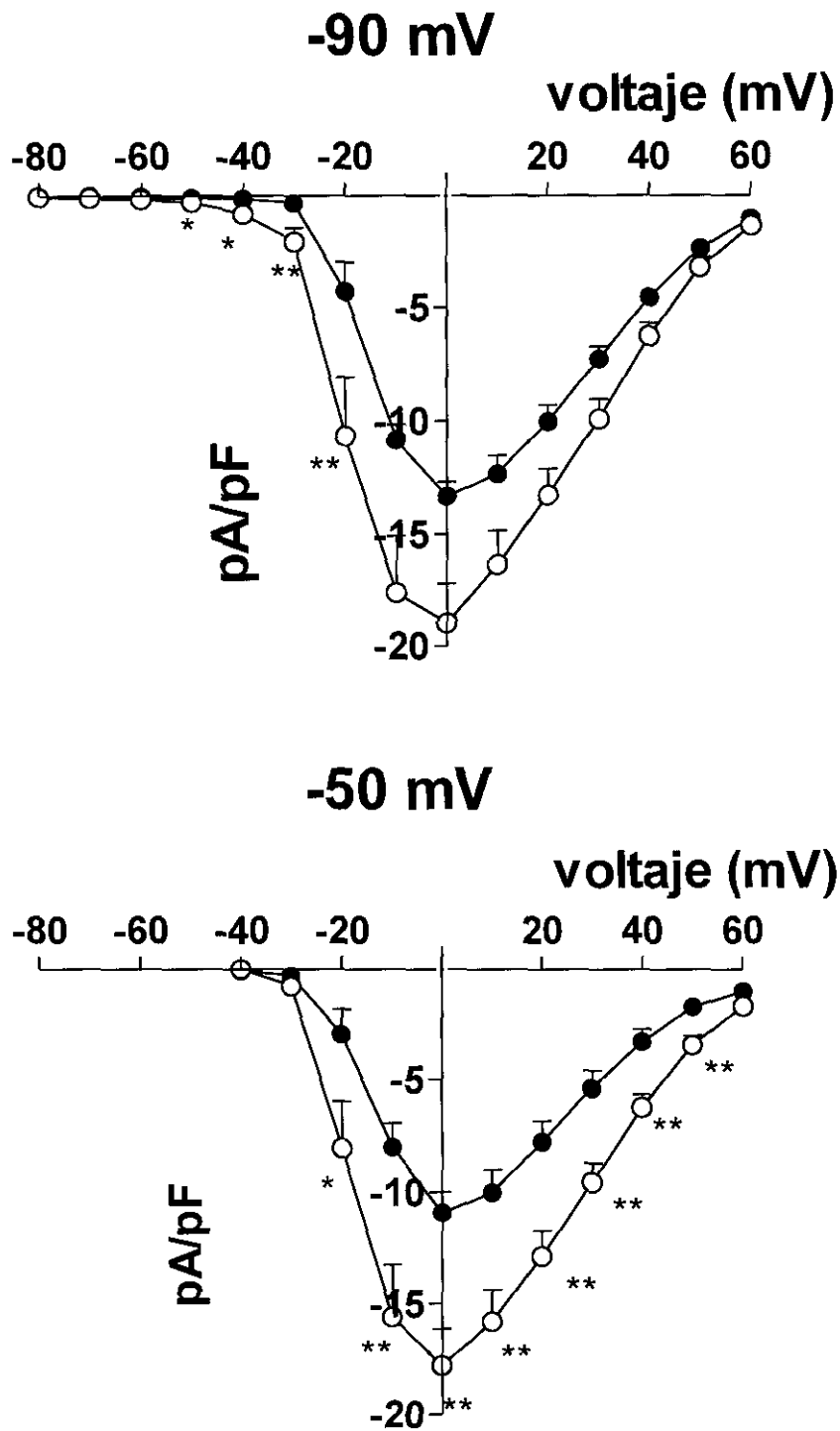


Figura 28. Comparación del efecto de mibefradilo a los PFs de -90 y -50 mV sobre la corriente I_{Cat} en células hipertróficas ($n = 10$). \circ , control; \bullet , mibefradilo. Datos presentados en media \pm EEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$.

Inactivación en estado estacionario

La inactivación en estado estacionario se determinó con el protocolo de doble pulso, expuesto anteriormente en la sección de “Material y Métodos”. Desde un potencial de membrana de -90 mV, se dieron pulsos preconditionantes de 200 ms de duración en incrementos de 10 mV desde -80 mV a $+60$ mV. Después de cada uno de estos pulsos se volvió al PF durante 3 ms y posteriormente se dio un pulso test de 0 mV de 200 ms de duración. Los datos se normalizaron dividiendo la corriente obtenida en cada pulso entre la corriente obtenida de mayor valor. Los resultados se ajustaron a una función de distribución de Boltzmann para la obtención de la V_{50} (valor al que se produce el 50 % de inactivación) y K (pendiente de la curva en el punto de inflexión).

Este estudio se realizó en 9 células hipertróficas para observar si existe algún cambio en la inactivación en estado estacionario por efecto del mibefradilo.

Las curvas de inactivación se presentan en la figura 29. La inactivación es función del potencial de membrana en células hipertróficas. En todas las células la corriente disminuyó cuando el pulso preconditionante fue desde -60 mV a $+20$ mV, pero a potenciales por encima de ese valor aumentó. El potencial al cual la corriente se inactivó al 50% y la pendiente de la curva de inactivación no fueron diferentes en ausencia y presencia de mibefradilo. Los valores medios se resumen en la tabla 13.

Tabla 13. Parámetros de la inactivación de I_{CaL} en 9 células hipertróficas en ausencia y presencia de mibefradilo.

	CONTROL		MIBEFRAILO		N
	V_{50} (mV)	K	V_{50} (mV)	K	
Hipertrofia	-22.50 ± 1.30	-4.90 ± 0.30	-21.40 ± 1.52	-4.80 ± 0.40	9

Los valores están expresados en media \pm EEM.

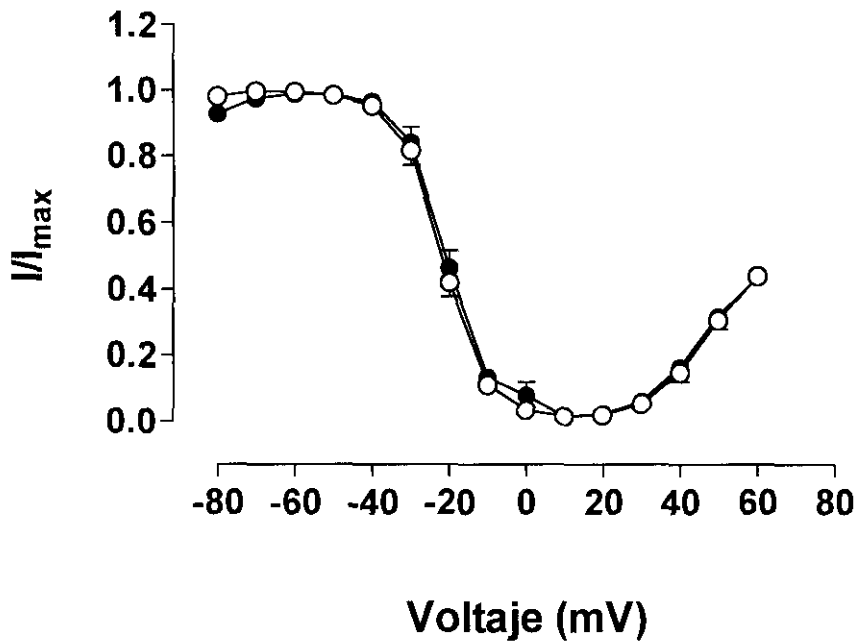
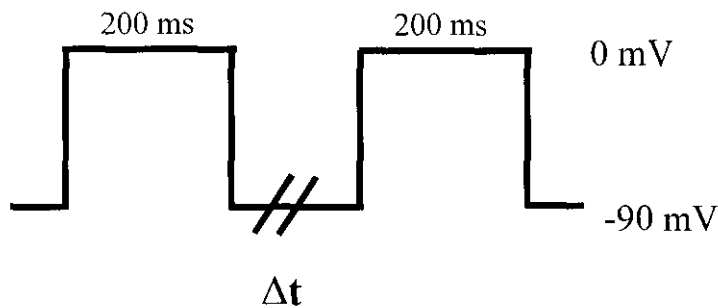


Figura 29. Dependencia de voltaje de la inactivación en estado estacionario en 9 células hipertróficas. En círculos blancos se representan los valores en ausencia de mibefradilo y en círculos negros, los valores tras la perfusión de $1 \mu\text{M}$ de mibefradilo. Valores presentados en media \pm EEM.

Cinética de reactivación

La reactivación es un parámetro que analiza el tiempo empleado para la recuperación de los canales de calcio desde la inactivación. Se analizó siguiendo un protocolo de doble pulso que a continuación se detalla. Desde un potencial de fijación de -90 mV, dos pulsos de 200 ms de duración a 0 mV se separaron por una vuelta al PF durante un tiempo que varió de 5 a 3000 ms (Δt). La corriente registrada fue la correspondiente al segundo pulso de cada grupo de dos. La curva de reactivación se obtuvo graficando en abcisas el tiempo en ms y en ordenadas los valores resultantes de dividir la amplitud de la corriente obtenida en el segundo pulso despolarizante a 0 mV a cada intervalo, entre la amplitud de I_{CaL} obtenida cuando el intervalo fue de 3000 ms.



Los datos obtenidos se representan en la figura 30. Todas las células hipertróficas presentaron el mismo patrón de reactivación, con un “overshoot”, es decir, un valor por encima del valor control, entre 100 y 1000 ms. El mibefradilo no produjo cambios en la cinética de reactivación del canal L.

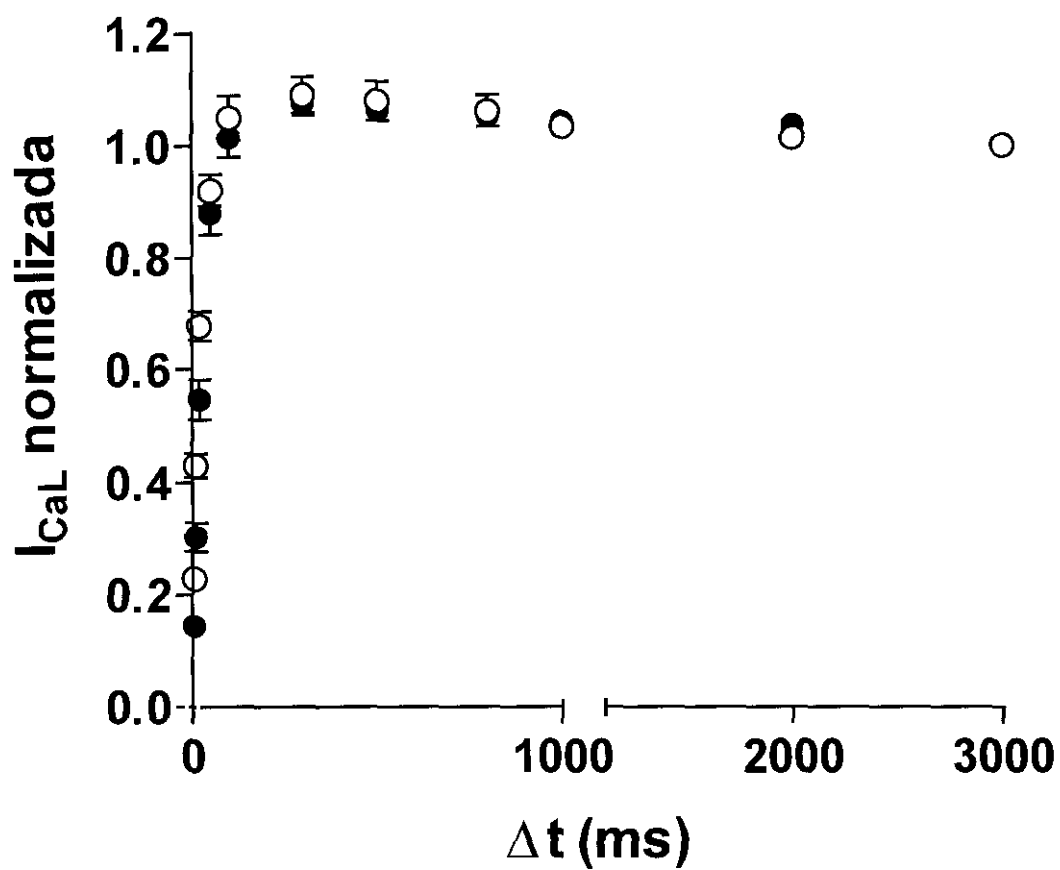


Figura 30. Reactivación de I_{CaL} en función del tiempo, en 7 células hipertróficas. ○, indican los valores en ausencia de mibefradilo; ●, indican los valores en presencia de 1 μ M de mibefradilo. Los datos se presentan como media \pm EEM.

Frecuencia dependencia y efecto tónico del mibefradilo sobre I_{CaL} .

Los fármacos antagonistas del calcio, presentan un efecto dependiente de la frecuencia de estimulación. Si se aumenta la frecuencia de estimulación (bloqueo frecuencia-dependiente), los canales de calcio permanecen más tiempo en estado activo/inactivo que en reposo, por lo que el bloqueo de fármacos que tengan afinidad por el estado inactivo del canal se verá aumentado a frecuencias altas, mientras que a frecuencias lentas su capacidad para inhibir la corriente de calcio también disminuye. Este es caso del verapamil o del diltiazem. En cambio, este bloqueo frecuencia dependiente es menos marcado en las dihidropiridinas. Esto explica por qué la depresión el nodo aurículo-ventricular, producida por verapamil o diltiazem, es tanto mayor cuanto más rápida es la frecuencia de estimulación, mientras que las dihidropiridinas apenas si modifican la frecuencia sinusal, y por tanto, no son efectivas en el tratamiento de las arritmias supraventriculares.

Por todo lo expuesto anteriormente, quisimos ver si el mibefradilo, al igual que otros antagonistas del calcio, era también un fármaco susceptible de producir un efecto frecuencia dependiente, y de que modo ejercía este efecto sobre la corriente I_{CaL} .

Para estudiar el efecto de frecuencia dependencia del mibefradilo, se utilizó el siguiente protocolo. En condiciones de registro controles, se aplicó un tren de 10 pulsos a 0 mV desde un potencial de fijación de -50 mV, a una frecuencia de 0.125 Hz. Después, se paró la estimulación durante 3 min., manteniendo a la célula al PF de -50 mV. Durante ese tiempo la célula fue perfundida primero con solución control o con la solución con el fármaco. Transcurridos los tres min., se reinició la estimulación con un tren de 30-35 pulsos a 0 mV, a una frecuencia más alta de 1 Hz.

El **bloqueo tónico** se consideró como el valor de la diferencia entre la amplitud de corriente en control y la amplitud de corriente del primer pulso después de la perfusión con mibefradilo.

El bloqueo, **frecuencia dependencia**, se consideró como el valor de la diferencia entre la amplitud de corriente del primer pulso y la amplitud en el pulso 30 después de la perfusión con mibefradilo. Normalmente las corrientes de calcio producen un escalón después del comienzo de la estimulación, con un aumento abrupto de la frecuencia de estimulación (McDonald y cols., 1986).

El **bloqueo total** del fármaco se consideró como el valor de la diferencia entre la amplitud del pico de la corriente de calcio en el pulso número 20 ó 30 tras la perfusión con solución control menos la amplitud de corriente en el pulso 20 ó 30 tras la perfusión con mibefradilo.

Un ejemplo de los efectos de frecuencia de mibefradilo 1 μM , se muestra en la figura 31, en una célula hipertrófica representativa del canal. El efecto de bloqueo y de frecuencia se observó en un total de 11 células hipertróficas.

El primer pulso de I_{CaL} , que se registró tras el periodo de descanso, en presencia de mibefradilo 1 μM , presentó un importante bloqueo tónico importante de un 67 % en hipertrofia. Después de la estimulación a una frecuencia más alta, I_{CaL} disminuyó también pero de una manera más moderada, de modo que el efecto de la frecuencia fue de un 32 % . Por último, el bloqueo total del mibefradilo a esa dosis sobre la I_{CaL} fue de un 43 %. Estos datos vienen resumidos en el diagrama de barras de la figura 32.

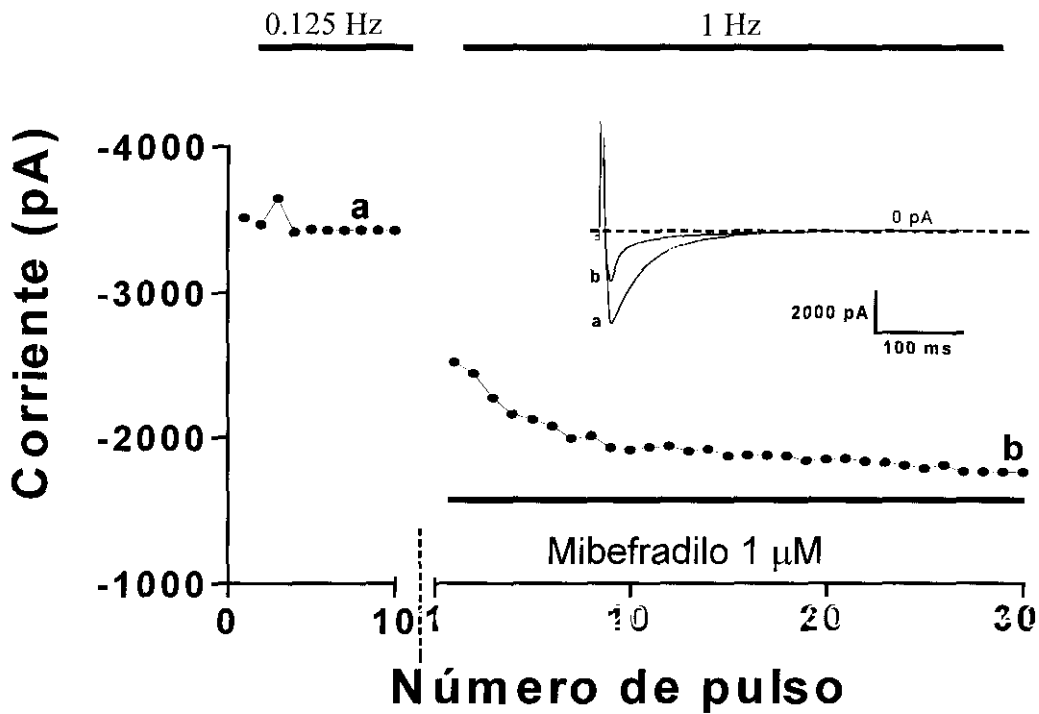


Figura 31. Efecto tónico y de frecuencia dependencia del mibefradilo 1 μ M sobre la I_{CaL} , en una célula hipertrofica. Los puntos representan la amplitud de corriente en función del número de pulso. Las barras en la parte de arriba de la figura indican la frecuencia de estimulación.

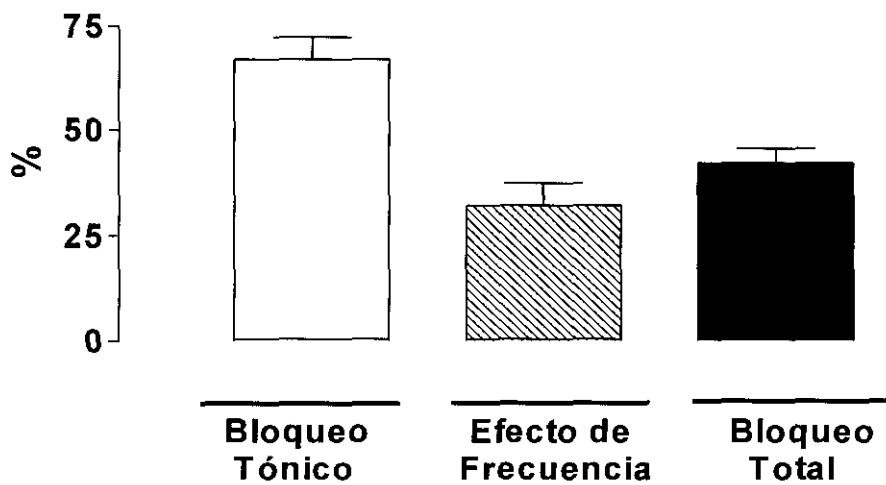


Figura 32. Resumen del efecto tónico y frecuencia dependencia del mibefradilo sobre I_{CaL} en la hipertrofia, en un total de 11 células. Datos presentados como media \pm EEM.

Curso temporal de la inactivación

También en estas células ventriculares hipertróficas, quisimos ver el efecto de mibefradilo sobre el curso temporal de la inactivación de I_{CaL} . Así, se ajustó el trazo a 0 mV (desde el pico de corriente hasta el final del pulso), a una función biexponencial, con dos constantes de tiempo, una rápida (τ_f) y otra lenta (τ_s) (ver protocolo detallado en la sección “Material y Métodos”).

La corriente de calcio tipo L muestra una inactivación que es inicialmente rápida, seguida de una caída más lenta hacia la línea de corriente cero. Las dos constantes de tiempo (rápida y lenta) están representadas en la figura 33, para 16 células hipertróficas, en ausencia y en presencia de mibefradilo 1 μ M.

En las células ventriculares hipertróficas no hay cambios en los valores de la τ_s tras la perfusión con mibefradilo (control: 189 ± 40.4 ; mibefradilo: 141.6 ± 21.5). Por el contrario, sí hay un cambio en la τ_f , de manera que tras la perfusión con mibefradilo ésta se hace mayor, es decir se enlentece la caída rápida de la inactivación (control: 10.50 ± 1.00 ; mibefradilo: 13.10 ± 1.41 , $p < 0.01$).

El hecho de que la corriente diferencia obtenida en las células ventriculares hipertróficas se inhiba efectivamente en presencia de níquel y de mibefradilo confirma , una vez más, a dicha corriente diferencia como I_{CaT} .

Por otro lado el mibefradilo es capaz de inhibir la corriente I_{CaL} sin modificación de la cinética de la corriente. Además El efecto del mibefradilo sobre I_{CaL} depende del potencial de reposo utilizado, observandose un bloqueo más potente a -50 mV que a -90 mV y muestra un efecto tónico de un 67% y un efecto frecuencia dependiente de un 32%.

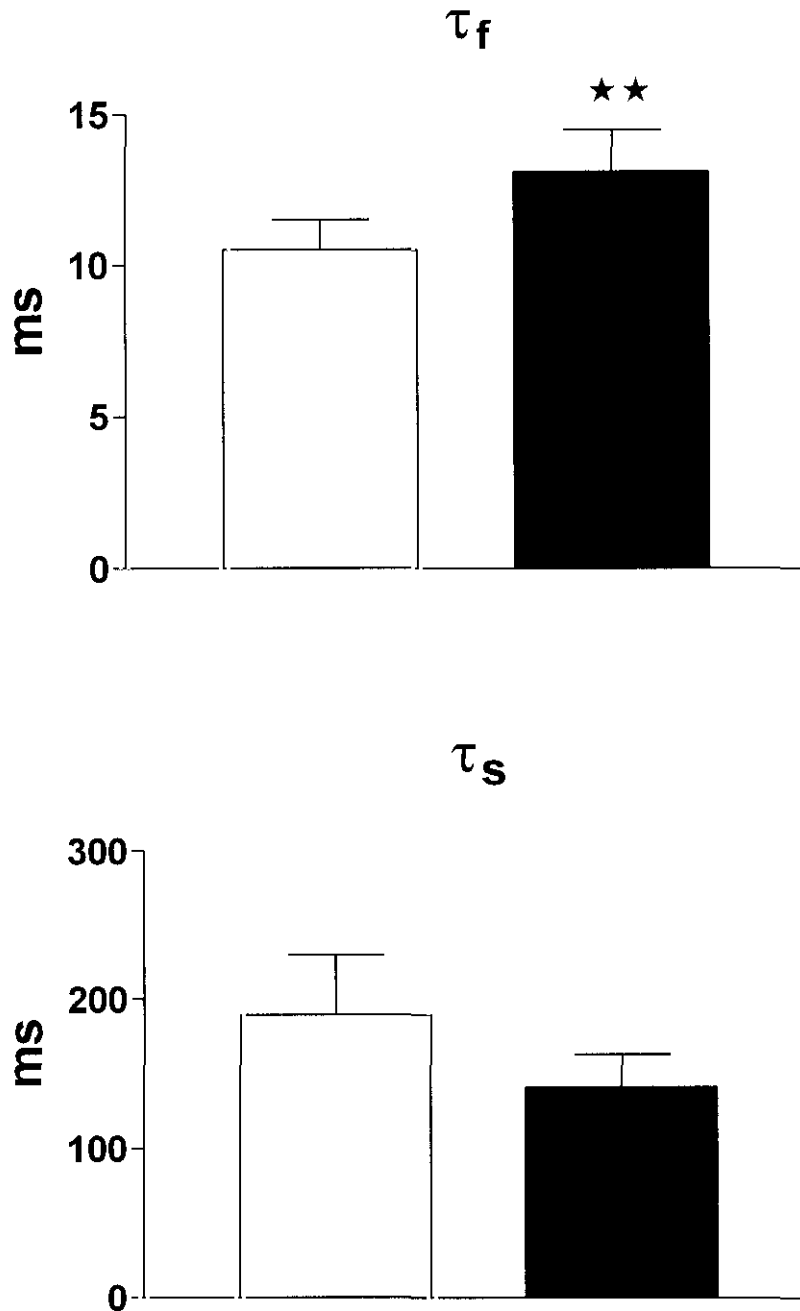


Figura 33. Constantes de tiempo de la inactivación rápida (τ_f) y lenta (τ_s) en 16 células hipertróficas. Las barras blancas son los valores en ausencia de fármaco y las barras negras en presencia de $1\mu\text{M}$ de mibefradilo. Valores en media \pm EEM. **, $p < 0.01$ control vs mibefradilo.

4.5. MODULACIÓN FARMACOLÓGICA DE I_{CaT}

La modulación farmacológica es otra forma de distinguir unos canales de calcio de otros. Se conoce muy ampliamente y de manera bastante concisa la sensibilidad a múltiples agentes farmacológicos y transmisores en el caso de los canales de calcio tipo L, pero la modulación del canal T no está aún muy bien descrita y existen pocos estudios en este campo. Además, los resultados obtenidos en muchos casos son polémicos sin llegar a una idea clara de la acción de determinadas sustancias sobre la corriente I_{CaT} . De hecho, la falta de una sustancia que bloquee selectivamente I_{CaT} , no ha facilitado la labor de caracterización del canal y su modulación. De cualquier forma, la búsqueda de este tipo de sustancias en los últimos años ha mostrado una variedad importante de fármacos capaces de modificar I_{CaT} .

En esta Tesis Doctoral hemos estudiado la modulación farmacológica de I_{CaT} , por una serie de fármacos y neurotransmisores, así como péptidos internos cuya acción sobre el canal L está ya bien documentada, pero que a nivel del canal T, resulta poco clara o contradictoria.

4.5.1. NIFEDIPINO Y BAY K8644

Los antagonistas del calcio de tipo dihidropiridina son unos de los más potentes bloqueantes de los canales de calcio. A pesar de que los primeros artículos publicados indicaban una falta de sensibilidad de las dihidropiridinas agonistas y antagonistas por el canal T, con el tiempo varios artículos han descrito una inhibición de I_{CaT} , utilizando concentraciones semejantes a aquellas utilizadas para la inhibición del canal L (Bean, 1985; Akaike y cols., 1989; Bonvallet y Rougier, 1989; Hirano y cols., 1989; Loirand y cols., 1989; Tseng y Boyden, 1989; Kuga y cols., 1990; Bois y Lenfant, 1991; Takahshi y Akaike, 1991; Alvarez y vassort, 1992; Cohen y cols., 1992; Romain y cols., 1992; Wu y cols., 1992; Rubio y cols., 1993; Ertel y cols., 1997).

También es cierto que hay una amplia gama de dihidropiridinas y no todas presentan el mismo porcentaje de inhibición y no para todas I_{CaT} se muestra igual de sensible. Las dihidropiridinas elegidas en nuestro estudio han sido el nifedipino, una dihidropiridina antagonista y el BAY K 8644, una dihidropiridina agonista, a la concentración de 1 μ M.

4.5.1.1. Nifedipino

Los protocolos utilizados para la obtención de la corriente T son los mismos que los utilizados en casos anteriores, al igual que la forma de obtención de la relación densidad de corriente voltaje. En la figuras siguientes, únicamente mostramos ya el efecto de los fármacos sobre I_{CaT} , por lo que se muestra la relación densidad de corriente-voltaje sólo para la corriente T diferencia. El fármaco se añadió a la solución de perfusión y se dejó actuar durante 5-10 min.

El nifedipino se preparó haciendo previamente una solución madre concentrada disuelta en DMSO, de la que se fueron haciendo diluciones posteriores hasta alcanzar la concentración final, (de este modo, la cantidad de DMSO presente en nuestra solución de perfusión era la mínima posible). Todos los experimentos se realizaron en oscuridad ya que es un fármaco sensible a luz.

Los resultados obtenidos para el nifedipino se muestra en la figura 34. El nifedipino produjo una inhibición marcada de la corriente I_{CaT} . La densidad en el pico de corriente a -20 mV en condiciones controles fue de -5.20 ± 0.83 pA/pF, valor que disminuyó hasta -1.75 ± 0.28 pA/pF tras la perfusión del fármaco durante 5 min. Por tanto, produjo alrededor de un 77% de inhibición de I_{CaT} en 6 células ventriculares hipertróficas. Para evitar posible errores por contaminación con corriente I_{CaL} , vemos como la inhibición de I_{CaT} a -40 mV es muy semejante alrededor del 80% (control: -2.12 ± 0.62 pA/pF; nifedipino: -0.37 ± 0.04 pA/pF). Como era de esperar, el nifedipino, también produjo una inhibición del 75% en la corriente I_{CaL} , ya que a 0 mV desde el PF de -50 mV (potencial al que solo se pone de manifiesto I_{CaL}) se produjo una disminución de la corriente desde -6.47 ± 0.99 pA/pF, valor control, a -1.64 ± 0.34 pA/pF, con nifedipino. Este resultado es consistente con las observaciones hechas por

otros autores con nifedipino 1 μM sobre el canal T en diferentes tejidos (Akaike y cols., 1989; Alvarez y Vassort, 1992; Wu y cols., 1992).

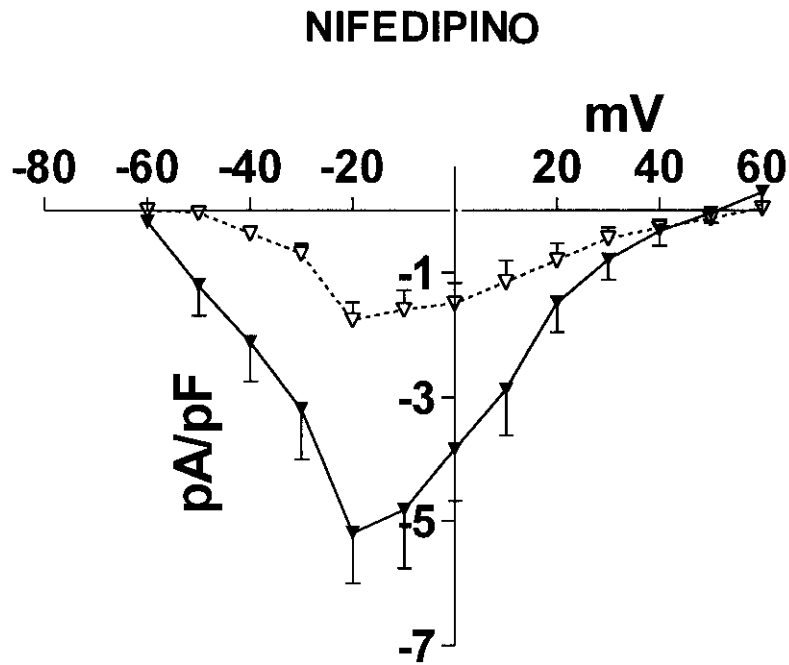


Figura 34. Efecto de nifedipino 1 μM sobre la corriente I_{CaT} . Datos presentados como media \pm EEM (n = 6). ▼, en control; ▽, en presencia del fármaco.

4.5.1.2. BAY K 8644

Otra evidencia del diferente comportamiento farmacológico del canal T frente al L proviene de los experimentos con BAY K8644, una dihidropiridina que ha demostrado tener efectos agonistas sobre los canales de calcio ya que aumenta significativamente la corriente I_{CaL} (Hess y cols., 1984).

El BAY K8644 se preparó disolviéndolo primeramente en DMSO para la obtención de una solución madre a partir de la cual se hicieron las diluciones pertinentes hasta alcanzar la concentración final de $1\mu\text{M}$. Tanto su preparación como la realización de los experimentos se llevaron a cabo en completa oscuridad debido a la extrema sensibilidad del fármaco a luz. La corriente I_{CaT} se puso de manifiesto siguiendo el mismo protocolo experimental que en casos anteriores.

El efecto del BAY K8644 se obtuvo en 6 células ventriculares hipertróficas y queda expuesto en la figura 35. El BAY K8644 no produjo ningún efecto sobre la corriente I_{CaT} , de manera que en condiciones controles, la media de los valores obtenidos para I_{CaT} a -40 mV y en el pico de corriente a -20 mV fueron de $-0.99 \pm 0.27\text{ pA/pF}$ y $-3.11 \pm 0.53\text{ pA/pF}$ respectivamente. Una vez que se perfundió la célula durante 5-10 min. con BAY K8644, los valores obtenidos de I_{CaT} a esos mismos potenciales fueron de $-0.88 \pm 0.18\text{ pA/pF}$ (-40 mV) y $-3.42 \pm 0.80\text{ pA/pF}$ (-20 mV), sin producir cambios en la dependencia de voltaje.

La figura 35^a muestra los trazos de corriente obtenidos, en una célula hipertrófica representativa del total, cuando el pulso test fue de -40 mV , en situación control y después de perfundir la célula con BAY K8644 $1\mu\text{M}$. Se observa como desde el PF de -90 mV existe una corriente de entrada que no se ve al PF de -50 mV y que al hacer la substracción se manifiesta como I_{CaT} . Tras la perfusión con BAY K8644 $1\mu\text{M}$ la corriente permanece casi inalterada y los trazos son semejantes a los encontrados en condiciones controles.

La corriente I_{CaL} , como ya había sido descrito, se vio aumentada por la acción del BAY K8644 $1 \mu\text{M}$. Así en el pico de corriente al PF de -50 mV obtenemos un valor de $-13.50 \pm 0.95 \text{ pA/pF}$ en condiciones controles que se ve aumentado hasta $-19.00 \pm 1.91 \text{ pA/pF}$ con el fármaco.

El efecto del BAY K8644 sobre I_{CaT} ha sido estudiado también por otros autores, en diferentes tipos de preparaciones, y apoyan los resultados presentados en esta Tesis Doctoral (Bean, 1985; Mitra y Morad, 1986; Bonvallet y Rougier, 1989; Hirano y cols., 1989). En cambio, en otros casos han visto que la corriente I_{CaT} se ve aumentada por efecto del BAY K8644 $1 \mu\text{M}$, pero en menor medida que la corriente I_{CaL} (Alvarez y Vassort, 1992).

También estudiamos la acción del BAY K8644 sobre la inactivación en estado estacionario del canal T por acción del BAY K8644 y el curso temporal de la inactivación.

El BAY K8644, no afecta la inactivación en estado estacionario del canal T (Figura 36) ya que ambas curvas, en presencia y ausencia del fármaco están superpuestas. Los valores de la V_{50} y K fueron obtenidos ajustando los valores normalizados a una función distribución de Boltzmann, siendo el valor de la V_{50} $-60.63 \pm 3.49 \text{ mV}$ y $-61.20 \pm 4.50 \text{ mV}$ en control y con BAY K8644 respectivamente; y el valor de la pendiente K fue de -7.62 ± 1.68 y -8.47 ± 3.07 en control y con BAY K8644 ($n = 6$).

El BAY K8644 tampoco afectó al curso temporal de la inactivación por ajuste del trazo a -40 mV a una curva monoexponencial con una constante de tiempo (τ) y su amplitud correspondiente. Los valores se describen en la tabla 14.

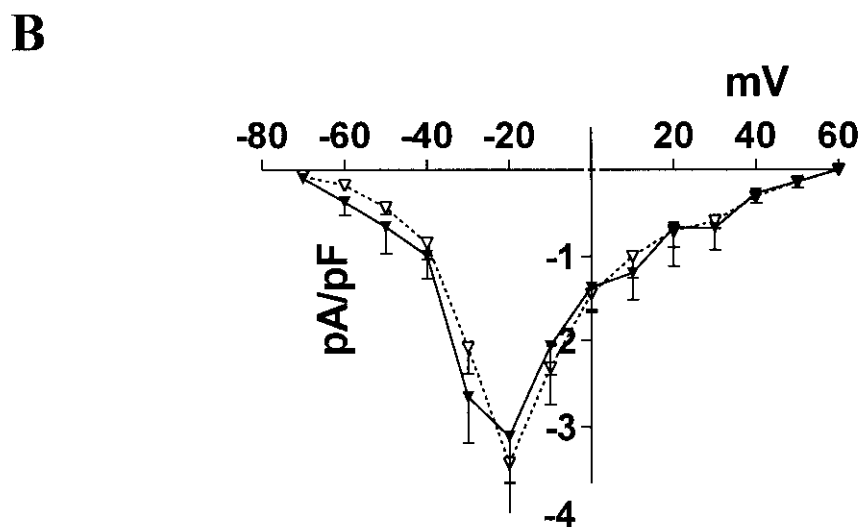
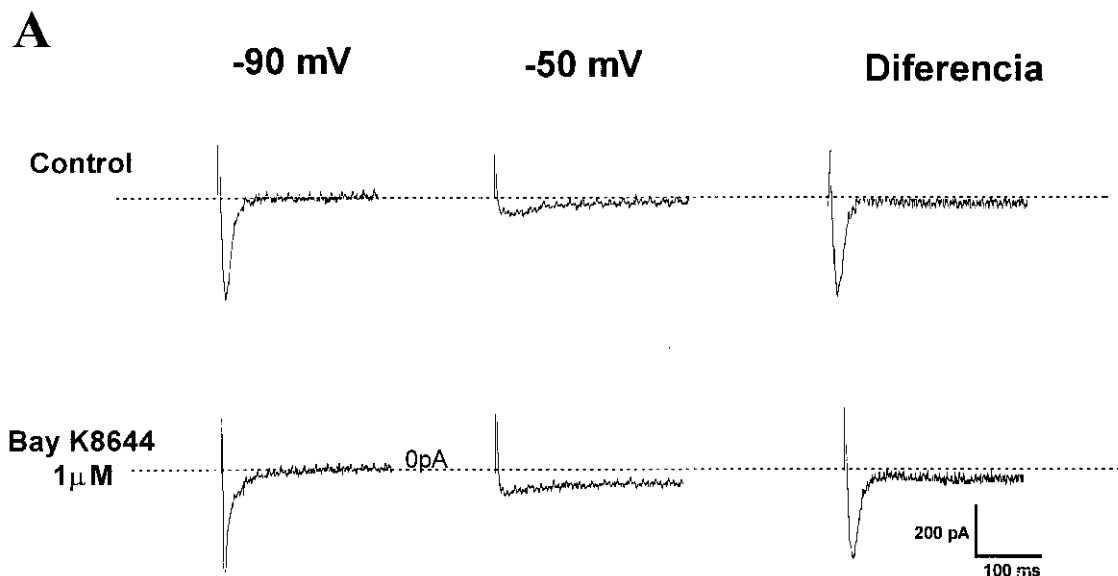


Figura 35. Efecto del BAY K8644 sobre la corriente I_{CaT} . **A**, trazos a -40 mV desde un PF de -90 mV y -50 mV y la corriente diferencia en control y tras la perfusión con el fármaco en una célula hipertrófica representativa del total. **B** Relación densidad de corriente-voltaje de I_{CaT} en ausencia (\blacktriangledown) y en presencia de BAY K8644 (\triangledown). Datos presentados como media \pm EEM

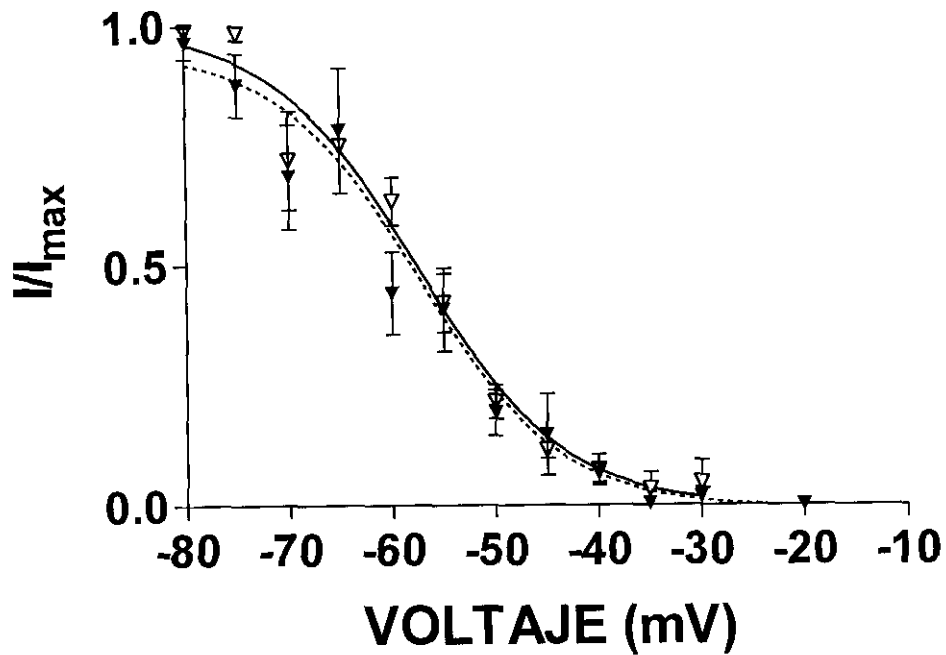


Figura 36. Curva de inactivación en estado estacionario de I_{CaT} en control (▼) y con BAY K8644 (▽) $1\mu\text{M}$ en 6 células hipertróficas. Datos ajustados a una ecuación de Boltzmann y presentados como media \pm EEM.

Tabla 14. Parámetros del curso temporal de la inactivación de la corriente I_{CaT} a -40 mV en ausencia y presencia de BAY K8644 $1\mu\text{M}$

	CONTROL	BAY K8644
τ (ms)	24.51 ± 8.167	32.27 ± 9.119
Amplitud (pA)	-402.9 ± 103.4	-386.2 ± 105.6
N	6	6

4.5.2. EFECTO DE PÉPTIDOS INTERNOS NEUROTRANSMISORES

Numerosos neurotransmisores y péptidos internos parecen alterar la corriente I_{CaT} (Vassort y Alvarez, 1994; Ertel y cols., 1997). En esta Tesis Doctoral nos hemos centrado en el estudio de dos péptidos, la angiotensina II y la endotelina 1, sustancias que parecen modular las corrientes de calcio (Ono y cols., 1994; Thomas y cols., 1997; Zhu y cols., 1997) y estar relacionadas con procesos de hipertrofia (Aceto y Baker, 1990; Shubetia y cols., 1990; Ito, 1997; Moreau, 1998; Wollert y Drexler, 1999).

Para ambas sustancias hemos estudiado su efecto sobre la corriente I_{CaT} en sí, sobre la inactivación en estado estacionario y sobre el curso temporal de la inactivación.

4.5.2.1. Angiotensina II

La angiotensina II (Ang II) es un péptido formado por 8 aminoácidos procedente de la activación de la angiotensina I por el enzima de conversión de angiotensina. La Ang II puede alterar la función cardíaca mediante modificación del tono vascular coronario, por un efecto directo sobre los receptores o por promover la hipertrofia cardíaca (Johnston, 1990). En el músculo cardíaco, la Ang II incrementa la contractilidad, pudiendo estar dicho efecto mediado por mecanismos directos o indirectos (Lindpaintner y cols., 1988). Además, se ha comprobado que la Ang II aumenta la disfunción diastólica en corazones aislados de conejo, ejerciendo un efecto directo adverso en la disfunción diastólica durante los procesos de isquemia reperusión (Mochizuki y cols., 1992). También, se ha implicado a la Ang II en el desarrollo de hipertrofia cardíaca. Se ha demostrado que la Ang II es un potente estímulo directo para la síntesis de proteínas y crecimiento celular (Aceto y Baker, 1990) y estudios realizados sobre la reversión de la hipertrofia con IECAs indican que la Ang II desempeña un papel importante en la hipertrofia cardíaca (Pfeffer y cols., 1982; Baker y cols., 1990; Schelling y cols., 1991) (ver introducción).

Debido a la relación entre el canal de calcio tipo T y los procesos de crecimiento, entre ellos la hipertrofia cardiaca, y debido también a la relación entre la Ang II, la hipertrofia y la modulación de las corrientes eléctricas por este péptido, decidimos estudiar el efecto de este péptido sobre I_{CaT} en nuestras condiciones experimentales.

Las corrientes se pusieron de manifiesto siguiendo los protocolos previamente expuestos en el apartado de “Material y Métodos”, y posteriormente resumidos en distintas secciones. La Ang II se añadió a la solución de perfusión en una concentración de 100 nM y tras la obtención de un registro control, se perfundió a la célula con la Ang II durante 5-10 min. para asegurarnos su efecto.

El efecto que la Ang II produjo sobre I_{CaT} en nuestros miocitos ventriculares aislados de corazones hipertróficos se observó en un total de 6 células. La Ang II a la concentración de 100 nM no produjo acción ninguna sobre la corriente I_{CaT} , siendo la densidad de corriente a -40 mV de -0.37 ± 0.02 pA/pF en control y -0.34 ± 0.07 pA/pF con Ang II.

La relación densidad de corriente-voltaje se muestra en la figura 37 y se realizó en un total de 6 células ventriculares hipertróficas. Se observa como la Ang II no modifica la corriente T en ninguno de los puntos, ni tampoco la dependencia de voltaje de la corriente, siendo la densidad en el pico de corriente a -20 mV de -3.15 ± 0.43 pA/pF en control y de -3.40 ± 0.57 pA/pF tras la perfusión con Ang II.

La inactivación en estado estacionario se obtuvo realizando el protocolo de doble pulso ya descrito anteriormente y utilizado en la caracterización y modulación de I_{CaT} . Los datos, como ya se ha venido haciendo, se ajustaron a una función de distribución de Boltzmann obteniendo el valor del 50% de inactivación, V_{50} , y la pendiente de la curva en el punto de inflexión, K. La Ang II tampoco modificó la inactivación del canal, siendo los valores de V_{50} -54.63 ± 2.18 mV y -53.18 ± 1.02 mV en control y con Ang II respectivamente y los valores de K, -6.97 ± 1.35 y -7.099 ± 1.72 (n = 5).

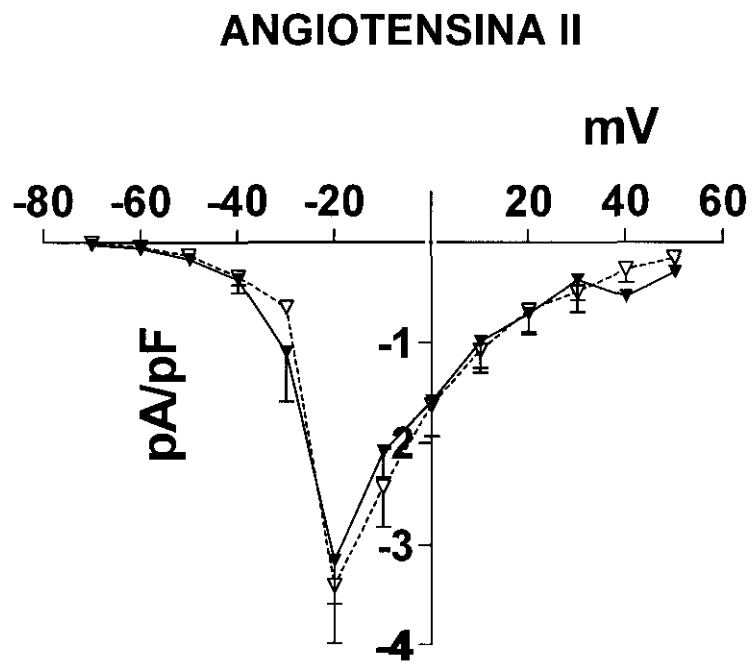


Figura 37. Efecto de la Ang II sobre la corriente I_{CaT} , relación densidad de corriente-voltaje de I_{CaT} en 6 células hipertróficas, en control (\blacktriangledown) y con Ang II 100 nM(∇). Datos presentados como media \pm EEM.

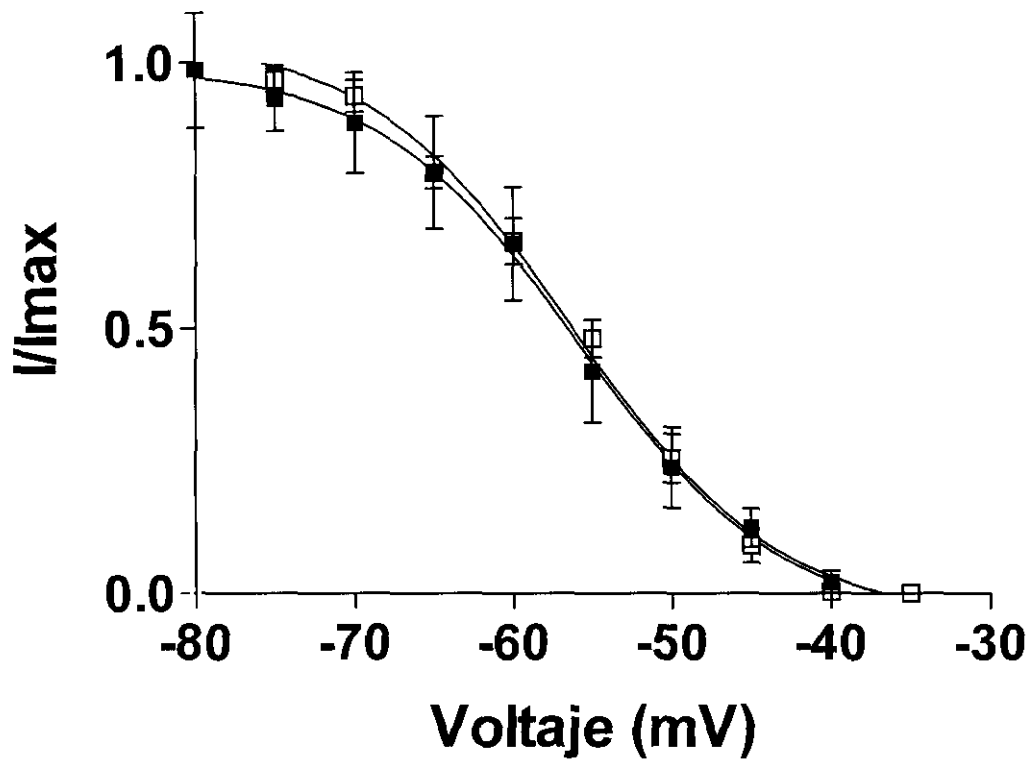


Figura 38. Inactivación en estado estacionario de I_{CaT} . ■, en control ; □, en Ang II 100 nM, realizada en 5 células hipertróficas. Datos en media \pm EEM.

Cabría esperar que si la Ang II no modifica I_{CaT} , su dependencia de voltaje, ni su inactivación en estado estacionario, tampoco modificaría el curso temporal de la inactivación. Los resultados obtenidos en 6 células mostraron que al ajustar los trazos obtenidos al pulso despolarizante de -40 mV desde un PF de -90 mV, a una función monoexponencial, ni la constante de tiempo (τ), ni su amplitud, se vieron modificados al añadir Ang II a la solución de perfusión. Por tanto, efectivamente la Ang II, a la concentración 100 nM, no produjo cambios en la caída de la corriente con en el tiempo. Los datos para la τ y la amplitud se exponen en la tabla 15.

Tabla 15. Parámetros del curso temporal de la inactivación a -40 mV en ausencia y en presencia de Ang II 100 nM.

	CONTROL	ANG II
τ (ms)	35.34 ± 7.48	34.90 ± 7.48
Amplitud (pA)	-159 ± 46.55	-174.2 ± 46.93
N	6	6

Datos en media \pm EEM.

4.5.2.2. Endotelina-1

La endotelina es un péptido de 21 aminoácidos que se aisló originalmente en el endotelio vascular, mostrando potentes efectos vasoconstrictores (Yanagisawa y cols., 1988) así como efectos directos en el miocardio (Ishikawa, 1988; Karmazyn 1996). Actualmente, se conoce que la endotelina no es producida únicamente por células vasculares sino que células no vasculares tales como los miocitos cardiacos también son capaces de producirla (Suzuki y cols., 1993). De hecho, juega un papel importante en los procesos de transducción que regulan procesos fisiológicos y patofisiológicos en el corazón (Bax y cols., 1993; Masaki, 1993; Karmazyn, 1996; Moreau, 1998). De todos modos, los mecanismos precisos por los que la endotelina ejerce sus acciones en el miocardio no son totalmente conocidos.

La endotelina-1 (ET-1) se ha visto que puede inducir un efecto inotrópico positivo en varias especies (Moravec y cols., 1989; Kelly y cols., 1990; Endoh y cols., 1991). Además, la endotelina induce la mitogénesis de las células vasculares de músculo liso (Komuro y cols., 1988; Ohlstein y cols., 1992) e hipertrofia de las células miocárdicas (Shubetia y cols., 1990; Ito, 1997; Moreau, 1998), indicando que la endotelina podría ser importante en el desarrollo de la arteriosclerosis e hipertrofia cardíaca.

Por último, se ha descrito una regulación de los canales iónicos por la endotelina, aunque en muchos casos los resultados son contradictorios (Washizuka y cols., 1997; Furukawa y cols., 1992; Ono y cols., 1994; Tanaka y cols., 1998). Algunos estudios se han realizado a nivel de la corriente I_{CaT} , y mientras Furukawa y cols., (1992) describen un aumento de esta corriente por la ET-1, Tanaka y cols., (1998), describen una inhibición.

Por todo lo explicado anteriormente, nosotros nos decidimos a estudiar en un grupo de experimentos, el efecto de ET-1 a la concentración de 10 nM, sobre I_{CaT} en las células ventriculares aisladas de corazones hipertróficos de rata.

Los resultados se obtuvieron en un total de 6 células. El canal T se obtuvo como la diferencia entre las corrientes registradas al PF de -90 mV menos las corrientes registradas al PF de -50 mV. El protocolo ya se ha explicado anteriormente y viene ampliamente descrito en la sección correspondiente de material y métodos. La ET-1 se utilizó a la concentración de 10 nM y se perfundió durante al menos 10 min. para que su efecto se estabilizara. Los resultados obtenidos para I_{CaT} se muestran en la figura 39.

En la figura 39A, se observan los trazos obtenidos para una célula hipertrófica representativa del total. Aparece el registro de corrientes al pulso despolarizante de -40 mV, al PF de -90 mV, de -50 mV y la corriente diferencia obtenida al restar ambos trazos o I_{CaT} . Como vemos en presencia de ET-1, la corriente obtenida en condiciones controles disminuyó considerablemente. Tras pasar durante 10 min. la solución de registro libre de fármaco, para lavar el efecto de ET-1, se observa como I_{CaT} comienza a recuperarse

En la zona B de la figura 39, se muestra la relación densidad de corriente-voltaje para I_{CaT} en presencia y ausencia de ET-1 10 nM. La ET-1 disminuye de forma significativa I_{CaT} de manera que en el pico de corriente a -20 mV, la densidad de corriente es de -2.74 ± 0.34 pA/pF en control y disminuye hasta -1.013 ± 0.29 pA/pF tras el efecto de ET-1, con una $p < 0.01$. Al potencial de -40 mV, que es el mostrado en los trazos, la densidad de corriente también se ve significativamente disminuida desde un valor de -1.2 ± 0.49 pA/pF en control hasta -0.44 ± 0.10 pA/pF con ET-1, con una $p < 0.05$.

En vista de estos datos podemos concluir que la ET-1 10 nM, en nuestras condiciones experimentales, produce una reducción de I_{CaT} de forma significativa con un porcentaje de disminución alrededor de un 70%.

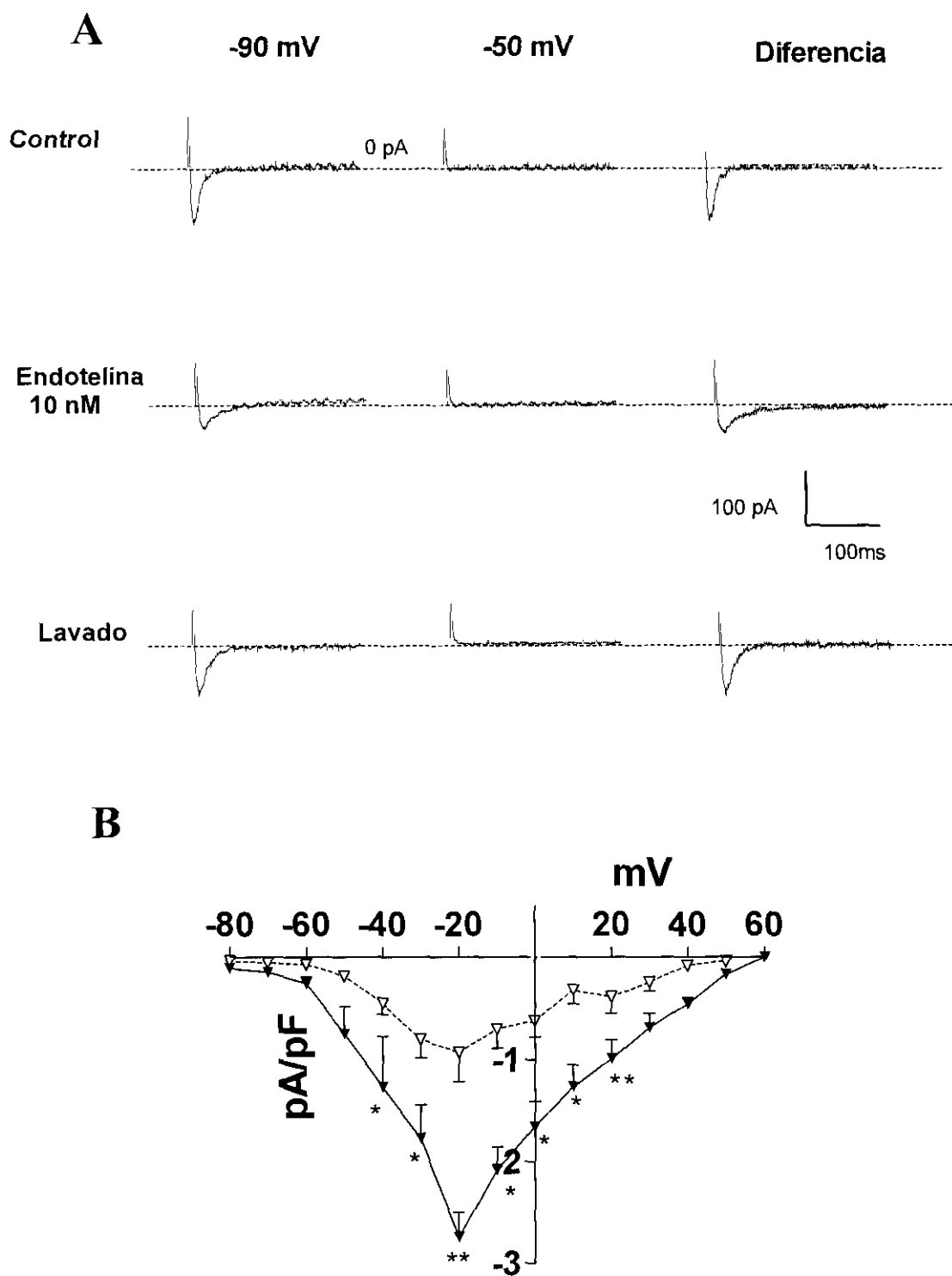


Figura 39. Efecto de ET-1 sobre la corriente I_{CaT} . **A**, trazos representativos de una célula hipertrófica a -40 mV, registrados al PF de -90 y -50 mV y la corriente diferencia o I_{CaT} , en control, en presencia de ET-1 10 nM y después de 10 min. de lavado. **B**, Curva densidad de corriente-voltaje obtenida de 6 células hipertróficas, en control (\blacktriangledown) y tras la perfusión durante 10 min. con ET-1 (∇). Datos en media \pm EEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ control vs ET-1.

El estudio de la inactivación en estado estacionario de I_{CaT} , se realizó siguiendo el protocolo de doble pulso anteriormente explicado y ajustando los valores normalizados a una función de distribución de Boltzmann para la obtención de la V_{50} y la K . El efecto se observó en un total de 6 células. La ET-1 no modificó en ningún caso la inactivación siendo los valores de la V_{50} de -57.36 ± 3.02 mV y -58.91 ± 1.37 mV en control y tras el paso de ET-1 respectivamente. Tampoco se modificó la K siendo su valor de -7.84 ± 1.22 en control y -7.64 ± 0.82 con ET-1 (figura 40).

Respecto al curso temporal de la inactivación, medido en los trazos a -40 mV en 6 células hipertróficas, vemos que la ET-1 a la concentración de 10 nM si modifica la caída de la corriente con el tiempo. Los valores que se obtuvieron para la constante de tiempo τ y su amplitud correspondiente se muestran en la tabla 16. Se produce un enlentecimiento significativo del curso temporal de la inactivación en presencia de ET-1, con una $p < 0.05$. El valor de la τ se hace mayor y la amplitud disminuye.

Tabla 16. Parámetros del curso temporal de la inactivación a -40 mV de I_{CaT} , en control y en presencia de ET-1 10 nM.

	CONTROL	ET-1
τ (ms)	38.02 ± 8.91	$76.51 \pm 12.61^*$
Amplitud (pA)	-195.9 ± 53.36	$-41.14 \pm 7.44^*$
N	6	6

Datos en media \pm EEM. *, $p < 0.05$ control vs ET-1.

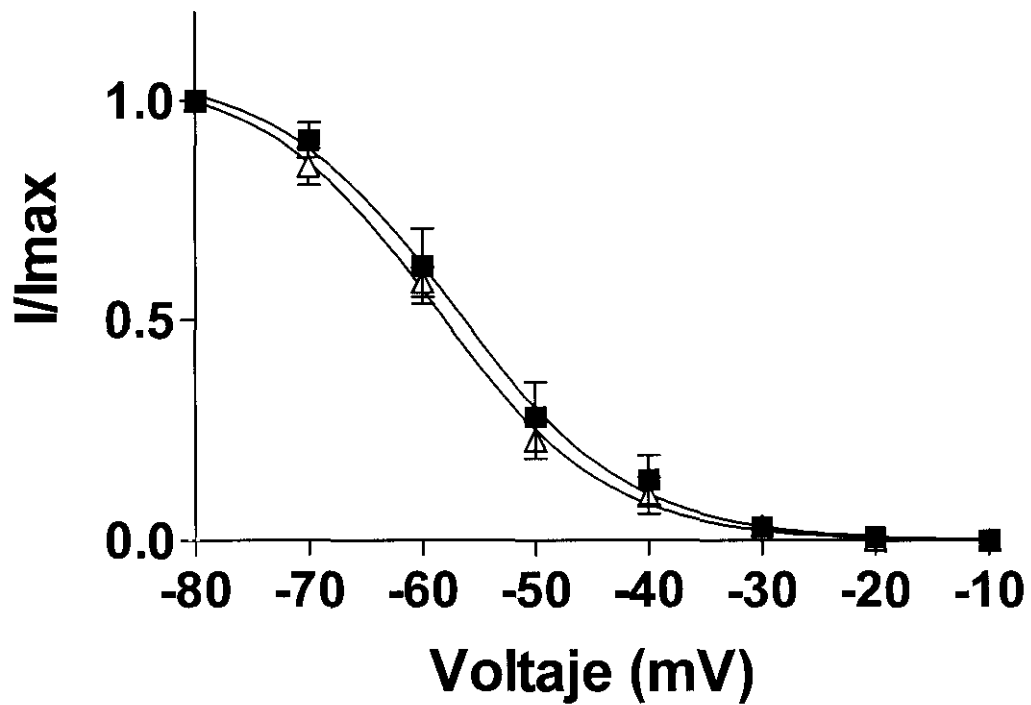


Figura 40. Efecto de ET-1 sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT} en un total de 6 células ventriculares hipertróficas. ■, en control; Δ, con ET-1 10 nM. Datos presentados como media \pm EEM.

4.5.3. EFECTO DE LA ESTIMULACIÓN ADRENÉRGICA SOBRE I_{CaT} .

Los efectos de las catecolaminas sobre el corazón son mediados a través de una secuencia de eventos que comienza con la liberación de noradrenalina, desde las terminaciones nerviosas adrenérgicas, y las posterior estimulación de los receptores β y α localizados en la membrana celular del miocito cardiaco (Hescheler y cols., 1988).

La corriente de calcio es una de las corrientes moduladas a través de la estimulación adrenérgica tanto α como β . Existen muchos estudios sobre el efecto de la estimulación β sobre la corriente I_{CaL} y el aumento que produce en ella, el cual es mediado a través de la adenilato-ciclasa y la activación de la proteína kinasa A (Bean y cols., 1984; Scamps y cols, 1990; Alvarez y Vassort 1992;). También es conocido el efecto de la estimulación α sobre I_{CaL} , y aunque en un principio se describió una disminución de I_{CaL} por efecto de ésta estimulación, actualmente está aceptado que se produce un aumento de I_{CaL} tras la estimulación de los receptores α -adrenérgicos (Benham y Tsien, 1988; Hartmann y cols., 1988; Liu y cols., 1994).

Los estudios realizados al nivel de I_{CaT} son mucho menos conocidos y más polémicos tanto en la estimulación α como β y mucho más dependientes de las especies animales, y condiciones utilizadas en cada estudio. Por ello, nosotros nos decidimos a estudiar la modulación de I_{CaT} , encontrada en nuestras células ventriculares hipertróficas, por ambos tipos de estimulación adrenérgica.

4.5.3.1. Efecto de la estimulación β

Todavía hoy permanece en la incertidumbre la sensibilidad de la corriente I_{CaT} a los agonistas β tales como el isoproterenol. En los estudios electrofisiológicos en célula entera realizados en aurícula de perro (Bean, 1985), en ventrículo de cobayo (Tygat y cols., 1988) en aurícula de rana, (Charinet y cols., 1991) y aurícula de conejo (Hagiwara y cols., 1988), se ha visto que I_{CaT} no presenta sensibilidad a las intervenciones β -adrenérgicas y permanece inalterada. En cambio, estudios realizados con la misma técnica electrofisiológica, en aurícula de rana (Alvarez y Vassort, 1992; Alvarez y cols., 1996), en células ventriculares y de Purkinge de perro (Tseng y Boyden, 1991) y en ventrículo de cobayo (Mitra y Morad, 1986), se ha observado un aumento de la corriente I_{CaT} de un 25-100% por acción del isoproterenol 1 μ M.

Los experimentos realizados con isoproterenol, a la concentración de 1 μ M, en nuestras células ventriculares hipertróficas, dejando actuar al fármaco durante 5-10 min. desde el inicio de su perfusión, para que su efecto se estabilizara. Los protocolos utilizados, tanto para la obtención de I_{CaT} , la relación densidad de corriente-voltaje, la inactivación en estado estacionario, como la obtención del curso temporal de la inactivación fueron los mismos que los que se han venido describiendo para otros fármacos y como ya he citado anteriormente, están ampliamente descritos en la sección correspondiente de "Material y Métodos".

En la figura 41A, se muestran los trazos representativos de una célula ventricular hipertrófica en condiciones controles y tras ser perfundida con isoproterenol 1 μ M. Los trazos se obtuvieron por despolarización de la membrana a -40 mV desde el PF de -90 mV, el cual pone de manifiesto fundamentalmente I_{CaT} a ese potencial de -40 mV, o al PF de -50 mV, que pone de manifiesto fundamentalmente I_{CaL} . De la substracción de los trazos obtenidos a ambos potenciales, obtenemos I_{CaT} pura. Se observa como la corriente a -40 mV que se registró en control se ve aumentada en presencia de isoproterenol.

La relación densidad de corriente-voltaje de I_{CaT} registrada a diferentes potenciales test se muestra en la figura 41B. Se ha obtenido de una media de 6 células hipertróficas ventriculares. El isoproterenol $1 \mu\text{M}$ produjo un aumento significativo de la corriente a prácticamente todos los potenciales. La densidad en el pico de corriente a -20mV , aumentó desde $-3.21 \pm 0.60 \text{ pA/pF}$, en condiciones controles a $-5.97 \pm 0.84 \text{ pA/pF}$ en presencia de isoproterenol, con una $p < 0.05$. Del mismo modo a -40 mV , donde prácticamente no es posible la contaminación con corriente I_{CaL} , el isoproterenol produce un aumento de la corriente desde $-0.37 \pm 0.06 \text{ pA/pF}$ (control) hasta $-0.70 \pm 0.03 \text{ pA/pF}$ (isoproterenol), con una $p < 0.05$.

El porcentaje de aumento de la corriente I_{CaT} en presencia de isoproterenol $1 \mu\text{M}$ está alrededor de un 90 %.

La inactivación en estado estacionario se realizó en 4 células ventriculares hipertróficas. Los datos se normalizaron por el valor máximo de corriente obtenido y se ajustaron a una función de distribución de Boltzmann para la obtención de los valores de la V_{50} y la K . El isoproterenol $1 \mu\text{M}$ no modificó ninguno de los parámetros de la inactivación, siendo la V_{50} de $-64.33 \pm 3.72 \text{ mV}$ y $-63.71 \pm 2.14 \text{ mV}$ en ausencia y presencia de isoproterenol respectivamente. La K para ambos casos fue de -8.87 ± 2.51 en control y -6.60 ± 1.47 con isoproterenol.

El curso temporal de la inactivación de la corriente I_{CaT} sí que se vio alterado en presencia de isoproterenol $1 \mu\text{M}$. Se obtuvo de una media de 5 células al pulso despolarizante de -40 mV , ajustando la caída de la corriente desde el pico máximo hasta el final del pulso, a una ecuación monoexponencial, con una constante de tiempo, τ . El isoproterenol no sólo aumentó la amplitud de la corriente sino que también aceleró el curso temporal de la caída de la corriente, de manera que el valor de la τ disminuye en presencia del fármaco. Los datos se resumen en la tabla 17.

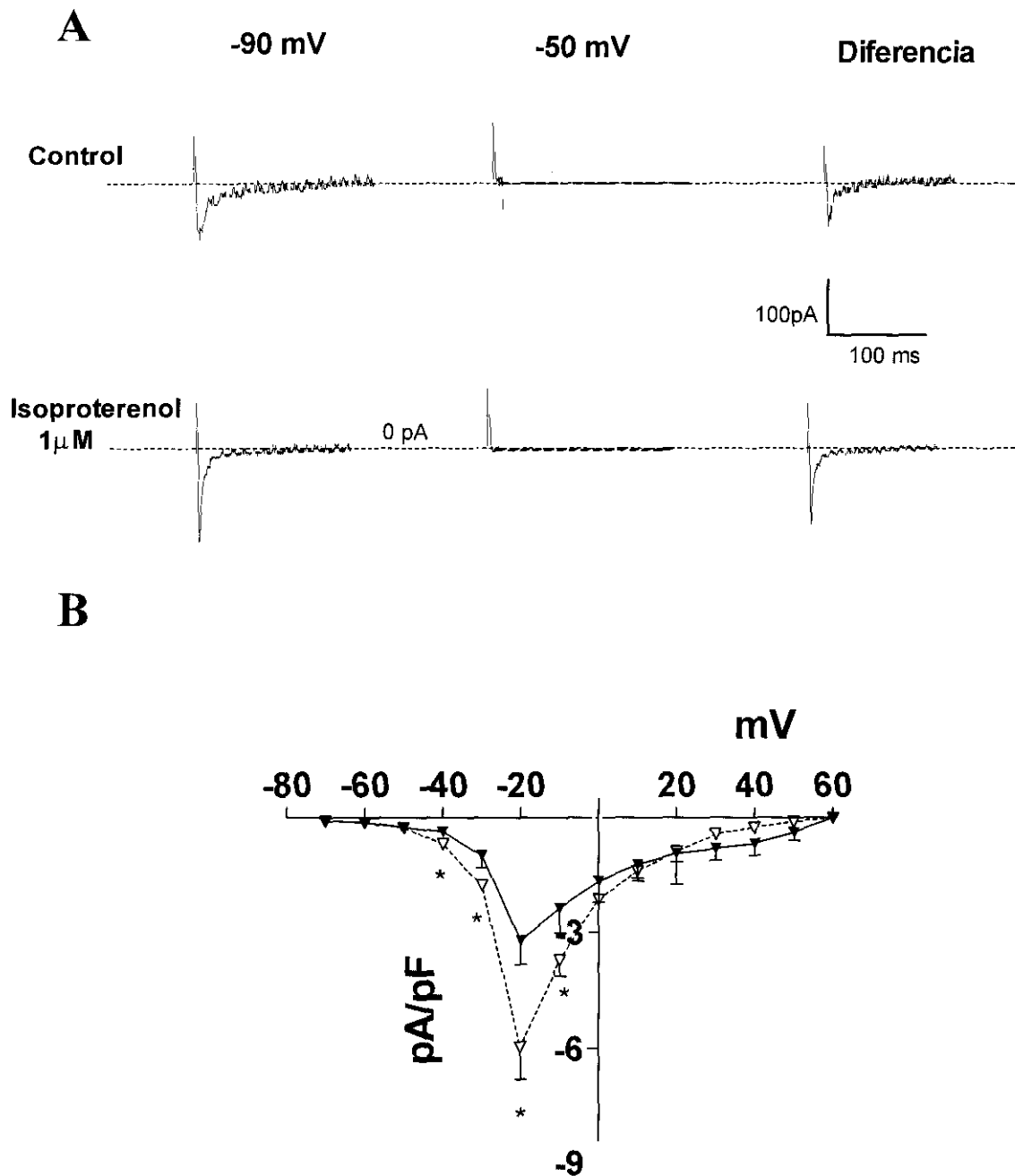


Figura 41. Efecto del isoproterenol 1 μM sobre I_{CaT} . **A**, trazos a -40 mV en una célula hipertrófica representativa del total, desde un PF de -90 mV, -50 mV y la corriente diferencia o I_{CaT} , en control y con isoproterenol. **B**, relación densidad de corriente-voltaje en un total de 6 células ventriculares hipertróficas, en ausencia (▼) y en presencia de isoproterenol (▽). Datos presentados como media ± EEM. *, $p < 0.05$ control vs isoproterenol

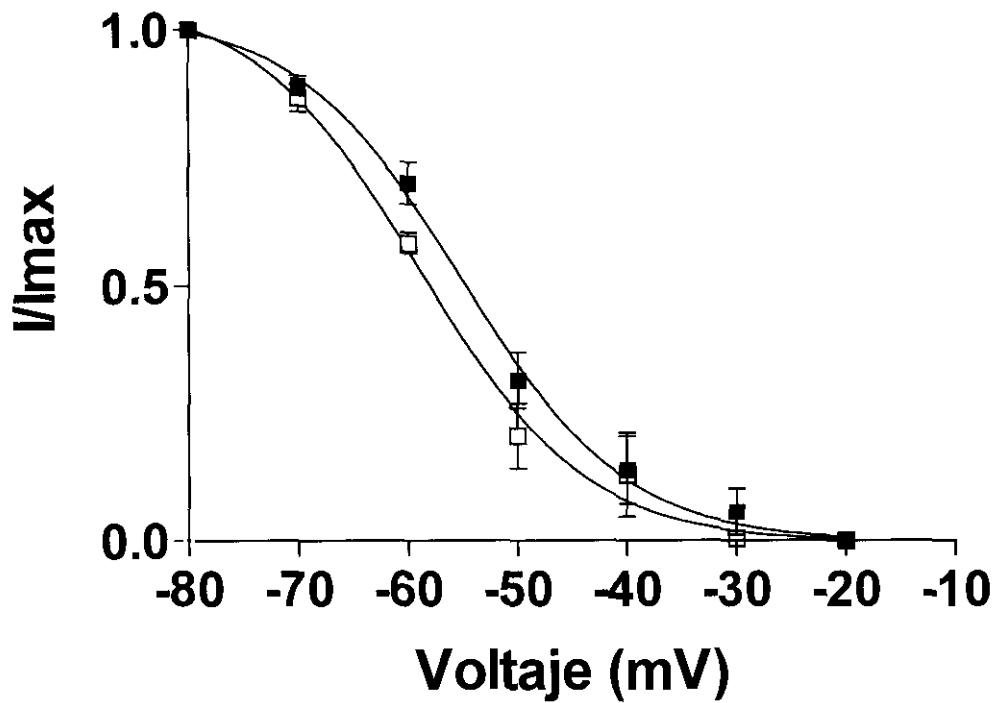


Figura 42. Efecto del isoproterenol 1 μM sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT} . ■, control; □, isoproterenol. Datos presentados en media \pm EEM.

Tabla 17. Parámetros del curso temporal de la inactivación de la I_{CaT} en presencia y ausencia de isoproterenol 1 μM .

	CONTROL	ISOPROTERENOL
τ (ms)	45.24 ± 7.61	$15.66 \pm 4.84^*$
Amplitud (pA)	-186.7 ± 56.64	$-647.5 \pm 37.6^*$
N	5	5

Datos presentados como media \pm EEM. * $p < 0.05$ control vs isoproterenol.

4.5.3.2. Estimulación α_1 -adrenérgica

Los receptores α_1 -adrenérgicos se han encontrado en el miocardio de todas las especies de mamíferos. Aunque los mecanismos asociados a su activación no se han terminado de dilucidar, parece ser que los efectos de la estimulación α_1 -adrenérgica en el corazón puede variar en importancia, según el proceso patofisiológico en el que esté implicada. En condiciones fisiológicas, juega un papel en el crecimiento cardíaco, la contracción, y tanto en la función antiarrítmica como en la adaptación cardíaca a diferentes situaciones. Esta estimulación también se relaciona con algunos procesos patofisiológicos como isquemia-reperfusión, acondicionamiento isquémico e hipertrofia cardíaca. Su función en infarto de miocardio es polémica aún hoy. La evidencia experimental sugiere que los receptores α_1 -adrenérgicos pueden tener tanto efectos beneficiosos como perjudiciales en el corazón (para revisión: Terzic y cols., 1994; Endoh, 1996; Li y cols., 1997). Por ello, un conocimiento mayor de su función en las diferentes situaciones fisiológicas y patofisiológicas contribuirá a un mejor conocimiento de su relevancia clínica.

Como ya se mencionó al inicio de este capítulo, los estudios realizados sobre la estimulación α_1 -adrenérgica en el canal de calcio tipo T es contradictoria, por ello, nosotros nos decidimos a concluir esta Tesis Doctoral analizando cual es el efecto de los agonistas α_1 sobre I_{CaT} .

Para el estudio utilizamos fenilefrina (fármaco agonista α_1) a una concentración de 1 μ M, que se añadió a la solución de perfusión y tras obtener un registro control, se dejó perfundir durante al menos 5 min. Los protocolos de obtención de I_{CaT} fueron los mismos que los ya utilizados a lo largo de toda esta Tesis Doctoral (ver “Material y Métodos”, protocolo experimental).

Los resultados obtenidos sobre I_{CaT} por la estimulación α_1 , mediante fenilefrina se exponen en la figura 43.

En la figura 43A, se muestran los trazos obtenidos al potencial test de -40 mV para una célula ventricular hipertrófica representativa del total. I_{CaT} se obtiene como la corriente diferencia entre la corriente obtenida a -40 mV desde el PF de -90 mV menos el registro a -40 mV desde el PF de -50 mV. Los trazos de corriente de la parte superior muestran el primer registro control, y los siguientes, muestran como tras el paso de fenilefrina $1 \mu\text{M}$ se produce una disminución de I_{CaT} . Si posteriormente se vuelve a perfundir la célula con solución de registro libre de fármaco durante otros 5-10 min. se produce el lavado del efecto de fenilefrina, recuperándose parcialmente la corriente I_{CaT} .

La figura 43B muestra la curva densidad de corriente-voltaje obtenida en situación control (triángulos negros) y después de perfundir las células con fenilefrina (triángulos blancos). Se observa el efecto de disminución de la corriente I_{CaT} por efecto de fenilefrina, en un total de 5 células hipertróficas. La fenilefrina $1 \mu\text{M}$ produce un efecto de disminución de I_{CaT} a los diferentes pulsos despolarizantes, de manera que en el pico de corriente a -20 mV la densidad de corriente fue de -2.74 ± 0.42 pA/pF en control, y disminuyó hasta -1.41 ± 0.18 pA/pF tras la acción de la fenilefrina, disminución estadísticamente significativa con una $p < 0.01$. Lo mismo ocurre si nos fijamos en el pulso test de -40 mV, donde I_{CaL} está prácticamente inactiva y no interfiere en la medida de I_{CaT} , donde se obtuvo un valor de -0.90 ± 0.29 pA/pF en control y -0.30 ± 0.14 pA/pF con fenilefrina, con una $p < 0.05$.

El porcentaje de disminución de I_{CaT} en presencia de fenilefrina $1 \mu\text{M}$ está alrededor de un 60%.

También en este caso se estudió el efecto de la fenilefrina sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT} , en un total de 5 células ventriculares hipertróficas. Los resultados se muestran en la figura 44. Se observa como la fenilefrina $1 \mu\text{M}$ no produjo ningún cambio significativo en la inactivación. Los parámetros V_{50} y K obtenidos por ajuste de los datos normalizados a una función de distribución de Boltzmann son: Control, $V_{50} = -55.20 \pm 3.43$ mV; $K = -6.52 \pm 0.93$ y en presencia de fenilefrina, $V_{50} = -57.9 \pm 10.29$ mV; $K = -7.06 \pm 1.21$.

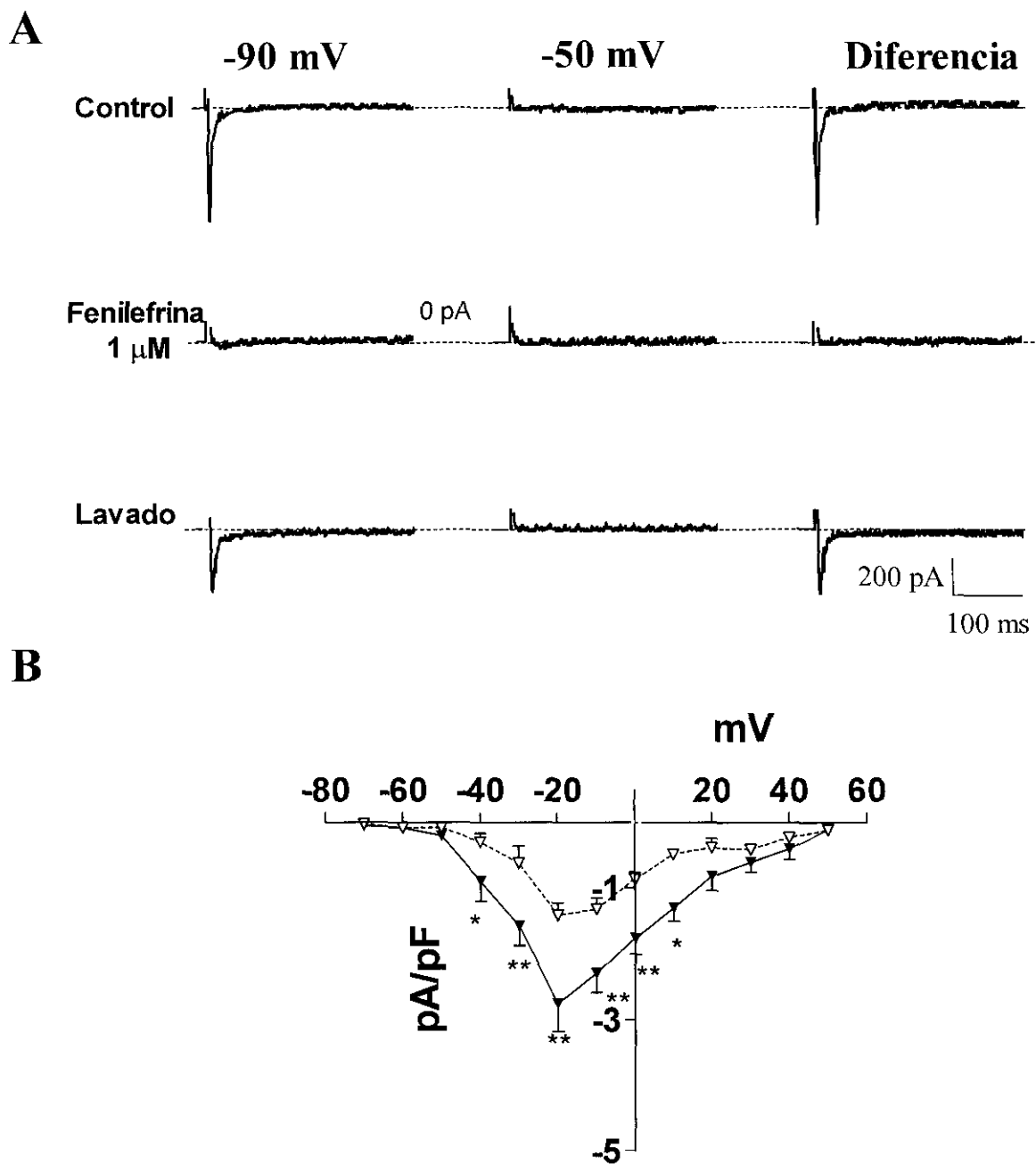


Figura 43. Efecto de fenilefrina $1 \mu\text{M}$ sobre I_{CaT} . **A**, trazos representativos a -40 mV de una célula ventricular hipertrófica de la corriente obtenida desde el PF de -90 mV , -50 mV y la corriente diferencia o I_{CaT} , en control, en presencia de fenilefrina y tras el lavado del fármaco. **B**, relación densidad de corriente-voltaje de I_{CaT} en 5 células hipertróficas en control (\blacktriangledown) y con fenilefrina (∇). Datos presentados como media \pm EEM. *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$ control vs fenilefrina.

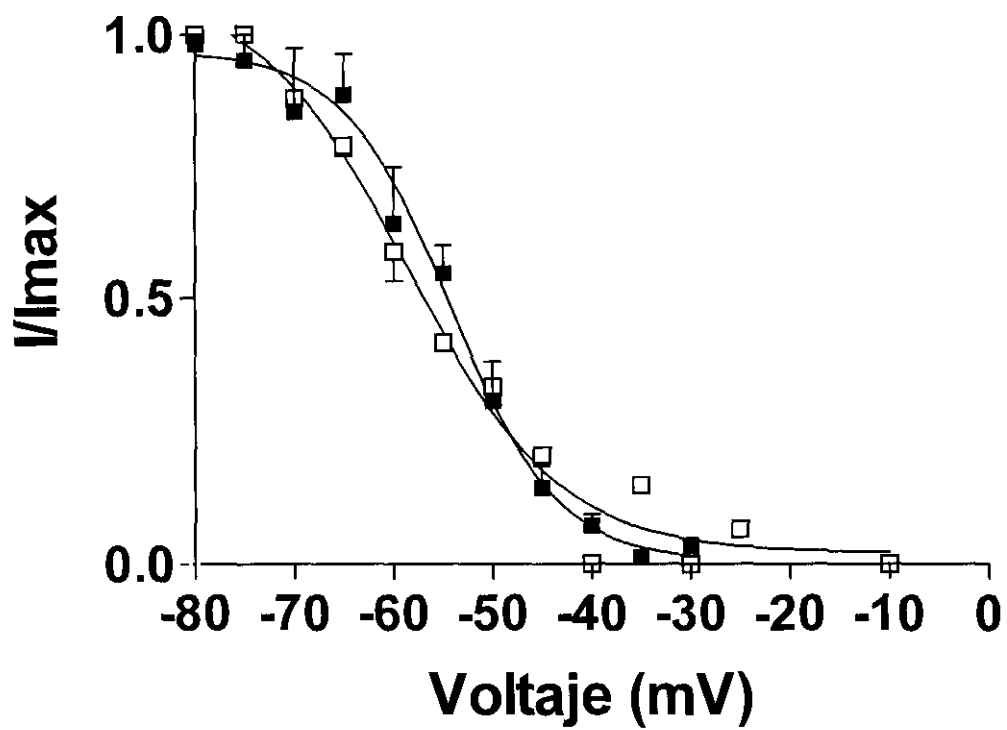


Figura 44. Efecto de la fenilefrina 1 μ M sobre la inactivación en estado estacionario de I_{CaT} . ■, en control y □, con fenilefrina 1 μ M en 5 células ventriculares hipertróficas. Datos presentados como media \pm EEM.

Respecto al efecto que produjo la fenilefrina sobre el curso temporal de la inactivación, los parámetros vienen resumidos en la tabla 18. Los resultados se obtuvieron por ajuste de los registros obtenidos a -40 mV, a una ecuación monoexponencial de una constante de tiempo, τ . La fenilefrina produjo un retardo en el curso de la caída de la corriente con el tiempo de modo que el valor de τ aumentaba, de manera significativa, en presencia del fármaco. La amplitud disminuye al ser éste el efecto de la fenilefrina sobre I_{CaT} .

Tabla 18. Efecto de la fenilefrina $1 \mu\text{M}$ sobre el curso temporal de la inactivación de I_{CaT} .

	CONTROL	FENILEFRINA
τ (ms)	38.40 ± 11.14	$65.14 \pm 9.96^*$
Amplitud (pA)	-273.4 ± 19.8	$-74.92 \pm 16.68^*$
N	5	5

Datos presentados como media \pm EEM. *, $p < 0.05$ control vs fenilefrina.

La corriente de calcio tipo T, puesta de manifiesto en las células ventriculares hipertróficas de rata, se muestra susceptible de modulación farmacológica por diversos agentes. Así, el nifedipino, la endotelina 1 y la fenilefrina producen una disminución de la corriente, mientras que el isoproterenol la aumenta y el BAY K8644 y la angiotensina II no la modifican. Toda esta modulación transcurre sin cambios significativos en la cinética de la corriente.

5. DISCUSIÓN

5.1. ESTUDIO DE LAS CORRIENTES DE CALCIO TIPO T Y L EN CONTROL Y EN LA HIPERTROFIA

En la presente Tesis Doctoral se demuestra, por primera vez, la presencia de la corriente de calcio tipo T en células ventriculares aisladas de corazones hipertroficados de rata, y al mismo tiempo confirma que en células ventriculares de corazones controles esta corriente está ausente (Xu y Best, 1990; Walker y cols. , 1993). A su vez, el hecho de que esta corriente I_{CaT} sólo se exprese en la hipertrofia, está en concordancia con la idea general de que I_{CaT} pueda estar involucrada en la regulación de los procesos de crecimiento en el tejido cardiaco.

5.1.1. I_{CaT} Y CRECIMIENTO

Muchos son los artículos y las evidencias que relacionan la corriente I_{CaT} con el crecimiento celular. La corriente I_{CaT} siempre parece más fácil de observar en tejidos fetales que en adultos y dentro de los tejidos adultos, en tejidos en crecimiento. Por ejemplo, las corrientes de calcio tipo T se han descrito en cuerpos ganglionares de diámetro pequeño y medio pero no en cuerpos neuronales de gran tamaño (Scorggs y Fox, 1992). En el músculo esquelético, la corriente I_{CaT} sólo se observó en fibras musculares de ratas recién nacidas ó en cultivo de tejidos fetales (Bean y Knudson, 1988). Gonoj y Hasegawa, (1987), en su estudio sobre la desaparición paulatina de I_{CaT} con el crecimiento en fibras musculares de ratón, concluyeron que no parece necesaria una inervación nerviosa para esta desaparición paulatina de los canales funcionales, sino que más bien la expresión de los canales T está más controlada por mecanismos endógenos, y factores de crecimiento.

Esta expresión transitoria del canal de calcio tipo T en tejidos en crecimiento o, bien su disminución en células adultas, sugiere una vez más, la relación del canal I_{CaT} con el crecimiento y el desarrollo. En un estudio realizado en células aisladas de aorta de rata en cultivo se distinguieron cuatro fenotipos celulares diferentes correspondientes a: 1) células que solo exhiben I_{CaT} , 2) células que solo exhiben I_{CaL} , 3) células que exhiben ambas corrientes, y 4) células que no exhiben corrientes (Richard y cols., 1992). I_{CaT} , únicamente se expresaba de forma transitoria entre los días 5 y 15, periodo de tiempo en el que las células estaban proliferando.

Se han descrito cambios en la densidad de I_{CaT} en el desarrollo postnatal de células auriculares de rata (Xu y Best, 1992). La densidad de corriente I_{CaT} se describió como de 1.44 pA/pF en machos y 1.25 pA/pF en hembras a las 5 semanas después del nacimiento, momento en el que el crecimiento cardíaco y corporal es máximo; pero la corriente comienza a disminuir hasta más de una tercera parte de estos valores después de 13 semanas de vida. La disminución de esta corriente se atribuye mayormente a cambios en la densidad de canales sin alteraciones en la conductancia o mecanismos de apertura y cierre del canal.

En situaciones de tejidos adultos en los cuales debido a diferentes factores se produce un desarrollo o crecimiento del tejido se ve como reaparece la corriente I_{CaT} o aumenta en densidad. Así, en miocitos ventriculares de ratas adultas con tumores secretores de hormona de crecimiento, la densidad de corriente I_{CaT} se ve aumentada hasta tres veces su valor sin alteración de su cinética ni dependencia del voltaje (Xu y Best, 1990). En miocitos ventriculares de hámsters con cardiomiopatía hipertrófica también se observó un aumento de la densidad de I_{CaT} con respecto a su control (Sen y Smith, 1994). Y respecto a la hipertrofia cardíaca, ya Nuss y Houser, (1993), describieron por primera vez, la expresión de esta corriente I_{CaT} en miocitos ventriculares aislados de corazones hipertróficos de gato.

Los resultados obtenidos en la presente Tesis Doctoral también apoyan la asociación del canal T con el crecimiento, dado que hemos demostrado la expresión de la corriente I_{CaT} en miocitos ventriculares de corazones hipertróficos de rata. Así, llegados a este punto cabe destacar que, el desarrollo de la hipertrofia cardíaca se

caracteriza por una vuelta a patrones embrionarios mediante una reexpresión de genes fetales y protooncogenes en el miocito adulto (Marban y Koretsune, 1990).

Uno de los principales enlaces o dispositivos de disparo entre el estímulo inicial de la hipertrofia y las alteraciones en la expresión génica, parece ser un aumento del calcio intracelular (ver mecanismos intracelulares de la hipertrofia en introducción). Si se considera que la elevación de presión podría generar la activación de canales activados por tensión, presentes en células auriculares y ventriculares cardiacas (para revisión completa ver: Calaghan y White, 1999), se podría especular que la entrada de calcio sostenida a su través podía inducir hipertrofia siendo ese aumento de calcio intracelular el que a su vez pondría en funcionamiento toda la cascada de eventos necesaria para la activación de la expresión génica, entre ellos la expresión del canal T.

Recientemente, se han identificado los genes que codifican para I_{CaT} (Cribbs y cols., 1998; Pérez-Reyes y cols., 1998), lo que podría ayudar en futuras investigaciones a dilucidar el papel de I_{CaT} en el crecimiento cardiaco y/o vascular, la proliferación, el desarrollo y los procesos de remodelación.

Por último, la presencia de I_{CaT} en células cardiacas humanas y su papel potencial en la actividad marcapasos, es aún meramente especulativa ya que los tejidos en los que es más probable encontrar I_{CaT} (nodo senoauricular, nodo aurículo-ventricular, sistema de His-Purkinje), son precisamente los tejidos que no están disponibles para los estudios científicos (Richard y cols., 1998).

5.1.2. I_{CaT} E I_{CaL} EN CÉLULAS CARDIACAS

En el estudio realizado de I_{CaT} y I_{CaL} en esta Tesis Doctoral, en control e hipertrofia, obtuvimos que la densidad máxima de I_{CaT} observada en células ventriculares hipertróficas fue de -4.8 ± 0.4 pA/pF, mientras que la densidad máxima de I_{CaL} fue de -12.4 ± 0.9 pA/pF, similar a la obtenida en miocitos controles (-13.9 ± 1.3 pA/pF). Si ahora hacemos el cociente $I_{CaT}:I_{CaL}$, el valor que resulta es de 0.387, el cuál es más pequeño que el valor descrito en células procedentes del nodo sinoauricular de conejo, 1.1, (Fermini y Nathan, 1991), en ventrículo de cordero, 0.56, (Bogdanov y

cols., 1995) o en aurícula de rata, 0.44, (Alvarez y Vassort, 1992). En cambio es mayor que el observado en células ventriculares de perro, 0.15, (Tseng y Boyden, 1991) o ventrículo de cobayo, 0.13, (Balke y cols., 1992). Nuss y Houser, (1993), describieron una densidad de I_{CaT} de -1.8 ± 0.9 pA/pF, en células ventriculares hipertróficas de gato, valor que está por debajo de la densidad que nosotros describimos también en células ventriculares hipertróficas pero de rata. Esta discrepancia que surge en los diferentes valores de densidad de I_{CaT} , e incluso de otras corrientes, entre los diferentes estudios, se podría atribuir a las diferentes especies animales utilizadas y al método de disociación, ya que I_{CaT} es una corriente muy sensible a las enzimas utilizadas durante el proceso de disociación y a la duración del tratamiento enzimático (Alvarez y Vassort, 1992). Respecto a los diferentes valores observados de I_{CaT} en la presente Tesis Doctoral y los descritos anteriormente por Nuss y Houser, (1993), en células ventriculares hipertróficas de gato, una posible explicación radicaría en la duración y severidad de la hipertrofia cardiaca. Nuestro modelo experimental representa un estadio de hipertrofia moderada compensada, mientras que en el estudio publicado por Nuss y Houser, el modelo experimental utilizado fue de una hipertrofia severa. En este sentido hay que indicar que el argumento sobre el cambio en la densidad de algunas corrientes iónicas con respecto al grado de hipertrofia ha sido esgrimido ya por Hart (1994), para explicar las diferencias observadas por diversos investigadores en el caso de la densidad de I_{CaL} en diferentes modelos experimentales de hipertrofia. Actualmente se acepta que la densidad de I_{CaL} puede estar incrementada al comienzo del desarrollo del proceso de hipertrofia (Kleiman y Houser, 1988; Keung, 1989; Beuckelmann y cols., 1992; Ryder y cols., 1993), en la hipertrofia compensada que se mantiene cerca de un status fisiológico o incluso en estadios medios de la enfermedad, la densidad de I_{CaL} permanece inalterada, (Scamps y cols., 1990; Sen y cols., 1990; Brooksby y cols., 1993b) y disminuye de forma importante en la hipertrofia severa cercana al infarto o la insuficiencia cardiaca (Nuss y Houser, 1991; Ryder y cols 1991; Rossner, 1991).

En los resultados que nosotros hemos obtenido en cuanto a la densidad de I_{CaL} en hipertrofia y control, se observa que no existe ninguna modificación en los valores de densidad de I_{CaL} con la hipertrofia. Los animales que utilizamos en esta Tesis Doctoral fueron sacrificados a las 9 semanas de someterse a una operación para estenotar la aorta abdominal y así inducir una hipertrofia por sobrepresión. En esos momentos, al hacer el cociente entre el peso del corazón con relación al peso corporal, éste se encontró un

27 % mayor en la hipertrofia, por lo que asumimos que nuestro modelo representa en ese momento un estadio medio de hipertrofia compensada. En todo momento se habla de densidad de corriente, ya que el conjunto de los estudios que se han presentado sobre los cambios de las corrientes durante la hipertrofia tienen sus datos normalizados y referidos a la superficie membranal, la cuál está aumentada en la hipertrofia, de tal manera que el número de canales de calcio sí se ve aumentado y la amplitud de la corriente también, pero al referirla a la superficie de membrana, la densidad de corriente permanece inalterada (Scamps y cols., 1990; Gómez y cols., 1997).

El análisis cinético de I_{CaL} , en nuestros resultados muestra una dependencia de voltaje de la activación de la corriente muy similar entre las células controles y las hipertróficas. En cambio, si nos fijamos en la inactivación en estado estacionario vemos que existe un desplazamiento de la curva hacia la izquierda (figura 22), es decir, a potenciales más hiperpolarizados, en el caso de la hipertrofia, el potencial al que se produce el 50% de inactivación en control es de -19.4 ± 0.12 mV en control y -31.7 ± 1.7 mV en la hipertrofia. Este hallazgo podría ayudar a explicar porqué en la curva densidad de corriente-voltaje el pico de corriente en la hipertrofia se encuentra a -10 mV y en cambio en control se encuentra a 0 mV, es decir, también está desplazado hacia la izquierda con respecto al control.

Aunque de los experimentos realizados en la presente Tesis Doctoral, no se puede extrapolar un mecanismo específico para explicar el desplazamiento observado en la curva de inactivación en estado estacionario en la hipertrofia, sí podríamos especular que éste podría ser el resultado de un cambio localizado en el potencial de membrana en la proximidad de los canales de calcio (es decir un cambio en la carga de la superficie membranal). Por el contrario, el valor al cuál se produce el 50 % de la activación no se ve prácticamente modificado en la hipertrofia (V_{50} en control: -13.9 ± 1.1 , en hipertrofia: -15.0 ± 1.4); (figura 21), lo que sugeriría que la dependencia de voltaje de la activación está determinado por un mecanismo diferente de aquel implicado en la dependencia de voltaje de la inactivación.

Aún más, en nuestros experimentos se demuestra que la corriente ventana para I_{CaL} es menor en la hipertrofia que en control (figura 23). Este hallazgo sugiere la

existencia de un mecanismo compensatorio o bien una respuesta adaptativa del corazón hipertrófico, para evitar una excesiva prolongación de la duración del potencial de acción, debido a los otros cambios producidos en las corrientes de membrana (para una revisión completa ver: Hart, 1994).

Volviendo de nuevo a I_{CaT} , las características descritas en nuestros resultados concuerdan con las descritas por otros autores para esta misma corriente (Bean, 1985; Hagiwara y cols., 1988; Alvarez y Vassort, 1992; Balke y cols., 1992). I_{CaT} se caracteriza por su dependencia de voltaje ya que se activa a potenciales más negativos que I_{CaL} , en nuestro caso comienza a activarse a -50 mV presentando un pico máximo de corriente a -20 mV mientras que I_{CaL} comienza a activarse entre -30 y -20 mV y presenta un pico máximo de corriente a -10 mV (en células hipertróficas) o 0 mV (en células controles) y además requiere de un potencial de fijación más negativo para su registro (-90 mV frente a los -50 mV utilizados como potencial de fijación para el registro de I_{CaL} pura). Por otro lado, su cinética es también característica de la corriente al ser una corriente mucho más rápida y transitoria que I_{CaL} , el tiempo al pico fue de 5.5 ± 0.3 ms frente a los 8.1 ± 0.3 ms obtenidos para I_{CaL} . Otra característica de I_{CaT} es su no selectividad al bario frente al calcio como ion transportador, ya que su conductancia no se ve modificada en presencia de uno u otro ion, a diferencia de I_{CaL} cuya conductancia aumenta grandemente en presencia de bario (figura 24). Por último, I_{CaT} se muestra sensible al bloqueo por níquel $50 \mu\text{M}$ (figura 25).

Sería interesante hacer constar que algunos autores han descrito la existencia de una corriente cuyas características son muy semejantes a las de la I_{CaT} descrita en la presente Tesis Doctoral y que podrían ser confundidas entre sí. Esta otra corriente de entrada de bajo umbral, se ha observado en ausencia de Na^+ extracelular en células auriculares humanas (Lemaire y cols., 1995), de rata (Aggarwal y cols., 1997), de cobayo (Cole y cols., 1997) y células ventriculares de rata (Santana y cols., 1998); Se ha llamado corriente de calcio sensible a TTX (I_{CaTTX}). La relación entre los canales por los que fluye I_{CaTTX} y I_{Na} , es aún hoy materia de debate (Santana y cols., 1998; Nuss y cols., 1999; Nargeot, 2000), ya que algunos autores defienden que es una corriente generada por la permeabilidad al Ca^{2+} de los canales de Na^+ clásicos que se vuelven “promiscuos” al ser modificados por fosforilación en presencia de esteroides cardiotónicos tales como la ouabaina y digoxina (Santana y cols., 1998), mientras que

otros autores defienden que existe una subpoblación de canales de Na^+ , funcionalmente distintos a los canales de Na^+ clásicos que en ausencia del agonista o del ion Na^+ en el medio extracelular podrían dejar pasar a su través calcio (Aggarwal y cols., 1997).

La existencia de I_{CaT} y I_{CaTTX} se ha demostrado siempre por separado, pero actualmente hay un estudio que muestra la coexistencia de ambas corrientes en células ventriculares de cobayo (Heubach y cols., 2000). Ambas corrientes se muestran con características diferentes aunque se activen a potenciales muy similares. Son fácilmente diferenciables utilizando níquel y TTX, ya que I_{CaT} es una corriente insensible a la presencia de TTX pero se bloquea por níquel, mientras que I_{CaTTX} es sensible a TTX y no muestra sensibilidad al níquel.

Para finalizar cabe reseñar que debido a que el rango de activación de la corriente T puede solaparse con la corriente de sodio. Nuestros estudios fueron realizados omitiendo el sodio de las soluciones y en presencia de TTX (ver sección de material y métodos). Comparando las corrientes obtenidas en presencia y ausencia de Na^+ , actualmente está demostrado que ambas corrientes, I_{Na} e I_{CaT} , son independientes entre sí (Tygat y cols., 1990c). Más aún, en presencia de TTX, la presencia o ausencia de Na^+ en el medio no altera la amplitud ni la cinética de I_{CaT} (Alvarez y Vassort, 1992).

5.1.3. I_{CaT} Y ARRITMIAS

Además de estar implicada en los procesos de crecimiento y desarrollo, I_{CaT} puede modular algunas de las características electrofisiológicas del corazón, lo que a su vez podría dar explicación al papel que desempeña en el ventrículo hipertrófico.

Numerosos estudios clínicos han demostrado que la presencia de hipertrofia ventricular izquierda aumenta la incidencia de arritmias ventriculares (Levy y cols., 1987). Por otro lado, las evidencias experimentales sugieren que el mecanismo responsable para la aparición de estas arritmias incluye la reentrada y los cambios en la actividad desencadenada (Aronson, 1981; Martins y cols., 1989).

La existencia de la hipertrofia cardiaca está normalmente asociada a la fibrosis intersticial (Weber y Brilla, 1991) y a la presencia de áreas de baja conducción o bloqueo unidireccional, lo que facilitaría la aparición de arritmias por reentrada (Pye y Cobbe, 1992). Por otro lado, el miocardio hipertrófico presenta un aumento de la duración del potencial de acción, lo que de por sí podría aumentar el riesgo de actividad desencadenada (postdespolarizaciones tempranas y postdespolarizaciones tardías).

En este contexto, en los resultados hemos descrito la existencia de una corriente ventana para I_{CaT} , que fluye en el intervalo de potenciales entre -60 mV y -20 mV, lo que podría suponer una corriente de entrada al final de la fase de meseta que facilitaría, junto con la disminución de I_{to} , el aumento en la duración del potencial de acción del corazón hipertrófico y aumentaría la probabilidad de la aparición de arritmias por postdespolarizaciones tempranas (Ertel y cols., 1997). En este sentido sería necesario la realización de más estudios funcionales que confirmarán el papel de I_{CaT} en alguna de las arritmias asociadas a la hipertrofia.

I_{CaT} se presenta en un intervalo de potenciales más negativos que I_{CaL} . Basándose en estos valores, Zhou y Lipsius, 1994, explicaban que únicamente la corriente I_{CaT} , podría estar contribuyendo a la pendiente diastólica en el potencial de acción (Fase 4). La idea se apoya en los experimentos realizados con níquel el cual inhibe totalmente la I_{CaT} en células marcapasos aisladas de aurícula de gato, y al mismo tiempo al inhibirse I_{CaT} también se inhibe la fase de lenta despolarización diastólica. Esta inhibición produce un aumento en la duración del ciclo del potencial de acción hasta que se produce el disparo de un nuevo potencial, apoyando la hipótesis de que I_{CaT} contribuye a la función marcapasos latente. Además parece ser que efectivamente, I_{CaT} está mayormente implicada en la función marcapasos latente que en la función marcapasos primaria, ya que en células marcapaso del nodo senoauricular la inhibición de esta corriente no produce un aumento tan marcado de la fase de lenta despolarización diastólica entre el final de un potencial de acción y el inicio del otro (Hagiwara y cols., 1988). De hecho, el níquel produce un mayor efecto en estas células cuando se hiperpolarizan mediante la inyección constante de una corriente, lo que indica que I_{CaT} contribuye mayormente a la actividad espontánea a voltajes diastólicos más negativos, es decir en células latentes. Esto surge también en apoyo de que la aparición de I_{CaT} en

el ventrículo hipertrófico, podría generar la aparición de focos ectópicos de actividad espontánea y como consecuencia arritmias.

5.2. MODULACIÓN DE I_{CaT}

Aunque la farmacología de los canales de calcio tipo L se ha investigado ampliamente, debido fundamentalmente a la gran importancia terapéutica de los antagonistas del calcio utilizados en clínica, no hay tanto conocimiento sobre la farmacología del canal de calcio tipo T. Sin embargo, aunque se han comenzado a hacer muchos experimentos al respecto, el conjunto de la literatura publicada es en muchos casos contradictoria. La mayoría de los agentes farmacológicos probados tienen además una actividad importante sobre los canales de calcio tipo L, lo que indica que existe mucha similitud en los sitios de interacción del fármaco con los canales L y T.

5.2.1. EFECTO DEL MIBEFRAILO SOBRE I_{CaT} e I_{CaL}

La búsqueda de un bloqueante de los canales de calcio tipo T ha ido adquiriendo más y más importancia a medida que se van conociendo más propiedades de este canal y su papel tanto en situaciones fisiológicas como patofisiológicas va siendo poco a poco esclarecido.

En nuestro caso, ya habiendo sido descrito el efecto inhibitorio del mibefradilo sobre la corriente I_{CaT} (Osterriker y Holck, 1989), utilizamos este fármaco como simple herramienta farmacológica para tener un dato más en la caracterización de la corriente I_{CaT} encontrada en la substracción de las corrientes obtenidas a los potenciales de fijación de -90 mV y -50 mV, como I_{CaT} .

En los resultados obtenidos al pulso test de -40 mV, pulso al que I_{CaL} está aun inactiva (como se demuestra al despolarizar la membrana a -40 mV desde el potencial de fijación de -50 mV), observamos como el mibefradilo es capaz de bloquear de forma

efectiva la corriente I_{CaT} , y que este bloqueo fue reversible, ya que tras un tiempo de lavado la corriente comenzó a recuperarse.

No fue posible realizar la relación densidad de corriente voltaje en presencia de mibefradilo, porque como después discutiremos, el mibefradilo produjo una disminución mayor de la corriente I_{CaL} a -50 mV que -90 mV, la corriente diferencia que obteníamos en mayor que en condiciones control.

El hecho de que el mibefradilo sea un fármaco que bloquee de manera eficaz el canal de calcio tipo T, abre el campo de la investigación de este canal y facilita su caracterización bioquímica y funcional, así como la posibilidad de aislar y clonar las proteínas que lo componen, basándose en la afinidad de este fármaco por el canal (Mishra y Hermsmeyer, 1994a). De hecho, ya actualmente se tienen datos de la clonación de éste y de algunas de sus subunidades como demuestran los trabajos presentados por Pérez-Reyes y cols., (1998).

La interacción del mibefradilo con los canales de calcio voltaje dependientes, ha sido estudiada previamente en diferentes modelos, utilizando ratas hipertensas (Hefti y cols., 1990), corazones aislados, anillos de diferentes lechos vasculares e intestinales (Osterrier y Holck, 1989) o miocitos aislados (Liang-min y Osterrier, 1991; Bian y Hermsmeyer, 1993). El mibefradilo disminuía la presión arterial de modo 3 a 5 veces más en las ratas hipertensas y tenía un efecto inotrópico negativo más débil sobre la contracción cardíaca que el verapamilo (Hefti y colss., 1990). Además, la afinidad del mibefradilo por los canales L de diferentes lechos vasculares y corazón fue en orden coronarias > venas > corazón (Liang-mín y Osterrier, 1991; Bian y Hermsmeyer, 1993).

Los resultados que obtuvimos en la presente Tesis Doctoral al tratar de ver el bloqueo de mibefradilo sobre el canal T mostraron como este bloqueo, no era selectivo sino que además ejercía un porcentaje de inhibición sobre la corriente I_{CaL} . Ya estudios anteriores demostraron que el bloqueo, que un principio se pensó selectivo para el canal T, en realidad no era así, y también ejercía un efecto inhibitorio del canal L (Lacinova y cols., 1995; Abernethy, 1997; Sarsero y cols., 1998; Karam y cols, 1999; Mocanu y cols., 1999; Parent de Curzon y cols., 2000).

Nuestros resultados mostraron que en los miocitos aislados de los corazones hipertróficos de rata el mibefradilo produjo una inhibición del 50 % en I_{CaL} obtenida a -50 mV de PF, mientras que esta inhibición sólo fue del 30% en el PF de -90 mV. Este efecto dependiente del voltaje del mibefradilo concuerda con resultados expuestos anteriormente por otros autores en miocitos auriculares de cobayo (Liang-min y Osterrier, 1991; Ertel, 1996; Bernardeu y Ertel, 1997) y en miocitos cultivados de rata adulta o neonatal (Margoni y cols., 1997). El hecho de que el mibefradilo sea más potente a potenciales más despolarizados, hace que su efecto sea más limitado a nivel de las células cardiacas no automáticas, cuyo potencial de reposo está entorno a -80 mV, comparado con las células musculares cuyo potencial de reposo está entorno a los -50 mV (Clozel y cols., 1997). Este mismo hallazgo podría sugerir una explicación a cerca de la disminución de la frecuencia cardiaca en repuesta al mibefradilo descrita anteriormente (Hermsmeyer, 1998). El potencial de reposo en células automáticas se encuentra despolarizado con relación al resto del corazón (alrededor de -60 mV) por lo que el mibefradilo actuaría de forma mayoritaria sobre el canal de calcio tipo T observado en estas células, el cuál está implicado en la fase 4 del potencial de acción o fase de lenta despolarización diastólica, de manera que al quedar inhibido en presencia del fármaco aumentaría el intervalo de tiempo entre potenciales de acción y como consecuencia disminuiría la frecuencia cardiaca, pero sin llegar a activar los sistemas presores reflejos.

Por lo que respecta al efecto de mibefradilo sobre la cinética de I_{CaL} , observamos como este no produjo ningún cambio en las propiedades cinéticas de inactivación en estado estacionario y reactivación de la corriente, siendo los parámetros de V_{50} similares en presencia y ausencia del fármaco (figuras 29 y 30).

El mibefradilo además se presenta como un bloqueante tónico del canal I_{CaL} y dependiente de frecuencia, como previamente había sido descrito por Lacinova y cols., 1995). El bloqueo tónico que ejerce el mibefradilo sobre nuestras células que fue de un 68%, valor bastante importante, mientras que el efecto dependiente de la frecuencia fue aproximadamente de un 32%. De acuerdo con la teoría de la modulación de receptores por unión de un ligando (Hille, 1977; Hondeghem y Katzung, 1984), estas propiedades indican que el fármaco podría interaccionar con diversos estados funcionales del canal. Por otro lado el mibefradilo actúa ejerciendo el ya descrito bloqueo tónico. Este tipo de

bloqueo ha tratado de ser explicado por unión del fármaco al estado cerrado o de reposo del canal (Hondegghem y Katzung, 1984).

Con estos datos, podemos concluir que el mibefradil no sólo bloquea el canal de calcio tipo T sino también el canal de calcio tipo L, aunque aún así, el bloqueo es más potente sobre el canal T, ya que éste se bloquea en un 83 % en presencia de mibefradilo 1 μM , mientras que el canal L se bloquea en un 50%. Por último, si se produce un efecto dependiente de frecuencia, podríamos especular que si al aumentar la frecuencia el bloqueo es mayor, esto sería útil en el momento de producirse arritmias y taquicardia en el transcurso de ciertas enfermedades cardíacas, ya que su efecto bloqueante aumentaría al producirse el aumento de la frecuencia.

5.2.2. NIFEDIPINO Y BAY K8644

A pesar de que inicialmente se describió una falta de sensibilidad del canal T por las dihidropiridinas agonistas y antagonistas, posteriormente numerosos artículos describieron un efecto de las dihidropiridinas sobre I_{CaT} a concentraciones muy semejantes a las utilizadas para la inhibición del canal I_{CaL} (Bean, 1985; Akaike y cols., 1989; Bonvallet y Rougier, 1989; Hirano y cols., 1989; Loirand y cols., 1989; Tseng y Boyden, 1989; Kuga y cols., 1990; Bois y Lenfant, 1991; Takahshi y Akaike, 1991; Alvarez y Vassort, 1992; Cohen y cols., 1992; Romain y cols., 1992; Wu y cols., 1992; Rubio y cols., 1993; Ertel y cols., 1997).

En nuestro caso hemos utilizado dos dihidropiridinas una agonista, el BAY K8644 y otra antagonista, el nifedipino, que ejercen diferente acción sobre el canal T. Así el nifedipino a la concentración de 1 μM , produce no sólo una inhibición ya conocida del canal L sino también una inhibición importante del canal T. La densidad de I_{CaT} a -20 mV en condiciones controles fue de -5.20 ± 0.83 pA/pF, pero en presencia del fármaco se vio inhibida prácticamente en un 80% hasta -1.75 ± 0.28 pA/pF. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por distintos investigadores utilizando también nifedipino (Akaike y cols., 1989; Alvarez y Vassort, 1992; Wu y cols., 1992). No es extraño que estos fármacos bloqueen el canal T ya que a concentraciones similares las

dihidropiridinas antagonistas tienen también efectos inhibidores sobre la corriente de Na (Yatani y cols., 1985) y de potasio (Hume y cols., 1985).

Pero no para todas las dihidropiridinas se ha descrito el mismo efecto hay algunos autores que han utilizado algunas de ellas para poder diferenciar la corriente I_{CaT} de I_{CaL} , debido a la falta de efecto de la dihidropiridina en cuestión por el canal T. Así, Bean, (1985) y Balke y cols., (1992), utilizando un rango micromolar de nitrendipino no observaron efecto sobre el canal T. En contraste, Galán y cols., (1998), si observaron un efecto del elgodipino sobre el canal T, aunque en menor medida que otras dihidropiridinas, como el oxodipino, posiblemente debido a la mayor potencia de la elgodipino sobre el músculo liso vascular que sobre el corazón.

Los resultados respecto al efecto de las dihidropiridinas sobre I_{CaT} , siguen siendo hoy en día bastante contradictorios, ya no sólo entre las distintas dihidropiridinas sino para un mismo fármaco en distintas preparaciones.

En cambio no son tan diferentes los resultados encontrados para el Bay K8644, una dihidropiridina agonista. Nuestros resultados mostraron que dicho agonista no produjo ninguna alteración en la densidad de corriente de I_{CaT} (control a -20 mV: -3.11 ± 0.53 pA/pF, Bay K8644: -3.42 ± 0.80 pA/pF), mientras que a la misma concentración, la densidad de I_{CaL} si se vio aumentada. Estos resultados concuerdan con los resultados anteriormente descritos en aurícula de perro (Bean, 1985) y en células de Purkinje (Mitra y Morad, 1986, e Hirano y cols., 1989) mientras que en aurícula de rana se observó un aumento de I_{CaT} por efecto del Bay K8644, aunque en menor medida que sobre I_{CaL} (Alvarez y Vassort, 1992).

En este punto hay que reconocer, que no sólo las diferentes especies y tipo de células utilizados pueden explicar los diferentes resultados, sino que incluso los disolventes utilizados en la preparación de los fármacos influyen. De hecho se ha descrito que la nifedipina disuelta en DMSO, en vez de acetona o etanol, es más potente inhibiendo I_{CaL} , y que sólo en DMSO es capaz de inhibir I_{CaT} , en células de neuroblastoma (Wu y cols., 1992). Además, es difícil valorar los efectos inhibidores de las dihidropiridinas sobre I_{CaT} y I_{CaL} , debido a la marcada dependencia de voltaje de

muchos de los efectos observados para estos fármacos sobre I_{CaL} (Vassort y Alvarez, 1994).

5.2.3. ENDOTELINA-1 Y ANGIOTENSINA II

No más contradictorios que los anteriores son los resultados descritos en la modulación de I_{CaT} por péptidos neurotransmisores internos del tipo de la Angiotensina II y la Endotelina-1.

Respecto a los resultados obtenidos para la angiotensina II, nosotros observamos, que este péptido no ejerce acción alguna sobre la corriente I_{CaT} , de manera que la densidad de corriente permanece inalterada en presencia y en ausencia de la angiotensina II 100 nM (figura 36). Estos resultados contrastan por un lado con trabajos publicados que describen un aumento de esta corriente por acción de la angiotensina II, mediante unión a receptores AT_1 (Cohen y cols., 1988; Bonvallet y Rougier, 1989) y por otro lado con otros trabajos que describen una disminución, por unión a receptores AT_2 (McCarthy y cols., 1993; Buisson y cols., 1995). El mecanismo de acción por el cual la Angiotensina II ejerce su efecto es aún bastante desconocido y complejo. En células bovinas de médula glomerulosa adrenal, parece que envuelve dos caminos de transducción en paralelo: la activación de la kinasa II dependiente de calmodulina y la unión a una proteína G inhibitoria (Ertel y cols., 1997), aunque no se descarta tampoco la intervención de la PKC (Vassort y Alvarez, 1994).

Por otro lado, la acción de la ET-1 sobre las corrientes de calcio no deja de ser menos polémica, tanto para I_{CaL} , como para I_{CaT} . En nuestro caso observamos como la ET-1, a la concentración de 10 nM, produce una disminución significativa de I_{CaT} desde un valor control de -2.74 ± 0.34 pA/pF hasta un valor de -1.01 ± 0.29 pA/pF con ET-1, es decir un 70 % de inhibición aproximadamente. Estos resultados se ven apoyados por los ya descritos recientemente por Tanaka y cols., (1998), en células del nodo sinoauricular de conejo, en cambio, contrastan por los descritos por Furukawa y cols., (1992) en miocitos neonatales de rata. Este último autor describe que el efecto de la ET-1 sobre I_{CaT} , es mediado a través de la PKC. Sin embargo, Tseng y Boyden, (1991), utilizando TPA, un activador de la PKC, describen una disminución de I_{CaT} en miocitos

ventriculares de perro y además en células GH_{3m} la activación de la PKC por ésteres de forbol produce una reducción de I_{CaT} (Marchetti y Brown, 1993).

Lo que sí parece más claro es que los cambios inducidos en la amplitud de I_{CaT} por acción de estos péptidos, transcurre sin cambios significativos en la cinética de la corriente, tal y como nosotros también describimos (Alvarez y Vassort, 1992).

Todo indica que aún queda mucho por hacer y descubrir con respecto a la modulación de I_{CaT} por péptidos internos neuromoduladores no sólo sobre los mecanismos intracelulares involucrados en la modulación de los canales de calcio, sino también a escala funcional y sus posibles implicaciones fisiológicas y patofisiológicas.

5.2.4. ESTIMULACIÓN ADRENÉRGICA

La exposición de nuestras células hipertróficas al isoproterenol 1 μ M, no sólo produjo un aumento de la corriente I_{CaL}, sino que además, y en nuestro caso, lo que realmente nos importaba era que también produjo un aumento significativo de la I_{CaT}. El valor de la corriente en densidad en control y en el pico de corriente a -20 mV fue de -3.21 ± 0.60 pA/pF, el cuál aumenta en un 90 % en presencia de isoproterenol, -5.97 ± 0.84 pA/pF.

Tampoco existe en la bibliografía datos concluyentes entorno a la estimulación β -adrenérgica y el canal T. Hay autores que apoyan nuestros resultados, y que describieron un aumento de la corriente I_{CaT} en presencia de isoproterenol en aurícula de rana (Alvarez y Vassort, 1994; Alvarez y cols., 1996), en células ventriculares y de Purkinje de perro (Tseng y Boyden, 1991) y en ventrículo de cobayo (Mitra y Morad, 1986). El trabajo presentado por Tseng y Boyden,(1991), describió que el aumento de I_{CaT} era secundario al aumento de la concentración de calcio intracelular tras el aumento de I_{CaL}. Además, el aumento de I_{CaT} era mayor en presencia de isoproterenol que si se eleva la concentración de calcio intracelular de manera sostenida, debido a que el aumento en la concentración de calcio por isoproterenol es de manera intermitente durante las despolarizaciones. Por tanto, el aumento intermitente de las concentraciones de calcio intracelular podría ser más efectivo que un aumento sostenido en el tiempo. Lo

que si parece cierto es que el efecto del isoproterenol sobre I_{CaT} es independiente de un aumento en los niveles de AMPc cíclico (Alvarez y Vassort., 1992). En cambio, otros autores (Tygat y cols., 1988; Charinet y cols., 1991 y Hagiwara y cols., 1988), han descrito una falta de sensibilidad al isoproterenol por parte de la corriente I_{CaT} . Las posibles discrepancias podrían explicarse por las diferentes condiciones experimentales utilizadas en cada caso.

Respecto al efecto de la estimulación α_1 -adrenérgica sobre la corriente I_{CaT} , los artículos publicados son aún más contradictorios, pero ya no sólo en el efecto sobre ésta corriente sino también en el efecto sobre I_{CaL} . Mientras que en aurícula de rana se ha descrito un aumento de I_{CaT} por noradrenalina en presencia de propanolol (Alvarez y Vassort, 1992), en neuronas sensoriales de pollo se ha descrito una disminución (Marchetti y cols., 1986). En nuestras condiciones experimentales se observó, que la fenilefrina $1\mu\text{M}$, agonista α_1 , produjo una disminución del 60-70% de I_{CaT} (por ejemplo, a -20 mV en control: $-2.746 \pm 0.427\text{ pA/pF}$, y en presencia de fenilefrina disminuye hasta $-1.410 \pm 0.140\text{ pA/pF}$).

En artículos anteriores, había sido descrito un efecto variable de la estimulación α_1 sobre I_{CaT} , en células de Purkinje de perro (Tseng y Boyden, 1989). La estimulación adrenérgica induce al menos dos cambios intracelulares importantes como son una elevación del calcio intracelular vía aumento de los niveles de inositol trifosfato (IP_3), y una activación de la PKC por la génesis de diacilglicerol (DAG). Por ello, estos mismos autores en una publicación posterior (Tseng y Boyden, 1991), trataron de explicar si esta dualidad de mecanismos intracelulares eran los causantes de la variabilidad en los resultados obtenidos por la modulación α_1 -adrenérgica sobre I_{CaT} . Llegaron a la conclusión de que el cambio en la amplitud de la I_{CaT} dependía del balance entre IP_3 -calcio intracelular para aumentar I_{CaT} , y del balance DAG-PKC, para su disminución. En realidad, esta misma línea de argumentación podría ser válida para los efectos variables también observados de la estimulación α_1 -adrenérgica sobre I_{CaL} .

6. CONCLUSIONES

- 1) En la presente Tesis Doctoral se demuestra, por primera vez, la existencia de una corriente de calcio en células ventriculares procedentes de corazones hipertróficos de rata, que no se observó en estas mismas células procedentes de corazones controles. Esta corriente se identificó como una corriente de calcio tipo T, debido a sus características cinéticas, su dependencia de voltaje, su similar selectividad al bario frente al calcio y su potente bloqueo por níquel y mibefradilo.
- 2) La superposición de las curvas de activación e inactivación para la corriente de calcio tipo T, mostró la existencia de una corriente ventana comprendida en un intervalo de potenciales entre -60 mV y -20 mV. Esto supone una corriente de entrada fluyendo al final de la fase de meseta del potencial de acción, lo que favorecería la aparición de arritmias por postdespolarizaciones tempranas en el corazón hipertrófico. Por tanto, la existencia de este canal de calcio tipo T en el ventrículo izquierdo de corazones hipertróficos, podría participar en los mecanismos asociados a la mayor incidencia de arritmias asociadas a la hipertrofia ventricular izquierda.
- 3) La corriente de calcio tipo T, puesta de manifiesto en las células ventriculares hipertróficas de rata, se muestra susceptible de modulación farmacológica por diversos agentes. Así, la estimulación α_1 -adrenérgica, algunas dihidropiridinas y la endotelina-1, producen una disminución de la corriente, mientras que la estimulación β -adrenérgica, la aumenta, y la angiotensina II y el BAY K8644, una dihidropiridina agonista, no la modifican.
- 4) Por último, el mibefradilo no sólo demostró su eficacia en bloquear al canal de calcio tipo T, sino que también mostró un efecto bloqueante significativo sobre el canal de calcio tipo L.

7. BIBLIOGRAFÍA

- Abernethy DR.** "Pharmacologic and pharmacokinetic profile of mibefradil, a T- and L-Type calcium channel antagonist". *Am J Cardiol.* 1997; **80**: 4c-11c.
- Aceto JF, Baker KM.** "(Sar)angiotensin II receptor-mediated stimulation of protein synthesis in chick heart cells". *Am J Physiol.* 1990; **258**: H806-H813.
- Ackerman MJ, Clapham DE.** "Cardiac Chloride Channels". *Trends Cardiovasc Med.* 1993; **3**: 23-28.
- Aggarbal R, Shorofsky SR, Goldman L, Balke CW.** "Tetrodotoxin blockable calcium currents in rat ventricular myocytes: A third type of cardiac cell sodium current". *J Physiol(Lond).* 1997; **505**: 353-369.
- Aiba S, Creazzo T.** "Calcium currents in hearts with persistent truncus arteriosus". *Am J Physiol.* 1992; **262**: H1182-1190.
- Akaike N, Kostyuk PG, Osipchuck YV.** "Dihydropyridine-sensitive low threshold calcium channels in isolated rat hypothalamic rat neurones". *J Physiol (Lond)* 1989; **412**: 181-195.
- Allen IS, Cohen NM, Dhallan RS.** "Angiotensin II increases spontaneous contractile frequency and stimulates calcium current in cultured neonatal rat heart myocytes: insights into underlying biochemical mechanisms". *Circ Res.* 1988; **62**: 524-534.
- Almendranal J, Villacastín J, Arenal A, Tercedor L, Merino JL, Delcan JL.** "Evidence favoring the hypothesis that ventricular arrhythmias have prognostic significance in left ventricular hypertrophy secondary to systematic hypertension". *Am J Cardiol.* 1995; **76**: 60D-63D.
- Alpert NR, Mulieri Na.** "Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. A characterization of heat liberation in normal and hypertrophied right ventricular papillary muscles". *Circ Res.* 1982; **50**: 491-500.
- Alvarez J, Rubio L, Vassort G.** "Facilitation of T-type calcium current in bullfrog atrial cells: voltage-dependent relief of a G protein inhibitory tone". *J Physiol.* 1996; **471**: 321-334.
- Alvarez JL, Vassort G.** "Properties of the low threshold Ca^{2+} current in single frog atrial cardiomyocytes". *J Gen Physiol.* 1992; **100**: 519-545.
- Alyono D, Anderson RW, Parrish DG, Dai XZ, Bache RJ.** "Alterations of myocardial blood flow associated with experimental canine left ventricular hypertrophy secondary to valvular estenosis". *Circ Res.* 1986; **58**: 47-57.
- Anversa P, Kajstura J.** "Ventricular myocytes are not terminally differentiated cells in the adult mammalian heart". *Circ Res.* 1998; **83**: 1-14.

Argibay JA, Fischmeister R, Hartzell HC. "Inactivation, reactivation and pacing dependence of calcium current in frog cardiocytes: Correlation with current density". *J Physiol (Lond)*. 1988; **401**: 201-226.

Aronson RS, Ming Z. "Cellular mechanism of arrhythmias in hipertrophied and failing myocardium". *Circulation* 1993; **87(suppl VII)**: VII76-83-.

Aronson RS. "Afterpotential and triggered activity in hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension". *Circ. Res.* 1981; **48**: 720-727.

Aronson RS. "Characteristics of action potentials of hypertrophied myocardium from rats with renal hypertension". *Circ Res.* 1980; **47**: 443-454.

Arreola J, Dirksen RT, Shieh RC. " Ca^{2+} current and Ca^{2+} transients under action potential in guinea pig ventricular myocytes". *Am J Physiol*. 1991; **261**: C393-397.

Asher CR, Topol EJ, Moliterno DJ. "Insights into the pathophysiology of arteriosclerosis and prognosis of black americans with acute coronary syndromes". *Am Heart J*. 1999; **138**: 1073-1081.

Bailey BA, Houser SR. "Calcium transients in feline left ventricular myocytes with hypertrophy induced by slow progressive pressure overload". *J Mol Cell Cardiol*. 1992; **24**: 365-378.

Baker KM, Chernin MI, Wixson SK, Aceto JF. "Renin-angiotensin system involvement in pressure overload cardiac hypertrophy in rats". *Am J Physiol*. 1990; **259**: H324-H332.

Bakx AL, van der Wall EE, Braun S, Emanuelsson H, Bruschke AV, Kobrin I. "Effects of the new calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967) on exercise duration in patients with chronic stable angina pectoris: a multicenter, placebo-controlled study. Ro 40-5967 International Study Group". *Am Heart J* 1995, **130**: 748-757.

Balke CW, Rose WC, Marban E, Wier WG. "Macroscopic and unitary properties of physiological ion flux through T-type calcium channels in guinea pig heart cells". *J Physiol (Lond)*. 1992; **456**: 247-265.

Balke CW, Shoforosky SR. "Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure". *Cardiovasc Res.* 1998; **37**: 290-299.

Barger PM, Kelly DP. "Fatty acid utilization in the hipertrophied and failing heart: molecular regulatory mechanisms". *Am J Med Sci*. 1999; **318**: 36-42.

Barrett PO, Liu LP, Lu HK, Fem RJ. "Angiotensin II stimulates aldosterone secretion by two distinct mechanisms that modulate low-voltage-activated T-type calcium channels. In Low-voltage-activated T-type Ca^{2+} Channels". Eds. Clozel J-P, Nargeot J, Taien RW, Chester, UK: Adis International; 1997.

Bartsova D, Chvapil M, Korecky B, Poupa O, Rakusan K, Turek Z y Vizec M. "The growth of the muscular and collagenous parts of the rat heart in various forms of cardiomegaly". *J Physiol (Lond)*. 1969; **200**: 285-295.

Bassett AL, Geldband H. "Chronic partial occlusion of the pulmonary artery in cats". *Circ Res*. 1973; **32**: 15-26.

Bax WA, Bruinvels AT, van Suylen R, Saxena PR, Hoyer D. "Endothelin receptors in the human coronary artery, ventricle and atrium". *Naunyn-Schmiedebergs Arch Pharmacol*. 1993; **348**: 403-410.

Beam KG, Knudson CM. "Effect of postneonatal development on calcium currents and slow charge movement in mammalian skeletal muscle". *J Gen Physiol*. 1988; **91**: 799-815.

Bean BP, Nowycky MC, Tsien RW. " β -adrenergic modulation of calcium channels in frog ventricular heart". *Nature Lond*. 1984; **307**: 371-375.

Bean BP. "Classes of calcium channels in vertebrate cells". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1989; **35**: 707-734.

Bean BP. "Two kinds of calcium channels in canine atrial cells. Differences in kinetics, selectivity and pharmacology". *J Gen Physiol*. 1985; **86**: 1-30.

Beeler GW y McGuigan JAS. "Voltage clamping of multicellular myocardial preparations: capabilities and limitations of existing method". *Prog Biophys Mol Biol*. 1978; **31**: 219-254.

Belichard P, Pruneau D, Brown NL, Salzmänn JL, Rouet R. "Hypertrophie myocardique hypertensive et troubles du rythme: deux origines probables". *Arch Mal Coeur*. 1989; **82**: 1303-1308.

Bellet M, Sasano P, Guyenne T, Corvol P, Ménard J. "Converting-enzyme inhibition buffers the counter-regulatory response to acute administration of nicardipine". *Br J Clin Pharmacol*. 1987; **24**: 465-472.

Bemham CD, Tsien RW. "Noradrenaline modulation of calcium channels in single smooth muscle cells from rabbit ear artery". *J Physiol*. 1988; **404**: 767-784.

Bénitah JP, Gómez AM, Bailly P, Da Ponte JP, Berson G, Delgado C, Lorente P. "Heterogeneity of the early outward current in ventricular cells isolated from normal and hypertrophied rat hearts". *J Physiol*. 1993; **469**: 111-138.

Bénitah JP, Vassort G. "Aldosterone upregulates Ca^{2+} current in adult rat cardiomyocytes". *Circ Res*. 1999; **85**: 1139-1145.

Bentivegna LA, Ablin LW, Kihara Y, Morgan JP. "Altered calcium handling in left ventricular pressure overload hypertrophy as detected with aequorin in the isolated perfused ferret heart". *Circ Res*. 1991; **69**: 1538-1545.

Bermink PJLM, Prager G, Schelling A, Kobrin I. "Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist mibefradil (Ro 40-5967): a new generation of calcium antagonists?". *Hypertension* 1996; **27**: 426-432.

Bernardeau A, Ertel EA. "Selective block of myocardial T-type calcium channels by mibefradil: a comparison with the 1,4-dihydropyridine amiodipine". In *Low-voltage-activated T-type Ca²⁺ Channels*". Eds. Clozel J-P, Nargeot J, Taien RW, Chester, UK: Adis International; 1997.

Berridge MJ. "Inositol lipids and cell proliferation". *Biochem Biophys Acta.* 1987; **907**: 33-45.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. "Alterations of K⁺ currents in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure". *Circ Res.* 1993; **73**: 379-385.

Beuckelmann DJ, Nabauer M, Erdmann E. "Characteristics of calcium current in isolated human ventricular myocytes from patients with terminal heart failure". *J Mol Cell Cardiol.* 1991; **23**: 929-937.

Bian K, Hermsmeyer K. "Ca²⁺ channel actions of the non-dihydropyridine Ca²⁺ channel antagonist Ro 40-5967 in vascular muscle cells cultured from dog coronary and saphenous arteries". *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1993; **348**: 191-196.

Bikkina M, Larsen M, Levy D. "Asymthomatic ventricular arrhythmias and mortality risk in subjctes with left ventricular hypertrophy". *J Am Coll Cardiol.* 1993; **22**: 1111-1116.

Billman GE. "Ro 40-5967, a novel calcium channel antagonist, protects against ventricular fibrillation". *Eur J Pharmacol.* 1992; **229**: 179-187.

Bing OHL, Brooks WW, Conrad CH, Sen S, Perreault CL, Morgan JP. "Intracellular calcium transients in myocardium from spontaneously hypertensive rats during transition to heart failure". *Circ Res.* 1991; **68**: 1390-1400.

Bogdanov KY, Zyman BD, Spurgeon HA, Lakatta EG. "L- and T-type calcium currents differ in finch and rat ventricular cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol.* 1995; **27**: 2581-2593.

Bois P, Lenfant J. "Evidence for two types of calcium currents in frog sinus venosus cells". *Pflügers Arch.* 1991; **417**: 591-596.

Bonvallet R, Rougier O. "Existence of two calcium currents recorded at normal calcium concentrations in single frog atrial cells". *Cell Calcium.* 1989; **10**: 499-509.

Bonvallet R. "A low threshold calcium current recorded at physiological Ca²⁺ concentrations in single frog atrial cells". *Pflügers Arch.* 1987; **408**: 540-542.

Bosma M, Sidell N. "Retinoic acid inhibits Ca²⁺ currents and cell proliferation in a b-lymphocyte cell line". *J Cell Physiol.* 1988; **135**: 317-323.

Boulanger CM, Desta B, Clozel JP, Vanhoutte PM. "Chronic treatment with the Ca²⁺ channel inhibitor RO 40-5967 potentiates endothelium dependent relaxations in the aorta of the hypertensive salt sensitive Dahl rat". *Blood Press.* 1994; **3**: 193-196.

Boulanger CM, Nakashima M, Olmos L, Joly G, Vanhoutte PM. "Effects of the Ca²⁺ antagonist RO 40-5967 on endothelium-dependent responses of isolated arteries". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994; **23**: 869-876.

Bouron A, Potreau D, Raymond G. "The L type calcium current in single hypertrophied myocytes isolated from right ventricle of ferret heart". *Cardiovasc Res.* 1992; **26**: 662-670.

Bril A, Forest MC, Gout B. "Ischemia and reperfusion-induced arrhythmias in rabbits with chronic heart failure". *Am J Physiol.* 1991; **261**: H301-307.

Brilla CG, Weber KT. "Prevention of myocardial fibrosis in hypertension: role of fibroblast corticoid receptor and spiro lactone". *Fed Procc.* 1991; **5**: A1256.

Brooksby P, Levi AJ, Jones JV. "The electrophysiological characteristics of hypertrophied ventricular myocytes from the spontaneously hypertensive rat". *J Hypertens.* 1993; **11**: 611-622.

Brooksby P, Levy AJ, Jones JV. "An investigation of the mechanisms underlying the increased contraction of hypertrophied ventricular myocytes isolated from the spontaneously hypertensive rat". *Cardiovasc Res.* 1993; **27**: 1268-1277.

Bugaisky I y Zak R. "Biological mechanisms of hypertrophy". En: *The heart and cardiovascular system.* Ed. Fozzard et al. Raven Press NY 1986.

Bugaisky LB, Anderson PG, Hall RS, Bishop SP. "Differences in myosin isoform expression in the subepicardial and subendocardial myocardium during cardiac hypertrophy". *Circ Res.* 1990; **66**: 1127-1132.

Bühler FR, Bolli P, Eme P. "Position of calcium antagonists in hypertensive therapy". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985; **7 (suppl 4)**: S21-S27.

Bühler FR. "Cardiovascular care with the new T-type calcium channel antagonist: possible role of attendant sympathetic nervous system inhibition". *J Hypertension.* 1997; **15(supl5)**: S3-7.

Buisson B, Bottari SP, De Gasparo. "The angiotensin AT₂ receptor modulates T-type calcium currents in non differentiated NG108-15 cells". *FEBS lett.* 1992; **309**: 161-164.

Calaghan SC, White E. "The role of calcium in the response of cardiac muscle to stretch". *Prog Biophys Mol Biol.* 1999; **71**: 59-90.

Cameron JS, Myerburg RJ, Wong SS. "Electrophysiologic consequences of chronic experimentally induced left ventricular pressure overload". *J Am Coll Cardiol.* 1983; **2**: 481-487.

- Capasso JM, Palackal T, Olivetti G, Anversa P.** "Left ventricular failure induced by long term hypertension in rats". *Circ Res.* 1990; **66**: 1400-1412.
- Carmeliet E.** "Potassium channels in cardiac cells; mechanisms of activation, inactivation and K^+ sensitivity" *Plügers Arch.* 1989; **414(supl 1)**: S88-92.
- Cerbai E, Barbieri M, Li Q, Mugelli A.** "Ionic basis of action potential prolongation of hypertrophied myocytes isolated from hearts of spontaneously hypertensive rats of different ages". *Cardiovasc Res.* 1994; **28**: 1180-1187.
- Charlemagne D, Mayoux E, Poyard M.** "Identification of two isoforms of the catalytic unit of Na^+K^+ -ATPase in myocytes from adult rat heart". *J Biol Chem.* 1987; **161**: 8941-8943.
- Charniet P, Richard S, Gurney AM.** "Modulation of Ca^{2+} currents in isolated frog atrial cells studied with photosensitive probes. Regulation by cAMP and Ca^{2+} ". *J Mol Cell Cardiol.* 1991; **23**:343-356.
- Cheglakov IB, Bochkov VN, Tkachuk VA.** "Influence of mibefradil on Ca^{2+} influx induced by vasoactive hormones or depletion of intracellular calcium stores". *Arzneimittel Forsch Drug Res.* 1997; **47**: 244-247.
- Chen C, Hess P.** "Mechanism of gating of T-type calcium channels". *J Gen Physiol.* 1990; **96**: 603-630.
- Chevalier B, Callens El Amrani F, Heymes C, Swynghedauw B.** "Molecular basis of regression of cardiac hypertrophy". *Am J Cardiol.* 1994; **73**: 10C-17C.
- Chew CYC, Hecht HS, Collett JT, McAllister RG, Singh BN.** "Influence of severity of ventricular dysfunction on hemodynamic responses to intravenously administered verapamil in ischemic heart disease". *Am J Cardiol.* 1981; **47**: 917-922.
- Chiariello M, Perrone-Filardi P.** "Pathophysiology of heart failure". *Miner Electrolyte Metab.* 1999; **25**: 6-10.
- Chiba M, Bazoberry F, Speir EH.** "Role of basic fibroblastic growth factor in angiogenesis healing and hypertrophy after rat myocardial infarction". *Circulation.* 1989; **80**: 452. Abstract.
- Clark WA, Rudnick SJ, LaPress JJ, Andreson LC, Lapointe MC.** "Regulation of hypertrophy and atrophy in cultured adult heart cells". *Circ Res.* 1993; **73**: 1163-1176.
- Cleland JG.** "Progression from hypertension to heart failure. Mechanism and management". *Cardiology.* 1999; **92**: 10-21.
- Cleophas TJ, van der Sluijs J, van der Vring JA, Daniels MC, Holwerda KJ, Withagen AJ, Schelling A, Handriks MG, Zwirderman AH.** "Combination of calcium channel blockers and beta-blockers for patients with exercise-induced angina pectoris: beneficial effect of calcium channel blockers largely determined by their effect on heart rate". *J Clin Pharmacol.* 1999; **39**: 738-746.

Clozel JP, Banken L, Osterrieder W. "Effects of Ro 40-5967, a novel calcium antagonist, on myocardial function during ischemia induced by lowering coronary perfusion pressure in dogs: comparison with verapamil". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; **14**: 713-721.

Clozel JP, Ertel EA, Ertel SI. "Discovery and main pharmacological properties of mibefradil (Ro 40-5967), the first selective T-type calcium channel blocker". *J Hypertension.* 1997; **15(supl5)**: S17-25.

Clozel JP, Veniant M, Osterrieder W. "The structurally novel Ca^{2+} channel blocker Ro 40-5967, which binds to the [3H] desmethoxyverapamil receptor, is devoid of the negative inotropic effects of verapamil in normal and failing rat hearts". *Cardiovasc Drugs Ther.* 1990; **4**: 731-736.

Clozel JP. "Pharmacology of the new calcium antagonist mibefradil". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; **27(supl A)**: S17-21.

Cohen CJ, McCarthy RT, Barret PQ. " Ca^{2+} channels in adrenal glomerulosa cells: K^+ and Angiotensin II increase T-type Ca channel current". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85**: 2412-2416.

Cohen CJ, Spires S, Van Skiver D. "Block of T-type calcium channels in guinea pig atrial cells by antiarrhythmic agents and calcium antagonists". *J Gen Physiol.* 1992; **100**: 703-728.

Cole WC, Chartier D, Martin M, Leblanc N. " Ca^{2+} permeation through Na^+ channels in guinea pig ventricular myocytes". *Am J Physiol.* 1997; **273**: H128-H137.

Coltart DJ, Meldrum SJ. "Hypertrophic myopathy. An electrophysiological study" *BMJ* 1970; **4**: 217-218.

Colucci WS. "The effects of norepinephrine on myocardial biology: implications for the therapy of heart failure". *Clin Cardiol.* 1998; **21**: 20-24.

Cooper G IV, Tomanek RJ. "Load regulation of the structure, composition and function of mammalian myocardium". *Circ Res.* 1982; **50**: 788-798.

Cooper G IV. "Cardiomyocyte adaptation to chronically altered load". *Ann Rev Physiol.* 1987; **49**: 501-518.

Cooper G IV, Kent RL, Uboh CE, Tompson EW, Marino TA. "Hemodynamics versus adrenergic control of cat right ventricular hypertrophy". *J Clin Invest.* 1985; **75**: 1403-1414.

Coraboeuf E, Carmeliet E. "Existence of two transient outwards currents in sheep cardiac purkinje fibres" *Pflügers Arch.* 1982; **392**: 352-359

Corea L, Bentivoglio M, Verdecchia P. "Reversal of left ventricular hypertrophy in essential hypertension by early and long term treatment". *Clin Trials J.* 1981; **18**: 280-294.

Creazzo TL. "Reduced L type calcium current in the embryonic chick heart with persistent truncus arteriosus". *Circ Res.* 1989; **64**: 753-763.

Cribbs LL, Lee J, Yang J, Satin J, Zhang Y, Daud A, Barclay J, Williamson M, Fox M, Rees M, Perez-Reyes E. "Cloning and Characterisation of $\alpha 1H$ from human heart, a member of the T-type Ca^{2+} channel gene family". *Circ Res.* 1998; **83**: 103-109.

Cuttilleta AF, Dowell RT, Rudnik H, Arcilla RA, Zak R. "Regression of myocardial hypertrophy I. Experimental model, changes in heart weight, nucleic acids and collagen". *J Moll Cell Cardiol.* 1975; **7**: 767-781.

Dart CH y Holloszy JO. "Hypertrophied non-failing rat heart: Partial biochemical characterization". *Circ Res.* 1969; **25**: 245-253.

Dassouli A, Sulpice JC, Roux S, Crozatier B. "Stretch-induced inositol trisphosphate and tetrakisphosphate production in rat cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol.* 1993; **25**: 973-982.

Davey PP, Bryant SM, Mulligan IP, Ryder KO, Hart G. "Rate-dependent electrical and mechanical abnormalities in guinea pig left ventricular hypertrophy". *Clin Sci.* 1992; **82**: 37P.

De la Bastie, Livinsky D, Rappaport L. "Function of the sarcoplasmic reticulum and expression of its Ca^{2+} -ATPase gene in pressure overload-induced cardiac hypertrophy in the rat". *Circ Res.* 1990; **66**: 554-564.

De Simone G, Constantino G, Soro S. "Effects of nifedipine on left ventricular hemodynamic patterns in systemic hypertension". *Am J Hypertension.* 1989; **2**: 139-145.

Delbridge ML, Pamela JC, Morgen TO. "Contractile Function of cardiomyocytes from spontaneously hypertensive rat". *J Moll Cell Cardiol.* 1996; **28**: 723-733.

DeRiemer SA, Sackmann B. "Two calcium currents in normal rat anterior pituitary cells identified by plaque assay". *Exp Brain Res.* 1986; **14**: 139-154.

Devereux RB, Roman MJ. "Inter-relationships between hypertension, left ventricular hypertrophy and coronary artery disease". *J Hypertension.* 1993; **11**: S3-S9.

Devereux RB, Roman MJ. "Left ventricular hypertrophy in hypertension: stimuli, patterns and consequences". *Hypertens Res.* 1999; **22**:1-9.

Devereux RB. "Therapeutic options in minimizing left ventricular hypertrophy". *Am Heart J.* 2000; **139**: 9-14.

DeWaard M, Gurnett CA, Campbell KP. "Structural and functional diversity of voltage-gated calcium channels". En *Ion Channels*. Eds Narahashi T. Plenum Press 1996.

DeWaard M, Pragnell M, Campbell KP. "Ca²⁺ channel regulation by conserved β -subunit domain". *Neuron*. 1994; **13**: 495-503.

Di francesco D. "A new interpretation of the pacemaker current in calf Purkinje fibres". *J Physiol*. 1981; **314**: 377-393.

Doerr TH, Denger R, Trautwein W. "Calcium currents in single SA nodal cells of the rabbit heart studied with action potential clamp". *Pflügers Arch*. 1989; **413**: 599-603.

Donnelly R. "Clinical implications of indapamide sustained release 1.5 mg in hypertension". *Clin Pharmacokinet*. 1999; **37**: 21-32.

Douglas PS, Berkon B, Lesh M, Reichek N. "Alterations in diastolic function in response to progressive left ventricular hypertrophy". *J Am Coll Cardiol*. 1989; **13**: 461-467.

Drayer JI, Gardin J, Brewer DD, Weber MA. "Disparate relationships between blood pressure and left ventricular mass in patients with and without left ventricular hypertrophy". *Hypertension*. 1987; **9(supl. 2)**: II61-II65.

Droogmans G, Nilius B. "Kinetic properties of the cardiac T-type calcium channel in guinea pig". *J Physiol (Lond)*. 1989; **419**: 627-650.

Dunn FG, Oigman W, Ventura HO. "Enalapril improves systemic and renal hemodynamics and allows regression of left ventricular mass in essential hypertension". *Am J Cardiol*. 1984; **53**: 105-108.

Dunn FG, Pringle SD. "Left ventricular hypertrophy and myocardial ischemia in systemic hypertension". *Am J Cardiol*. 1987; **60**: 191-201.

Dunn FG, Ventura HO, Messerli FH. "Time course of regression of left ventricular hypertrophy in hypertensive patients treated with atenolol". *Circulation*. 1987; **76**: 254-258.

Dzau VJ, Pratt RE. "Renin-Angiotensin system". En: Fozzard HA, Haber E, Jennigs RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The heart and cardiovascular system*. New York, NY. Ravens Press;1991.

Eckardt KU. "Cardiovascular consequences of renal anaemia and erythropoietin therapy". *Nephrol Dial Transplant*. 1999; **14**: 13.

Eghbali M, Blumenfeld O, Seifer S. "Localization of types I, II and IV collagen mRNAs in rat heart cells by *in situ* hybridation". *J Mol Cell Cardiol*. 1989; **21**: 103-113.

Elkayam U. "Calcium channel blockers in heart failure". *Cardiology*. 1998; **89(supl 1)**: 38-46

Endoh M, Takanashi M. "Inotropic effects of endothelin on mammalian ventricular contractility". *Basic Res Cardiol*. 1991; **86(supl.1)**: 173-179.

Endoh M. "Cardiac α_1 -adrenoceptors that regulate contractile function: subtypes and subcellular signal transduction mechanisms". *Neurochem Res.* 1996; **21**: 217-229.

Englemann GI, Bhoehm KD, Haskell JF, Khairallah PA, Llasr J. "Insulin-like growth factors and neonatal cardiomyocyte development: ventricular gene expression and membrane receptor variations in normotensive and hypertensive rats". *Mol Cell Endocrinol.* 1989; **63**: 1-14.

Ernst ME, Kelly MW. "Mibefradil, a pharmacologically distinct calcium antagonist". *Pharmacotherapy.* 1998; **18**: 463-485.

Ertel EA. "Mibefradil (Ro 40-5967) is a selective blocker of myocardial T-type vs L-type Ca^{2+} channels [abstract]". *Biophys J.* 1996; **70**: A315.

Ertel SI, Ertel EA, Clozel JP. "T-type Ca^{2+} channels and pharmacological blockade: potential pathophysiological relevance". *Cardiovasc Drugs Ther.* 1997; **11**: 723-739.

Escande D, Coraboeuf E, Planché C. "Abnormal pacemaking is modulated by sarcoplasmic reticulum in partially depolarised myocardium from dilated right atrial in humans". *J Mol Cell Cardiol.* 1987; **19**: 231-241.

Everse J, Kaplan NO. "Mechanism of action and biological functions of various dehydrogenase isoenzymes". In Isoenzyme. II Physiological functions. Market CL, ed. New York. 1975; 29-43.

Ewald DA, Sternweis PC, Miller RJ. "Guanine nucleotide-binding protein G₀-induced coupling of neuropeptide Y receptors to Ca^{2+} channels in sensory neurones". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85**: 3633-3637.

Ezzaher A, el Houda Bouanani N, Su JB, Hittinger L, Crozatier B. "Increased negative inotropic effect of calcium-channel blockers in hypertrophied and failing rabbit heart". *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; **257**: 466-471.

Fabiato A. "Calcium induced release from the cardiac sarcoplasmic reticulum". *Am J Physiol.* 1983; **245**: C1-14.

Farkas A, Qureshi A, Curtis M. "Inadequate ischaemia-selectivity limits the antiarrhythmic efficacy of mibefradil during regional ischaemia and reperfusion in the rat isolated perfused heart". *Br J Pharmacol.* 1999; **128**: 41-50.

Fatz B, Katz B. "The electrical of crustacean muscle fibres". *J Physiol.* 1953; **120**: 171-204.

Fenwick EM, Marty A, Neher E. "Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells". *J Physiol (Lond).* 1982; **331**: 599-635.

Fermini B, Nathan RD. "Removal of sialic acid alters both T- and L-type calcium currents in cardiac myocytes". *Am J Physiol.* 1991; **260**: H735-743.

Fermini B, Scahnne OF. “Determinants of action potential duration in neonatal rat ventricle cells”. *Cardiovasc Res.* 1991; **25** :235-243.

Fingerle J, Müller RKM, Kuhn H, Pech M, Baumgartner HR. “Mechanism of inhibition of neointima formation by the angiotensin converting enzyme inhibitor cilazapril”. *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* 1995; **15**: 1945-1950.

Flanagan WM, Corthesy B, Bram RJ, Crabtree GR. “Nuclear association of a T-cell transcription factor blocked by FK-506 and cyclosporin A”. *Nature.* 1991; **352**: 803-807.

Force T, Hajar R, del Monte F, Rosenzweig A, Choukroun G. “Signalling pathways mediating the response to hypertrophic stress in the heart”. *Gene Expr.* 1999; **7**: 337-348.

Force T, Pombo CM, Avruch JA, Bonventre JV, Kyriakis JM. “Stress-activated protein kinases in cardiovascular disease”. *Circ Res.* 1996; **78**: 947-958.

Fouad FM, Nakashima Y, Tarazi RC, Salcedo E. “Reversal of left ventricular hypertrophy in patients treated with methyl-dopa: lack of association with blood pressure control”. *Am J Cardiol.* 1982; **49**: 795-801.

Fox AP, Nowycky MC, Tsien RW. “Kinetic and pharmacologic properties distinguishing three types of calcium channels in chick sensory neurones”. *J Physiol (Lond).* 198; **394**: 49-172.

Fozzard HA, Arnsdorf MF. “Cardiac Electrophysiology”. The heart and cardiovascular system. Fozzard Eds. Raven Press, NY, 1986.

Frohlich ED. “AT₁ receptors: coronary flow and flow reserve”. *Am J Hypertens.* 2000; **13**: 39-44.

Frohlich ED, Tarazi RC. “Is arterial pressure the sole factor responsible for hypertensive cardiac hypertrophy? Part II”. *Am J Cardiol.* 1979; **44**: 959-963.

Furukawa T, Ito H, Nitta J. “Endothelin-1 enhances calcium entry through T-type calcium channels in cultured neonatal rat ventricular myocytes”. *Circ Res.* 1992; **71**: 1242-1253.

Galán L, Talavera K, Vassort G, Alvarez JL. “Characteristics of Ca²⁺ channel blockade by oxodipine and elgodipine in rat cardiomyocytes”. *Eur J Pharmacol.* 1998; **00**: 1-13.

Gardin JM, Savage DD, Ware JH, Henry WL. “Effect of age, sex and body surface area on echocardiographic left ventricular wall mass in normal subjects”. *Hypertension.* 1987; **9(supl. 2)**: II36-II39.

Garot P, Teiger E, Dupoy P, Aptecar E, Hittinger L, Dubois-Rande JL. “Coronary microcirculation and cardiovascular pathology”. *Drugs.* 1999; **59**: 23-31.

-
- Garwitz ET y Jones AW.** "Aldosterone infusion into the rat and dose dependent changes in blood pressure and arterial ionic transport". *Hypertension*. 1982; **4**: 374-381.
- Geldband H, Bassett AL.** "Depressed transmembrane potentials during experimentally induced ventricular failure in cats". *Circ Res*. 1973; **32**: 625-634.
- Gómez AM, Bénitah JP, Henzel D, Vinet A, Lorente P, Delgado C.** "Modulation of electrical heterogeneity by compensated hypertrophy in rat left ventricle". *Am J Physiol*. 1997; **41**: H1078-1086.
- Gonoi T y Hasegawa S.** "Post-natal disappearance of transient calcium channels in mouse skeletal muscle: effects of denervation and culture". *J Physiol*. 1988; **401**: 617-637.
- Gosse P, Celementy J.** "Coronary reserve in experimental myocardial hypertrophy". *Eur Heart J*. 1995; **16**: 22-25.
- Gray GA, Clozel M, Clozel JP, Baumgartner HR.** "Effects of calcium channel blockade on the aortic intima in spontaneously hypertensive rats". *Hypertension*. 1993; **22**: 569-576.
- Grossman W.** "Diastolic dysfunction in congestive heart failure". *N Eng J Med*. 1991; **325**: 1557-1564.
- Gulch RW.** "The effect of chronic loading on the action potential of mammalian myocardium". *J Mol Cell Cardiol*. 1980; **12**: 415-420.
- Gülch RW.** "Electrophysiological properties of hypertrophied myocardium". *Perspectives in Cardiovascular Research, & Myocardial Hypertrophy and Failure*, ed by N. R. Alpert. Raven Press, New York, 1983.
- Gurnett CA, Campbell KP.** "Transmembrane auxiliary subunits of voltage-dependent ion channels". *J Biol Chem*. 1996; **271**: 27975-27978.
- Guth BD.** "Reduction of exercise-induced regional contractile dysfunction in dogs using a novel calcium channel blocker (Ro 40-5967)". *Cardiovasc Drugs Ther*. 1992; **6**: 167-171.
- Gwathmey JK, Copelas L, Mackinnon R.** "Abnormal intracellular calcium handling in myocardium from patient with end-stage heart failure". *Circ Res*. 1987; **61**: 70-76.
- Gwathney JK, Morgan JP.** "Altered calcium handling in experimental pressure overload hypertrophy in ferret". *Circ Res*. 1985; **57**: 836-843.
- Hagiwara N, Irisawa H, Kamayama M.** "Contribution of two types of calcium currents to the pacemaker potentials of rabbit sinoatrial node cells". *J Physiol (Lond)*. 1988; **395**: 233-253.

Hamill OP, Marty E, Neher E, Sackmann B, Sigworth FJ. "Improved patch-clamp techniques for high resolution current recording from cells and cell-free membrane patches". *Plüggers Arch.* 1981; **391**: 85-100.

Hammond IW, Devereux RB, Alderman MH. "The prevalence and correlates of echocardiographic left ventricular hypertrophy among employed patients with uncomplicated hypertension". *J Am Coll Cardiol.* 1986; **7**: 639-650.

Hamrell BB y Alpert NR. "Cellular basis of the mechanical properties of hypertrophied myocardio". En: *The heart and the cardiovascular system.* 1507-1524. Ed. Fozzard HA et al, Raven Press NY 1986.

Han X y Ferrier GR. "Effects of α -adrenergic agents on generation of oscillatory after potentials and triggered activity in rabbit Purkinje fibers". *J Mol Cell Cardiol.* 1990; **22**: 871-888.

Haneda T, Watson PA, Morgan HE. "Elevated aortic blood pressure, calcium uptake and proteins synthesis in rat heart". *J Mol Cell Cardiol.* 1989; **21**: 131-138.

Hanf R, Drubaix I, Marotte F, Lelievre LG. "Rat cardiac hypertrophy. Altered sodium-calcium exchange activity in sarcolemal vesicles". *FEBS. Lett* 1990; **236**: 145-149.

Hart G. "Cellular electrophysiology in cardiac hypertrophy and failure". *Cardiovasc Res.* 1994; **28**: 933-946.

Hartmann HA, Mazzoca NJ, Kleiman RB, Houser SR. "Effects of phenylefrine on calcium current and contractility of feline ventricular myocytes". *Am J Physiol.* 1988; **255**: H1173-H1180.

Hatt PY, Berjal g, Moravec J y Swynghedauw B. "Hert failure: An electron microscopic study of the left ventricular capillary muscle in aortic insufficiency in the rabbit". *J Mol Cell Cardiol.* 1970; **1**: 235-247.

Heagerty AM, Alkjaer C, Bund SJ, Korsgaard N, Mulvany MJ. "Small artery structure in hypertension. Dual processes of remodelling and growth". *Hypertension.* 1992; **21**: 391-397.

Helti F, Clozel JP, Osterrieder W. "Antihypertensive properties of the novel calcium antagonist (1S-2S)-2-[[[3-(2-benzimidazolyl)propyl]methoxyacetate dihydrochloride in rat, models of hypertension. Comparison with verapamil." *Arzneimittelforschung.* 1990; **40**: 417-421.

Hemwall EL, Duthinh V, Houser SR. "Comparison of slow response action potentials from normal and hypertrophied myocardium". *Am J Physiol.* 1984; **246**: H675-682.

Hermsmeyer K, Miyagawa K. "Protein kinase C mechanism enhances vascular relaxation by Ca antagonist Ro 40-5967". *Vasc Res.* 1996; **33**: 71-77.

Hermesmeyer K. "Membrane signals from vasoconstriction, automaticity and growth". *Cardiology*. 1998; **89(supl1)**: 2-9.

Hescheler J, Nawrath H, Tang M, Trautwein W. "Adrenoceptor-mediated changes of excitation and contraction in ventricular heart muscle from guinea-pigs and rabbits". *J Physiol*. 1988; **397**: 657-670.

Hess P, Lansman JB, Tsien RW. "Different modes of Ca²⁺ channel gating behaviour favoured by dihydropyridine Ca²⁺ agonists and antagonists". *Nature*. 1984; **311**: 538-544.

Hess P. "Cardiac calcium channels". En "Cardiac electrophysiology. From cell to bedside". Eds. Zipes y Jalife. Saunders company. 1990.

Heubach JF, Kohler A, Wettwer E, Ravens U. "T-Type and tetrodotoxin-sensitive Ca²⁺ currents coexist in guinea pig ventricular myocytes and are both blocked by mibefradil". *Circ Res*. 2000; **86**: 628-635.

Hickson RC, Hammons GT y Holloszy JO. "Development and regression of exercise-induced hypertrophy in the rat". *Am J Physiol*. 1979; **236**: H268-H272.

Hille B. "Local anesthetics: Hydrophilic and hydrophobic pathways for the Drug-Receptor reaction". *J Gen Physiol*. 1977; **69**: 489-515.

Hirano Y, Fozzard HA, January CT. "Characteristics of L- and T-type Ca²⁺ Currents in canine cardiac Purkinje cells". *Am J Physiol*. 1989; **256**: H1478-1492.

Ho SN, Thomas DJ, Timmermans A, Li X, Francke U Crabtree GR. "NFATc3, a lymphoid specific NFATc family member that is calcium regulated and exhibits distinct DNA binding specificity". *J Biol. Chem*. 1995; **270**: 19898-19907.

Hodgkin AL, Huxley AF. "A quantitative description of membrane current and its application to conduction and excitation in nerve". *J Physiol*. 1952; **117**: 500-544.

Hofman F, Biel M, Flockerzi V. "Molecular basis for Ca²⁺ channels diversity". *Annu Rev Neurosci*. 1994; **17**: 399-418.

Holtz J. "Role of ACE inhibition or AT₁ blockade in the remodeling following myocardial infarction". *Basic Res Cardiol*. 1998; **93**: 92-100.

Hondeghem LM y Katzung BG. "Antiarrhythmic agents: The modulated receptor mechanism of action of sodium and calcium channel-blocking drugs". *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1984; **24**: 387-423.

Houghton JL, Carr AA, Prisant LM. "Morphologic, haemodynamic and coronary perfusion characteristics of severe left ventricular hypertrophy secondary to systemic hypertension and evidence for non atherosclerotic myocardial ischemia". *Am J Cardiol*. 1992; **69**: 219-224.

Houser SR, Freeman AR, Jaeger JM. "Resting potential changes associated with Na⁺-K⁺ pump in failing heart muscle". *Am J Physiol.* 1981; **240**: H168-176.

Hume JR, Harvey RD. "Chloride conductance pathways in the heart". *Am J Physiol.* 1985; **261**: C399-C412.

Hypertension Detection and Follow-up Program Cooperative Group. "Race, education and prevalence of hypertension". *Am J Epidemiol.* 1977; **106**: 351-361.

Isenberg G, Klockner U. "Calcium currents of isolated bovine ventricular myocytes are fast and of large amplitude". *Pflügers Arch.* 1982; **395**: 30-41.

Ishikawa T, Yanagisawa M, Kimura S, Goto K, Maski T. "Positive inotropic action of novel vasoconstrictor peptide endothelin on guinea-pig atria". *Am J Physiol.* 1988; **255**: H970—H973.

Ito H. "Endothelins and cardiac hypertrophy". *Life Sci.* 1997; **61**:585-593.

Ivens I, Deitmar JW. "Inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ current by concavalin". *Pflügers Arch.* 1986; **406**: 212-217.

Izumo S, Aoki H. "Calcineurin-the missing link in cardiac hypertrophy". *Nature.* 1998; **4**: 661-662.

Izumo S, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. "Proto-oncogene induction and reprogramming of cardiac gene expression produced by pressure overload". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1988; **85**: 339-343.

Jalife J, Delmar M, Davidenko JM, Anumonwo J. "Basic Cardiac Electrophysiology for the clinician". Futura publishing Inc. Armonk NY, 1999.

Jalil JE, Janiciki JS, Pick R, Weber KT. "Coronary vascular remodeling and myocardial fibrosis in the rat with renovascular hypertension". *Am J Hypertension.* 1991; **4**: 51-55.

Janse MU, Kléber AG. "Electrophysiological changes and ventricular arrhythmias in the early phase of regional myocardial ischemia". *Circ Res.* 1981; **49**: 1069-1081.

January CT, Riddle JM. "Early afterdepolarizations: mechanism of induction and block. A role for L-type calcium current". *Circ Res* 1989; **64**: 977-990.

Johnston CI. "Biochemistry and pharmacology of the renin-angiotensin system". *Drugs.* 1990; **39(supl.1)**: 21-31.

Josephson IR, Sanchez-Chapula J, Brown Am. "A comparison of calcium currents in rat and guinea pig single ventricular cells". *Circ Res.* 1984; **54**: 144-156.

Julien J, DuFloux MA, Prasquier R. "Effects of captopril and minoxidil on left ventricular hypertrophy in resistant hypertensive patients: a 6 month doubled-blind comparison". *Am J Cardiol.* 1990; **16**:137-142.

Kannel W, Castelli WP, McNamara PM, McKee PA, Feinleib M. “Role of blood pressure in the development of congestive heart failure: The Frammingham Study”. *N Engl J Med.* 1972; **287**: 781-787.

Kannel WB, Cobb J. “Left ventricular hypertrophy and mortality-results from the Frammingham study”. *Cardiology.* 1992; **81**: 291-298.

Kannel WB, Schartkin A. “Sudden death: lessons from subsets in population studies”. *J Am Coll Cardiol.* 1985; **5**: 141B-149B.

Kannel WB. “Historic perspectives on the relative contributions of diastolic and systolic blood pressure elevation to cardiovascular risk profile”. *Am Heart J.* 1999; **138**: 205-210.

Karam H, Clozel JP, Bruneval P, Gonzalez MF, Menard J. “Contrasting effects of selective T- and L-type calcium channel blockade on glomerular damage in DOCA hypertensive rats”. *Hypertension.* 1999; **34**: 673-678.

Karam H, Heudes D, Hess P. “Respective role of humoral factors and blood presure un cardiac remodeling of DOCA hypertensive rats”. *Cardiovasc Res.* 1996; **31**: 287-296.

Karila-Cohen D, Dubois-Randé J-L, Giudicelli J-F, Berdeaux A. “Effects of mibefradil on large and small coronary arteries in conscious dogs: role of vascular endothelium”. *J. Cardiovasc Pharmacol.* 1996; **28**:271-272.

Karliner JS, Kariya T, SimpsonPC. “Effects of pertusis toxin on alpha-1 mediated phosphatidylinositide turnover and myocardial cell hypertrophy in neonatal rat myocytes”. *Experientia.* 1990; **46**: 81-84.

Karmazyn M, Gan XT, Humphreys RA, Yoshida H, Kusumoto K. “Myocardial Na⁺-H⁺ exchange: structure, regulation and its role in heart disease”. *Circ Res.* 1999; **85**: 777-786.

Karmazyn M. “The role of endothelins in cardiac function in health and disease”. *Pflüggers Arch.* 1996; **412**: 328-330.

Kasai H. “Voltage-and time-dependent inhibition of neuronal calcium channels by a GTP-binding protein in mammalian cell line”. *J Physiol (Lond).* 1992; **448**: 189-209.

Kass RS, Blair ML. “Effects of angiotensin on membrane curent in cardiac Purkinje fibers”. *J Mol Cell Cardiol.* 1981; **13**: 797-809.

Katz AM. “Calcium channel diversity in the cardiovascular system”. *J Am Coll Cardiol.* 1996; **28**: 522-529.

Katz AM. “The cardiomyopathy of overload”. *N Eng J Med.* 1991; **322**: 100-110.

Kaufmann RL, Homburger H, Wirth H. "Disorder in excitation-contraction coupling of cardiac muscle from cats with experimentally produced right ventricular hypertrophy". *Circ Res.* 1971; **28**: 346-57.

Kawano S, DeHaan RL. "Low-threshold current is mayor current in chick ventricular cells". *Am J Physiol.* 1989; **256**: H1505-1508.

Kawano S, DeHaan RS. "Developmental changes in calcium currents in embryonic chick ventricular myocytes". *J Membr Biol.* 1991; **120**: 17-28.

Kelly RA, Eid H, Kramer BK, O'Neill M, Liang BT, Reers M, Smith TW. "Endothelin enhances the contractile responsiveness of adult rat ventricular myocytes to calcium by a pertussis toxin sensitive pathway". *J clin Invest.* 1990; **86**: 1164-1171.

Kent RL, Hooper JK, Cooper G. "Load responsiveness of protein synthesis in adult mammalian myocardium; role of cardiac deformation linked to sodium influx". *Circ Res.* 1989; **64**: 74-85.

Keung EC. "Calcium current is increased in isolated adult myocytes from hypertrophied rat myocardium". *Circ Res.* 1989; **64**: 753-763.

King BD, Sack D, Kichuk MR, Hintze TH. "Absence of hypertension despite chronic marked elevations in plasma norepinephrine in concious dogs". *Hypertension.* 1987; **9**: 582-590.

Kleiman RB, Houser SR. "Calcium currents in normal and hypertrophied isolated feline ventricular cells". *Am J Physiol.* 1988; **240**: H1434-1442.

Klug D, Robert V, Swynghedauw B. "Role of mechanical and hormonal factors in cardiac remodeling and the biologic limits of myocardial adaptation". *Am J Cardiol.* 1993; **71**: 46A-54A.

Knufman NMJ, van der Laarse A, Vliegen HW, Brinkman CJJ. "Quantification of myocardial necrosis and cardiac hypertrophy in isoproterenol-treated rats" *Res Commun Chem Pathol Pharmacol.* 1987; **57**: 15-32.

Kobrin I, Bieska G, Charlon V, Lindberg E, Pordy R. "Anti-anginal and anti-ischemic effects of mibefradil, a new T-type calcium channel antagonist". *Cardiology.* 1998; **89(supl 1)**: 23-32.

Koening H, Goldstone A, Lu CY. "Testosterone-mediated sexual dimorphism in the rodent heart: Ventricular lysosomes, mitochondria, and cell growth are modulated by androgens". *Circ Res.* 1982; **50**: 782-787.

Kohlhardt M, Krause H, Kubler M, Herdey A. "Kinetics of inactivation and recovery of the slow inward current in the mammalian ventricular myocardium". *Pflügers Arch.* 1975; **355**: 1-17.

- Kohya T, Kimura S, Myerburg RJ, Bassett AL.** "Suceptibility of hypertrophied rat hearts to ventricular fibrillation during acute ischemia". *J Mol Cell Cardiol.* 1988; 20: 159-168.
- Kolbeck-Ruhmkorff C, Horban A, Zimmer HG.** "Effect of pressure and volume overload in protooncogene espression in isolated working rat heart". *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 1998-2004.
- Komuro I, Kaida T, Shibazaki Y.** "Streching cardiac myocytes stimulates protooncogene expression" *J Biol Chem.* 1990; 265: 3595-3598.
- Komuro I, Katoh Y, Kaida T.** "Mechanical loading stimulates cell hypertrophy and specific gene expression in cultured rat cardiac myocytes; possibe role of PKC activation". *J Biol Chem.* 1991; 266: 1265-1268.
- Komuro I, Kurabyashi M, Takaku F, Yazaki Y.** "Expression of cellular oncogenes in the myocardium during the developmental stage and pressure overloaded hypertrophy of the heart". *Circ Res.* 1988; 62: 1075-1079.
- Komuro I, Kurihara H, Sagiya T, Takaku F, Yazaki Y.** "Endothelin stimulates c-fos and c-myc expression and proliferation of vascular smooth muscle cells". *FEBS* 1988; 238: 249-252.
- Koren MJ, Devereux RB, Casale PN, Savage DD, Laragh JH.** "Relation of left ventricular mass and geometry to morbidity and mortality in men and women with essential hypertension". *Ann Intern. Med.* 1991; 114: 345-352.
- Koski.** "Myocardial ischaemia in the hypertensive patient. The role of coronary microcirculation abnormalities". *J European Pharmacol.* 1993.
- Krayenbuhl JC, Vozeh S, Kondo-Oestreicher M, Dayer F.** "Drug-drug interactions of new active substance: Mibefradil example". *Eur J Clin Pharmacol.* 1999; 55: 559-565.
- Kuga T, Sadoshima JI, Tomoike H.** "Actions of Ca²⁺ antagonists on two types of Ca²⁺ channels in rat aorta smooth muscle cells in primary culture". *Circ Res.* 1990; 67: 469-480.
- Kuo TH, Tsang W, Wiener J.** "Defective Ca²⁺-pumping ATPase of heart sarcolemma from cardiomyopathic hamster". *Biochem Byophys Acta.* 1987; 900: 10-16.
- Kuschnir E.** "Impact of calcium antagonists on the cardiovascular system: experience with lacidipine". *Drugs.* 1999; 57: 11-17.
- Lacinova L, Welling A, Bosse E, Ruth P, Flockerzi V, Hofmann F.** "Interaction of Ro 40-5967 and verapamil with the stably expressed alpha 1-subunit of the cardiac L-type calcium channel". *J Pharmacol Exp Ther.* 1995; 274: 54-63.

Lacourcière Y, Poirier L, Lefebvre J. “The antihypertensive efficacy of the novel calcium antagonist mibefradil in comparison with nifedipine GITS in moderate to severe hypertensives with ambulatory hypertension”. *Am J Hypertens.* 1997; **10**: 189-196.

Lederer JW, Nichols CG. “Nucleotide modulation of the activity of the heart ATP-sensitive potassium channels in isolated membrane patches”. *J Physiol.* 1989; **419**: 193-211.

Leenen FH. “Regression of cardiac hypertrophy by 1,4 dihydropyridines in hypertensive patients”. *J Hypertension.* 1998; **16**: 9-15.

Leger J, Deschesne P, Bouvagnet P, Leger J. “Contractile proteins in the normal and hypertrophied heart”. En: Research in cardiac hypertrophy and failure. Ed. Swynghedauw. Montrouge France. 1990.

LeGrand B, Deroubaix E, Coulombe A. “Stimulatory effect of ouabain on T- and L-type calcium currents in guinea pig cardiac myocytes”. *Am J Physiol.* 1990; **258**: H1620-1623.

LeGrand B, Hatem S, Deroubaix E. “Calcium current depression in isolated human atrial myocytes after cessation of chronic treatment with calcium antagonists”. *Circ Res.* 1991; **69**: 292-300.

Leighton J, Merkow L y Locker M. “Alteration in the size of the heart of late chick embryo after incubation at various temperatures”. *Nature.* 1964; **201**: 198-199.

Leite MF, Page E, Amber SK. “Regulation of ANF secretion by endothelin-1 in culture atrial myocytes”. *Am J Physiol.* 1994; **267**: H2193-H2203.

Lemaire S, Piot C, Seguin Y, Nargeot J, Richard S. “Tetrodotoxin-sensitive Ca^{2+} and Ba^{2+} currents in human atrial cells”. *Receptors Channels.* 1995; **3**: 71-81.

Levine TB, Bernink PJ, Caspi A, Elkayam U, Geltman EM, Greenberg B, McKenna WJ, Ghali JK, Giles TD, Marmor A, Reisin LH, Ammon S, Lindberg E. “Effect of mibefradil, a T-type calcium channel blocker, on morbidity and mortality in moderate to severe congestive heart failure: the MACH-1 study”. *Circulation.* 2000; **101**: 758-764.

Levy D, Anderson KM, Savage DD, Balkus SA, Kannel WB, Castelli WP. “Risk ventricular arrhythmias in left ventricular hypertrophy: The Framingham study”. *Am J Cardiol.* 1987; **60**: 560-565.

Levy D, Anderson KM, Savage DD, Kannel WB, Christiansen JC, Castelli WP. “Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. The Framingham heart study”. *Ann Intern Med.* 1988; **108**: 7-13.

Levy D, Garrison RJ, Savage DD, Kannel WB, Castelli WP. “Prognostic implications of echocardiographically determined left ventricular mass in the Framingham Heart Study”. *N Engl J Med.* 1990; **322**: 1561-1566.

Li K, He H, Li C, Sirois P, Roleau JL. "Myocardial α_1 -adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications". *Life Sci.* 1997; **16**: 1305-1318.

Liang-Min F, Osterrieder W. "Potential-dependent inhibition of cardiac Ca^{++} inward currents by Ro 40.5967 and verapamil: relation to negative inotropy". *Eur J Pharmacol.* 1991; **196**: 205-207.

Limas C, Limas CJ. "Influence of thyroid status on intracellular distribution of cardiac adrenoceptors". *Circ Res.* 1987; **61**: 824-828.

Lindpaitner K, Jin M, Willhem MJ, Suzuki F, Linz W, Schöllkens BA, Ganten D. "Intracardiac generation of angiotensin and its physiologic role". *Circulation.* 1988; **77** (Supl.1): I18-I23.

Lindqvist M, Kahan T, Melcher A, Hjerndahl P. "Acutes and chronic calcium antagonist treatment elevates sympathetic activity in primary hypertension". *Hypertension.* 1994; **24**: 287-296.

Lipsius SL. "Effects of extracellular Mg^{2+} on T- and L-type Ca^{2+} currents in single atrial myocytes". *Am J Physiol.* 1990; **259**: H1842-H1850.

Liu Q, Karpinski E, Pang PK. "The L-type calcium channel current is increased by alpha-1adrenoceptor activation in neonatal rat ventricular cells". *J Pharmacol Exp Ther.* 1994; **271**: 935-943.

Llinás R, Yarom Y. "Specific blockade of the low threshold calcium channel by high molecular weight alcohols". *Soc. Neurotics Amstar.* 1986; p174.

Loh C, Carew JA, Kim J, Hogan PG, Rao A. "T-cell receptor stimulation elicits an early phase of activation and a later phase of deactivation of the transcription factor NFAT1. *Mol Cell Biol.* 1993; **16**: 3945-3954.

Loirand G, Minorca C, Mironneau J. "Two types of calcium currents in single smooth muscle cells from rat portal vein". *J Physiol (Lond).* 1989; **412**: 333-349.

Lompre AM, Nadal-Ginard B, Mahdavi V. "Expression of the cardiac ventricular α and β myosin heavy chain genes is developmentally and hormonally regulated". *J Biol Chem.* 1983; **259**: 6437-6446.

Long CS, Kariya K, Karns L, Simpson PC. "Trophic factors for cardiac myocytes". *J Hypertension.* 1990; **8**: S219-S224.

Lopez-Merino V, Garci R, Llopis R, Charro FJ. "Insuficiencia cardiaca. Fisiopatología, cuadro clínico, diagnóstico y pronóstico". Ed. Masson-Salvat medicina. "El manual de medicina". 1992.

Lorell BH, Apstein CS, Weinberg EQ, Cunningham MJ. "Diastolic function in left ventricular hypertrophy: clinical and experimental relationships". *Eur Heart J.* 1990; **11**: G54-G64.

Lortet S, Zimmer HG, Rossi A. “Inotropic response of the heart during development and regression of triiodothyronine-induced hypertrophy”. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1989; **14**: 707-712.

Mace PJ, Litter WA, Glover DR. “Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension: Comparative effects of three different drugs”. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1985; **7**: S52-S55.

Maisch B. “Ventricular remodelling”. *Cardiology.* 1996; **87**: 2-10.

Makinsey y Olson. *Curr Opin Genet Dev.* 1999; **9**: 267-274.

Mangoni M, Lauranguer V, Bourinet E, Nargeot J, Richard S. “Block of cardiac Ca^{2+} channels by the new Ca^{2+} antagonist Ro 40-5967: consequences on heart rats and cardiac output [abstract]”. *Biophys J.* 1997; **72**: A256.

Mann JF. “What are the short-term and long-term consequences of anaemia in CRF patients?”. *Nephrol Dial Transplant.* 1999; **14**: 29-36.

Marban E y Koretsune Y. “Cell calcium, oncogenes, and hypertrophy”. *Hypertension.* 1990; **15**: 652-658.

Marban E, Kitakaze M, Kusuoka H, Portfield JK, Yue DT, Chacko VP. “Intracellular free calcium concentrations measured with ^{19}F NMR spectroscopy in intact ferret hearts”. *Proc Natl Acad Sci.* 1987; **84**: 6005-6009.

Marchetti A, Carbone E, Lux HD. “Effects of dopamine and noradrenaline on Ca^{2+} channels of cultured sensory and sympathetic neurones of chick”. *Pflügers Arch.* 1986; **406**: 104-111.

Marchetti C, Brown AM. “Two types of calcium currents in GH_3 cells”. *Am J Physiol.* 1993; **254**: C206-210.

Martinez ML, Fernández-Tomé P, López-Miranda V, Colado MI, Delgado C. “Modulation of adrenergic receptors during left ventricular hypertrophy development and following regression by captopril”. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999; **39**: 505-511.

Martins JB, Kim W, Marcus ML. “Chronic hypertension and left ventricular hypertrophy facilitate induction of sustained ventricular tachycardia in dogs 3 hours after circumflex coronary artery occlusion”. *J Am Coll Cardiol.* 1989; **14**: 1365-1373.

Marty A y Neher E. “Tight seal whole cell recording”. En “Single channel recording”. Ed. Sackman B y Neher E. Plenum Press NY, 1983.

Masaki T. “Endothelins: homeostatic and compensatory actions in the circulatory and endocrine systems”. *Endocrinology.* 1993; **14**: 256-268.

Massie BM. “Mibefradil: a selective T-type calcium antagonist”. *Am J Cardiol.* 1997; **80**: 231-321.

Matsura H, Ehara T. "Activation of chloride current by purinergic stimulation in guinea pig heart cells". *Circ Res.* 1992; **70**: 851-855.

Mayoux E, Callens F, Swynghedauw B. "Adaptional process of the cardiac Ca²⁺ channels to pressure overload: biochemical and physiological properties of dihydropyridine receptors receptors in normal and hypertrophied rat hearts". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1988; **12**: 390-396.

McCaffrey PG, Luo C, Kerpola TK, Jain J, Badalian TM, Ho AM. "Isolation of the cyclosporin-sensitive T cell transcription factor NFATp". *Science.* 1993; **262**: 750-754.

McCarthy RT, Cohen CJ. "Nimodipine block of calcium channels in clonal pituitary cells". *J Gen Physiol.* 1989; **94**: 669-692.

McCarthy RT, Isales C, Rasmussen H. "T-type calcium channels in adrenal glomerulosa cells: GTP-dependent modulation by angiotensin II". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993; **90**: 3260-3264.

McDonald TF, Cavalié A, Trautwein W, Pelzer D. "Voltage-dependent proprieties of macroscopic and elementary calcium channel currents in guinea pig ventricular myocytes". *Pflügers Arch.* 1986; **406**: 437-448.

McDonough JR, Garrison GE, Hames CG. "Blood pressure and hypertensive disease among negroes and whites". *Ann Intern Med.* 1964; **61**: 208-228.

McLlennan JM, Isles CG, Dunn FG. "Left ventricular hypertrophy as an independent risk factor in hypertension". *J Hypertension.* 1987; **5**: S628.

Ménard J, Karam H, Véniant M, Heudes D, Bruneval P, Clozel JP. "Effects of calcium blockade on end-organ damage in experimental hypertension". *J Hypertens.* 1997; **15**(suppl 3): S19-S30.

Mercadier JJ, Bouveret P Gorza L. "Myosin isoenzymes in normal and hypertrophied human ventricule myocardium". *Circ Res* 1983; **53**: 52-62.

Mercadier JJ, de la Bastie D, Menasche P. "α-myosin heavy chain isoform and atrial size in patients with various types of mitral valve dysfunction: A quantitative study". *J Am Coll Cardiol.* 1987; **9**: 1024-1030.

Mercadier JJ, Lompre AM, Duc P. "Altered sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase gene expression in the human ventricle during end-stage heart failure". *J Clin Invest.* 1990; **85**: 305-309.

Messerli FH, Garavaglia GE, Schmieder RE, Sundgaard-Riise K, Nuñez BD, Amodeo C. "Disparate cardiovascular findings in men and women with essential hypertension". *Ann Intern Med.* 1987; **107**: 158-161.

Messerli FH, Ketelhut R. "Left ventricular hypertrophy: a pressure independent cardiovascular risk factor". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; **22**(supl.1): S7-S13.

Messerli FH, Sundgaard-Riise K, Reisin ED. "Dimorphic cardiac adaptation to obesity and arterial hypertension". *Ann Intern Med.* 1983; **99**: 757-761.

Messerli FH. "Cardiopathy of obesity a not so-Victorian disease". *N Eng J Med.* 1986; **314**: 378-380.

Messerli FH. "Cardiovascular effects of obesity and hypertension". *Lancet.* 1982; **1**: 1165-1168.

Messerli FH. "Hypertension and sudden cardiac death". *Am J Hypertension.* 1999; **12**: 181-188.

Mishra SK, Hermameyer K. "Selective inhibition of T-type Ca^{2+} channels by Ro 40-5967". *Circ Res.* 1994a; **75**: 144-148.

Mishra SK, Hermsmeyer K. "Inhibition of trigger Ca^{2+} in dog coronary arterial muscle cells by Ro 40-5967". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1994b; **24**: 1-7.

Mitra R, Morad M. "Two types of calcium channels in guinea pig ventricular myocytes". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1986; **83**: 5340-5344.

Miyauchi T, Goto K. "Heart failure and endothelin receptor antagonists". *Trends in Pharmacol Sci.* 1999; **20**: 210-217.

Mocanu MM, Gadgil S, Yellon DM, Baxter GF. "Mibefradil, a T-type and L-type calcium channel blocker, limits infarct size through a glibenclamide-sensitive mechanism". *Cardiovasc Drugs Ther.* 1999; **13**: 115-122.

Mochizuki T, Eberli FR, Apstein CS, Lorell BH. "Exacerbation of ischemic dysfunction by angiotensin II in red-cell perfused rabbit hearts: effects on coronary flow, contractility and high energy phosphate metabolism". *J Clin Invest.* 1992; **89**: 490-498.

Molkentin JD, Lu JR, Antos CL, Markham B, Richardson J, Robbins J, Grant SR, Olson EN. "A Calcineurin dependent transcriptional pathway for cardiac hypertrophy". *Cell.* 1998; **93**: 215-228.

Morad M, Cleeman L. "Role of Ca^{2+} channel in development of tension in heart muscle". *J Mol Cell Cardiol.* 1987; **19**: 527-553.

Moravec CS, Reynolds RW, Stewart RW, Bond M. "Endothelin is a positive inotropic agent in human and rat heart". *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; **159**: 14-18.

Moreau P. "Endothelin in hypertension: a role for receptor antagonists?". *Cardiovasc Res.* 1998; **39**: 534-542.

Morgan HE, Baker KM. "Cardiac hypertrophy: mechanical, neural and endocrine dependence". *Circulation.* 1992; **83**: 13-25.

Morgan HE, Gordon EE, Kira Y. "Biochemical mechanisms of cardiac hypertrophy". *Ann Rev Physiol.* 1987; **49**: 533-543.

Mueller TM, Marcus ML, Kerber RE, Young JA, Barnes RW, Abboud FM. "Effect of renal hypertension and left ventricular hypertrophy on coronary circulation in dogs". *Circ Res.* 1978; **42**: 543-549.

Mulder P, Richard V, Compagnon P. "Increased survival after long-term treatment with mibefradil, a selective T-channel calcium antagonist, in heart failure". *J Am Coll Cardiol.* 1997; **29**: 416-421.

Mulder P, Richard V, Thuillez C. "Different effects of calcium antagonists in a rat model of heart failure". *Cardiology.* 1998; **89(supl 1)**: 33-37.

Mullins ME, Horowitz BZ, Linden DH, Smith GW, Norton RL, Stump J. "Life-threatening interaction of mibefradil and beta-blockers with dihydropyridine calcium channel blockers". *JAMA.* 1998; **280**: 157-158.

Muntinga HJ, van der Vring JA, Niemeyer MG. "Effect of mibefradil on left ventricular diastolic function in patients with congestive heart failure". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1996; **27**: 652-656.

Nagano M, Higahi J, Mikami H. "Converting enzyme inhibitor regressed cardiac hypertrophy and reduced tissue angiotensin II in spontaneously hypertensive rats". *J Hypertension.* 1991; **9**: 595-599.

Nagano M, Iwatsubo H, Hata T, Mikami H, Ogihara T. "Effects of antihypertensive therapy on cardiac hypertrophy and cardiac function in elderly hypertensive patients". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; **17**: S163-S165.

Nargeot J. "A tale of two (calcium) channels". *Circ Res.* 2000; **86**: 613-615.

Naruse K, King GL. "Protein kinase C and myocardial biology and function". *Circ Res.* 2000; **86**: 1104-1106.

Natsume T. "Therapeutic advances in the treatment of left ventricular hypertrophy". *Eur Heart J.* 1993; **14**: D33-D37.

Neher E, Sackmann B, Steinbach H. "The extracellular Patch-Clamp: A method for resolving currents through individual open channels in biological membranes". *Plüggers Arch.* 1978; **375**: 219-228.

Nilius B, Hess P, Landsman JB. "A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells". *Nature* 1985; **316**: 443-446.

Nilius B, Hess P, Lansman JB, Tsien RW. "A novel type of cardiac calcium channel in ventricular cells". *Nature (lond).* 1985; **316**: 443-446.

Nobile M, Carbone E, Lux HD. "Temperature sensitivity of Ca²⁺ current in chick sensorial neurones". *Pflügers Arch.* 1990; **415**: 658-663.

Noll G, Lüscher T. “Comparative pharmacological properties among calcium channel blockers: T-channel versus L-channel blockade”. *Cardiology*. 1998; **89(Supl.1)**: 10-15.

Nordin C, Siri F, Aronson RS. “Electrophysiological characteristics of single myocytes isolated from hypertrophied guinea-pig hearts”. *J Mol Cell Cardiol*. 1989; **21**: 729-739.

Northrop JP, Ho SN, Chen L, thomas DJ, Timmermans LA, Nolan GP, Admon A, Crabtree GR. “NFAT components define a family of transcriptional factors targeted in T-cell activation”. *Nature*. 1994; **369**: 497-502.

Nuss HB, Houser SR. “T-type Ca^{2+} current expressed in hypertrophied adult feline left ventricular myocytes”. *Circ Res*. 1993; **73**: 777-782.

Nuss HB, Houser SR. “Voltage dependence of contraction and calcium current in severely hypertrophied feline ventricular myocytes”. *J Mol Cell Cardiol*. 1991; **23**: 717-726.

Nuss HB, Marban E, Balke CW, Goldman L, Aggarbal R, Shorfsky SR. “Whether slip-conductance occurs”. *Science*. 1999; **284**: 711.

Nuss HB, Marban E. “Electrophysiological properties of neonatal mouse cardiac myocytes in primary culture”. *J Physiol*. 1994; **479**: 265-279.

Nyborg NCB, MJ Mulvany. “Lack of effect of antihypertensive treatment with felodipine on cardiovascular structure of young spontaneously hypertensive rats”. *Cardiovasc Res*. 1985; **19**: 528-536.

O’Keffe DD, Hoffman JIE, Cheitlin R, O’Neil MJ, Allard JR, Shapkin E. “Coronary blood flow in experimental canine left ventricular hypertrophy”. *Circ Res*. 1978; **43**: 43-51.

Ohlstein EH, Arleth A, Bryant H Elliot JD, Sung CP. “The selective endothelin ET-A receptor antagonist BQ123 antagonizes endothelin-1 mediated mitogenesis”. *Eur J Pharmacol*. 1992; **225**: 347-350.

Olson EN, Molkentin JF. “Prevention of cardiac hypertrophy by calcineurin inhibition. Hope or hype?”. *Circ Res*. 1999; **84**: 623-632.

Ono K, Tsujimoto G, Sakamoto A, Eto K, Masaki T, Ozaki Y, Satake M. “Endothelin-A receptor mediates cardiac inhibition by regulating calcium and potassium currents”. *Nature*. 1994; **370**: 301-304.

Opie LH. “Calcium channel antagonists in the treatment of coronary artery disease: fundamental pharmacological properties relevant to clinical use”. *Prog Cardiovasc Dis*. 1996; **37**: 273-290.

Opie LH. “The heart physiology and metabolism”. New York, NY: Raven Press:1991.

Orito K, Satooh K, Taira N. "Cardiovascular profile of Ro 40-5967, a new nondihydropyridine calcium antagonist, delineated in isolated, blood perfused dog hearts". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1993; **22**: 293-299.

Osterrieder W, Holck M. "In vitro pharmacologic profile of Ro 40-5967, a novel Ca²⁺ channel blocker with potent vasodilator but weak inotropic action". *J. Cardiovasc Pharmacol.* 1989; **13**: 754-759.

Packer M, Kessler PD, Lee WH. "Calcium-channel blockade in the management of severe chronic, congestive heart failure: a bridge too far". *Circulation.* 1987; **75(suppl V)**: V56-V64.

Parent de Curzon O, Ghaleh B, Hittinger L, Giudicelli JF, Berdeaux A. "Beneficial effects of the T- and L-type calcium channel antagonist, Mibefradil, against exercise-induced myocardial stunning in dogs". *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; **35**: 240-248.

Park J, Takeuchi A, Sharma S. "Characterization of a new isoform of the NFAT gene family member NFATc". *J Biol Chem.* 1996; **271**: 20914-20921.

Pennefather P, Cohen IS. "Molecular mechanisms of cardiac potassium channel regulation". Cardiac electrophysiology. From cell to bedside. 1990; Ed by Zipes&Jalife. WB Saunders company.

Perennec J y Matt PY. "Myocardial morphology in cardiac hypertrophy and failure: electron microscopy and experimental data. En: Cardiac hypertrophy and failure. Ed. Swynghedauw B. Montrouge France: 1990.

Perez-Reyes E, Cribbs LL, Daud A, Lacerda AE, Barclays J, Williamson MP, Fox M, Rees M, Lee J. "Molecular characterisation of a neuronal low-voltage-activated T-type calcium channel". *Nature.* 1998; **391**: 896-899.

Perez-Reyes E, Schneider T. "Molecular biology of calcium channels". *Kidney Int.* 1995; **48**: 1111-1114.

Peterson MB, Lesch M. "Protein synthesis and amino acid transport in isolated rabbit right ventricular muscle". *Circ Res.* 1972; **31**: 317-327.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky I, Braunwald E. "Regression of left ventricular hypertrophy and prevention of left ventricular dysfunction by captopril in the spontaneously hypertensive rat". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1982; **79**: 3310-3314.

Pfeffer JM, Pfeffer MA, Mirsky IJ. "Cardiac hypertrophy and performance of Dahl hypertensive rats on graded salt diets". *Hypertension.* 1984; **6**: 475-481.

Pfeffer MA, Braunwald E, Moya LA. "Effect of captopril on mortality and morbidity in patients with left ventricular dysfunction after myocardial infarction results of the survival and ventricular enlargement trial". *N Eng J Med.* 1992; **327**: 669-677.

Pianno MR. "Cellular signaling mechanisms of cardiac hypertrophy". *J Cardiovasc Nurs.* 1994; **8**: 1-26.

Portegies MC, Schmitt R, Kraaij CJ. "Lack of negative inotropic effects of the new calcium antagonist Ro 40-5967 in patients with stable angina pectoris". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1991; **18**: 746-751.

Post JA, Ji S, Leonard KS. "Effects of charged amphiphiles on cardiac cell contractility are mediated via effects on Ca²⁺ current". *Am J Physiol.* 1991; **260**: H759-769.

Potts JL, Thomas J. "Traditional coronary risk factors in african americans". *Am J Med Sci.* 1999; **317**: 189-192.

Pye Mp, Cobbe SM. "Mechanisms of ventricular arrhythmias in cardiac failure and hypertrophy". *Cardiovasc Res.* 1992; **26**: 740-750.

Ram RVS, Gonzales D, Kulkarni P. "Regression of left ventricular hypertrophy in hypertension: effects of prazosin therapy". *Am J Med.* 1989; **87**: 66-68.

Rana RS, Hokin LE. "Role of phosphoinositides in transmembrane signaling." *Physiol Rev.* 1990; **70**: 115-164.

Rao A, Luo C, Hogaan PG. "Transcription factors of NFAT family: regulation and function". *Annu Rev Immunol.* 1997; **15**: 707-747.

Reuter M, Scholz H. "A study of the ion selectivity and the kinetics properties of the calcium current in mammalian cardiac muscle". *J Physiol (Lond).* 1977; **264**: 17-47.

Richard S, Leclercq F, Lemaire S, Piot C, Nargeot N. "Calcium currents in compensated hypertrophy and heart failure". *Cardiovasc Res.* 1998; **37**: 300-311.

Richard S, Neveu P, Carnac G. "Differential expression of voltage gated Ca²⁺ currents in cultivated aortic myocytes". *Biochim Biophys Acta.* 1992; **1160**: 95-104.

Rocha-singh KJ, Simpson PC, Karliner JS. "cAMP induces hypertrophy of cultured rat cardiac myocytes". *Circulation.* 1989; **80**: 93.

Rogers R, Propic R. "Profound symptomatic bradycardia associated with combined mibefradil and beta-blockers". *Med J Aust.* 1998; **169**: 425-427.

Romanin C, Seydl K, Glossmann H. "The dihydropyridine nifedipine inhibits T-type Ca currents in atrial myocytes". *Pflügers Arch.* 1992; **420**: 410-412.

Rossier MF, Burney MM, Capponi AM. "Distinct functions of T-and L-type calcium channels during activation of aldosterone production in adrenal glomerulosa cells. In Low-voltage-activated T-type Ca²⁺ Channels". Eds. Clozel J-P, Nargeot J, Tsien RW, Chester, UK: Adis International; 1997.

Rossner KL, Sachs HG. "Electrophysiological study of syrian hamster hereditary cardiomyopathy". *Cardiovasc Res.* 1978; **12**: 436-443.

Rossner KL. " Calcium current in congestive heart failure of hamster cardiomyopathy". *Am J Physiol.* 1991; **260**: H1179-1186.

Rousseau MF, Hayashida W, van Eyll C. "Hemodynamic and cardiac effects of the selective T-type and L-type calcium channel blocking agent mibefradil in patients with varying degrees of left ventricular systolic dysfunction". *J Am Coll Cardiol.* 1996; **28**: 972-979.

Roux S, Bühler M, Clozel JP. "Mechanism of the antiischemic effect of mibefradil, a selective T calcium channel blocker in dogs: comparison with amiodipine". *J Cardiovasc Pharmacol* 1996, **27**: 132-139.

Rubio LS, Garrido G, Alvarez JL. "Effects of tetrandine on Ca^{2+} and Na^{+} currents of single bullfrog cardiomyocytes". *J Mol Cell Cardiol.* 1993; **25**: 801-813.

Rutledge A, Triggle DJ. "The binding interactions of Ro 40-5967 at the L-type Ca^{2+} channel in cardiac tissue". *Eur J Pharmacol.* 1995; **280**: 155-158.

Ryder KO, Bryant SM, Hart G. "Membrane current changes in left ventricular myocytes isolated from guinea pigs after abdominal aortic coarctation". *Cardiovasc Res.* 1993; **27**: 1278-1287.

Ryder KO, Bryant SM, Winterton SJ. "Electrical and mechanical characteristics of isolated ventricular myocytes from guinea pigs with left ventricular hypertrophy and congestive heart failure". *J Physiol (Lond).* 1991; **38**: 181P.

Sack MN, Kelly DP. "The energy substrate switch during development of heart failure: gene regulatory mechanisms". *Int J Mol Med.* 1998; **1**: 17-24.

Sadoshima J, Izumo S. "The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stretch". *Annu Rev Physiol.* 1997; **59**: 551-571.

Sadoshima J, Xu Y, Slayter HS, Izumo S. "Autocrine release of angiotensin II mediates stretch-induced hypertrophy of cardiac myocytes *in vitro*". *Cell.* 1993; **75**: 977-984.

Sadoshima JI, Takahashi T, Jahn L, Izumo S. " Role of mechanosensitive ion channels, cytoskeleton and contractile activity in stretch-induced immediate early gene myocytes". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1992; **89**: 9905-9909.

Sahbb JB, Corbin JD. "Protein phosphorylation in the heart". En : Fozard HA, Haber E, Jennings RB, Katz AM, Morgan HE, eds. *The heart and cardiovascular system.* New York, NY:Raven Press;1991.

Santana LF, Gomez AM, Lederer WJ. "Calcium flux through promiscuous cardiac Na^{+} channels". *Science.* 1998; **279**: 1027-1033.

Sarsero D, Fujiyama T, Molenaar P, Angus JA. "Human vascular to cardiac tissue selectivity of L- and T- Type calcium channel antagonists". *Br J Pharmacol.* 1998; **125**: 109-119.

Savage DD, Garrison RJ, Kannel WB. "The spectrum of left ventricular hypertrophy in general population sample: the Farmmingham study". *Circulation.* 1987; **75(supl. 1)**: I126-I133.

Sax FL, Brush JE, Cannon RO, Leon MB, Maron BJ, Bonow RO. "Impaired left ventricular filling in symptomatic hypertensive patients". *J Am Coll Cardiol* 1988; **11**: 81.

Scamps F, Myoux E, Charlemagne D, Vasort G. "Calcium current in single cells isolated from normal and hypertrophied rat heart. Effects of β -adrenergic stimulation". *Circ Res.* 1990; **67**: 199-208.

Schelling P, Fisher H, Ganten D. "Angiotensin and cell growth: a link to cardiovascular hypertrophy?" *J Hypertension.* 1991; **9**: 3-15.

Schiemeder RE, Messerli FH, Garavaglia GF, Nuñez BD. "Dietary salt intake: a determinant for cardiac involment in essential hypertension". *Circulation.* 1988; **78**: 951-956.

Schiemeder RE, Messerli FH, Ruddel H. "Sodium intake modulates left ventricular hypertrophy in essential hypertension". *J Hypertension* 1988; **6**: S148-S150.

Schmassmann-Suhijar D, Bullingham R, Gasser R, Schmutz J, Haefeli WE. "Rhabdomyolysis due to interaction of simvastatin with mibefradil". *Lancet.* 1998; **351**: 1929-1930.

Schmitt R, Clozel JP, Iberg N, Bühler FR. "Mibefradil prevents neointima formation after vascular injury in rats: possible role of the blockade of the T-type voltage-operated calcium channel". *Artheroscler Thromb Vasc Biol.* 1995; **15**: 1161-1165.

Schmitt R, Clozel JP, Iberg N, Bühler FR. "Prevention of neointima formation by mibefradil after vascular injury in rats: comparison with ACE inhibition". *Cardiovasc Drugs Ther.* 1996; **10**: 101-105.

Schmitt R, Kleinbloesem CH, Belt GG. "Hemodynamic and humoral effects of the novel calcium antagonist Ro 40-5967 in patients with hypertension". *Clin Pharmacol Ther.* 1992; **52**: 314-323.

Schmitt R, Kleinbloesem CH, Osterrieder W. "Ro 40-5967 a calcium antagonist of a new generation?[abstract]": *Eur J Clin Pharmacol.* 1989; **36 (supl.1)**: A336.

Schouten VJA, Vliegen HW, van der Laarse A. Huysmans HA. "Altered calcium handling at normal contractility in hypertrophied rat hearts". *J Mol Cell Cardiol.* 1990; **22**: 987-998.

Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS. "Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme activity and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy". *J Clin Invest.* 1990; **86**: 1913-1920.

Schwartz K, De la Bastie D, Bouveret-Olivero P, Alonso S, Buckingham M. "α-skeletal muscle actin mRNA accumulate in hypertrophied adult rat hearts". *Circ Res.* 1986; **59**: 551-555.

Schwartz K, Lecarpentier Y, Martin JI, Lompre AM, Mercadier JJ, Swynghedauw B. "Myosin isoenzyme distribution correlates with speed of myocardial contraction". *J Mol Cell Cardiol.* 1981; **13**: 1071-1075.

Schwartz MA, Cragoe EJ, Lechence CP. "pH regulation in spread cells and round cells". *J Biol Chem.* 1990; **265**: 1327-1332.

Scott RH, Wootton JF, Dolphin AC. "Modulation of neuronal T-type calcium channel currents by photoactivation of intracellular guanosine 5'-O(3-THIO)Triphosphate". *Neuroscience.* 1990; **38**: 285-294.

Scroggs RS, Fox AP. "Calcium current variation between acutely isolated adult rat dorsal root ganglion neurons of different size". *J Physiol (Lond).* 1992; **445**: 639-658.

Sen L, O'Neill M, Marsh JD, Smith TW. "Inotropic and calcium kinetic effects of calcium channel agonist and antagonist in isolated cardiac myocytes from cardiomyopathic hamsters". *Circ Res.* 1990; **67**: 599-608.

Sen L, Smith TW. "T-type Ca²⁺ channels are abnormal in genetically determined cardiomyopathic hamster hearts". *Circ Res.* 1994; **75**: 149-155.

Sen S, Young DR. "Role of sodium in modulation of myocardial hypertrophy in renal hypertensive rats". *Hypertension.* 1986; **8**: 918-926.

Shah AM, Lewis MJ, Henderson AH. "Inotropic effects of endothelin in ferret ventricular myocardium". *Eur J Pharmacol.* 1989; **163**: 365-367.

Shimahara T, Bournaud R. "Barium currents in developing skeletal muscle cells of normal and mutant mice foetuses with muscular dysgenesis". *Cell calcium.* 1991; **12**: 727-733.

Schluter KD, Piper HM. "Regulation of growth in the adult cardiomyocytes". *FASEB J.* 1999; **13 (supl.)**: S17-S22.

Shorofsky SR, January CT. "L- and T-type Ca²⁺ channels in canine cardiac Purkinje cells". *Circ Res.* 1992; **70**: 456-454.

Shubeita HE, McDonough PM, Harris AN, Knowlton KU, Glembotski CC, Brown JH, Chien KR. "Endothelin induction of inositol phospholipid hydrolysis, sarcomere assembly, and cardiac gene expression in ventricular myocytes". *J Biol Chem.* 1990; **265**: 20555-20562.

Shymoyama H, Sabbah HN, Tanimura M, Borzak S, Goldstein S. "Short-term hemodynamic effects of mibefradil in dogs with chronic heart failure: comparison with diltiazem". *J Pharmacol Exp Ther.* 1998; **285**: 746-752.

Siegel D, Cheitlin MD, Black DM, Seely D, Hearst N, Hulley SB. "Risk of ventricular arrhythmias in hypertensive men with left ventricular hypertrophy". *Am J Cardiol.* 1990; **65**: 742-747.

Simpson P. "Stimulation of hypertrophy of cultured neonatal rat heart cells through an α_1 -adrenergic receptor and induction of beating through α_1 - and β_1 -adrenergic receptor interaction: evidence for independent regulation of growth and beating". *Circ Res.* 1985; **56**: 884-894.

Simpson PC, Kariya K, Karns LR, Long CS, Karliner JS. "Adrenergic hormones and control of cardiac myocyte growth". *Mol Cell Biochem.* 1991; **104**: 35-43..

Simpson PC. "Protoncogenes and cardiac hypertrophy". *Annu Rev Physiol.* 1988; **51**: 189-202.

Sipido KR, Carmeliet, y Van der Werf. "T-type Ca^{2+} current is a trigger for Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum in Guinea-Pig ventricular myocytes". *J physiol.* 1998; **508**: 439-451.

Siri FM, Nordin C, Factor SM, Sonnenblick E, Aronson R. "Compensatory hypertrophy and failure in gradual pressure-overloaded guinea pig heart". *Am J Physiol.* 1989; **257**: H1016-1024.

Soonpaa MH, Field LJ. "Survey of studies examining cardiomyocyte DNA synthesis". *Circ Res.* 1998; **83**: 15-24.

Staiger J, Dickhuth HM, Keul J. "Improvement of LV diastolic function by endurance exercise: a contribution to rehabilitation after infarct?". En: "Training sport for prevention and rehabilitation in the technicized environment". Eds. Franz IW, Mellerowicz H, Noak W. Berlin Springer Verlag. 1985: 709-714.

Strauer BE, Bayer F, Brecht AM, Motz W. "The influence of sympathetic nervous system on regression of cardiac hypertrophy". *J Hypertension.* 1985; **3**: S539-S544.

Strauer BE. "Left ventricular wall stress and hypertrophy". En: The heart and hypertension. Ed. Messerli FM. NY. Yorke Medical Books. 1987: 153-160.

Strauer BE. "Myocardial oxygen consumption in chronic heart disease: role of wall stress, hypertrophy and coronary reserve". *Am J Cardiol.* 1979; **44**: 730-740.

Sudgen PH, Clerk A. "Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy". *J Mol Med.* 1998; **76**: 725-746.

Sudgen PH. "Signaling in myocardial hypertrophy. Life after Calcineurin?". *Circ Res.* 1999; **84**: 633-646.

Suzuki T, Kumazaki T, Mitsui Y. "Endothelin-1 is produced and secreted by neonatal rat cardiac myocytes in vitro". *Biochem Biophys Res Commun.* 1993; **191**: 823-830.

Swandulla D, Carbone D, Schafer E. "Effect of menthol on two types of Ca²⁺ currents in cultured sensory neurones of vertebrates". *Pflügers Arch.* 1987; **409**: 52-59.

Taira N. "Differences in cardiovascular profile among calcium antagonists". *Am J Cardiol.* 1987; **59**: 24B-29B.

Takahashi K, Akaike N. "Calcium antagonist effects on low-threshold (T-type) calcium current in rat isolated hippocampal CA1 pyramidal neurons". *J Pharmacol Exp Ther.* 1991; **256**: 169-175.

Tamargo J, Valenzuela C. "Fármacos antiaritmicos" *Farmacologia Humana.* Florez J Eds. Masson SA. Barcelona, 1997.

Tanaka H, Habuchi Y, Nishio M, Yamamoto T, Suto F, Yoshimura M. "Endothelin-1 inhibits pacemaker currents in rabbit SA node cells". *J Cardiovasc Pharmacol.* 1998; **31(supl.1)**: S440-S442.

Ten Eick RE, Bassett AL. "Cardiac hypertrophy and altered cellular electrical activity of myocardium. Possible electrophysiologic basis for myocardial contractility changes. Sperelakis N ed. *Physiology and pathophysiology of the heart.* The Hague: Martinus Nijhoff Publishing, 1984:521-542.

Ten Eick RE, Whalley Dw, Rasmussen HM. "Connections: heart disease cellular electrophysiology and ion channels". *FASEB J.* 1992; **6**: 2568-2580.

Ten Eik R, Gelband H, Kahn J y Bassett A. "Changes in outward transmembrane currents of papillary muscle with right ventricular hypertrophy". *Circulation.* 1977; **55 suppl III**: 47.

Terzic A, Puceaut M, Vassort G, Vogel SM. "Cardiac α_1 -adrenoceptors: an overview". *Pharmacol Rev.* 1993; **45**: 147-175.

Thollon C, Kreher P, Charlon V y Rossi A. "Hypertrophy induced alteration in action potential and effects of the inhibition of angiotensin converting enzyme by perindompril in infarcted rat hearts". *Cardiovasc Res.* 1989; **23**: 224-230.

Thomas G, Sims SM, Karmazyn M. "Differential effects of endothelin-1 on basal and isoprenaline-enhanced Ca²⁺ current in guinea-pig ventricular myocytes". *J Physiol.* 1997; **503**: 55-65.

Thornburn A, Thornburn J, Chen SC, Powers S, Shubeita HE, Feramisco JR, Chien KR. "Hras-dependent pathways can activate morphological and genetic markers of cardiac muscle cell hypertrophy". *J Biol Chem.* 1993; **268**: 2244-2249.

Timmermans PB. "Angiotensin II receptor antagonists: an emerging new class of cardiovascular therapeutics". *Hypertens Res.* 1999; **22**: 147-153.

Timsit J, Dubuy J, Samuel JL, Rappaport L. "Myocardial hypertrophy and hyperthyroidism". En: Research in cardiac hypertrophy and failure. Montrouge France. Eds. by Swynghedauw. 1990.

Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA. "Quantitative changes in the capillary bed during developing, peak and stabilized cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rat" *Circ Res.* 1982; **51**: 295-304.

Tombe PP. "Altered contractile function in heart failure". *Cardiovasc Res.* 1998; **37**: 367-380.

Tratner I, Ofir R, Verma IM. "Alteration of cAMP-dependent protein kinase phosphorylation site in the c-fos protein augments its transforming potential". *Mol Cell Biol.* 1992; **12**: 998-1006.

Trautwein W, McDonald TF, Tripathi O. "Calcium conductance and tension in mammalian ventricular muscle". *Pflügers Arch.* 1975; **354**: 55-74.

Trautwein W. "Membrane currents in cardiac muscle fibres" *Physiol Rev.* 1973; **53**: 793-835.

Triggle DJ. "Cardiovascular T-type calcium channels: physiological and pharmacological significance". *J Hypertension.* 1997; **15(supl. 5)**: S9-15.

Tseng G, Boyden P. "Different effects of intracellular Ca²⁺ and protein kinase C on cardiac T and L Ca currents". *Am J Physiol.* 1991; **261**: H364-H379.

Tseng GN, Boyden PA. "Multiple types of Ca²⁺ currents in single canine Purkinje cells". *Circ Res.* 1989; **65**: 1735-1750.

Tsunoo A, Yoshi M, Narahashi T. "Differential block of two calcium channels in neuroblastoma cells". *J Biophys.* 1985; **47**: 433^a

Twombly DA, Yoshi M, Narahashi T. "Mechanism of calcium channel block by phenytoin". *J Pharmacol Exp Ther.* 1988; **246**: 189-195.

Tygat J, Nilius B, Carmeliet E. "Modulation of the T-type cardiac channel by changes in proton concentration". *J Gen Physiol.* 1990b; **96**: 973-990.

Tygat J, Nilius B, Vereecke J. "The T-type Ca²⁺ channel in guinea pig ventricular myocytes is insensitive to isoproterenol". *Pflügers Arch.* 1988; **411**: 704-706.

Tygat J, Vereecke J, Carmeliet E. "A combined study of sodium current and T-type calcium current in isolated cardiac cells". *Pflügers Arch.* 1990c; **471**: 142-148.

Tygat J, Vereecke J, Carmeliet E. "Gadolinium, a selective cardiac L- and T- type Ca Blocker". *Arch Intern Physiol Biochem.* 1991; **99**: P3.

Tygat J, Vereecke J, Carmeliet E. "Mechanism of cardiac T-type Ca²⁺ channel blockade by amiloride". *J Pharmacol Exp Ther.* 1990a; **254**: 546-551.

Vacher E, Richer C, Formes P, Clozel JP, Giudicelli JF. "Mibefradil, a selective calcium T-channel blocker in stroke-prone spontaneously hypertensive rats". *J Cardiovas pharmacol.* 1996; **27**: 686-694.

Van Zwieten PA, Peters SL. "Central 11-imidazoline receptors as targets of centrally acting antihypertensive drugs. Clinical pharmacology of monoxidine and rimenidine". *Ann NY Acad Sci.* 1999; **881**: 420-429.

Vanhoutte PM. "The expert committees of the World Health Organization on classification of calcium antagonists: the viewpoint of the rapporteur". *Am J Cardiol.* 1987; **59**: 3A-8A.

Vassort G, Alvarez J. "Cardiac T-Type calcium current: Pharmacology and roles in cardiac tissues". *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1994; **5**: 376-393.

Veniant M, Clozel JP, Hess P, Wolfgang R. "Hemodynamic profile of Ro 40-5987 in conscious rats: comparison with diltiazem, verapamil, and amiodipine". *J. Cardiovasc Pharmacol.* 1991; **18(suppl 10)**: S55-S58.

Veniant M, Gray GA, Heudes D, Menard J, Clozel JP. "Structural changes and cyclic GMP content of the sorta after calcium antagonism or angiotensin converting enzyme inhibition in renovascular hypertensive rats". *J Hypertens.* 1995; **13**: 731-737.

Vogt M, Motz W, Strauer BE. "Coronary haemodynamics in hypertensive heart disease". *Eur Heart J.* 1992; **13**: 44-49.

Vogt M, Motz WH, Schwartzkopk B, Strauer BE. "Pathophysiology and clinical aspects of hypertensive hypertrophy". *Eur Heart J.* 1993; **14**: D2-D7.

Vogt M, Strauer BE. "Response of hypertensive left ventricular hypertrophy and coronary microvascular disease to calcium antagonists". *Am J Cardiol.* 1995; **76**: 24D-30D.

Von Harsdorf R, Lang RE, Fullerton M, Woodcock EA. "Myocardial stretch stimulates phosphatidylinositol turnover". *Circ Res.* 1989; **65**: 494-501.

Waeber B. "Potential cardioprotective effect of mibefradil in the long-term treatment of hypertension". *Cardiology.* 1998; **89(supl.1)**: 16-22.

Walker KE, Lakatta EG, Houser SR. "Age-associated changes in membrane currents in rat ventricular myocytes". *Cardiovasc Res.* 1993; **27**: 1968-1977.

Walker MW, Ewald DA, Perney TM. "Neuropeptide Y, modulates neurotransmitter release and Ca²⁺ currents in rat sensory neurones". *J Neurosci.* 1988; **8**: 2438-2446.

Walsh KB. "Activation of a heart chloride current during stimulation of protein kinase C". *Mol Pharmacol.* 1991; **40**: 342-346.

Walsh RA. “Calcineurin inhibition as therapy for cardiac hypertrophy and heart failure”. *Circ Res.* 1999; **84**: 741-743.

Wang Z, Estacion M, Mordan LJ. “Ca²⁺ influx via T-type channels modulates PDGF-induced replication of mouse fibroblasts”. *Am J Physiol.* 1993, **265**: C1239-C1246.

Washizuka T, Horie M, Watanuki M, Sasayama S. “Endothelin-1 inhibits the slow component of cardiac delayed rectifier K⁺ currents via a pertussis toxin sensitive mechanism”. *Circ Res.* 1997; **81**: 211-218.

Waters DD, Theroux P, Szlachcic K, Dauwe F. “Provocative testing with ergonovine to assess the efficacy of treatment with nifedipine, diltiazem and verapamil in variant angina”. *Am J Cardiol.* 1961; **48**: 123-130.

Watson PA, Haneda T, Morgan HE. “Effect of higher aortic pressure on ribosome formation and cAMP content in rat heart”. *Am J Physiol.* 1989; **256**: C1257-C1261.

Weber KT, Brilla CG. “Pathological hypertrophy and cardiac interstitium”. *Circulation.* 1991; **83**: 1849-1865.

Weber KT. “Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network”. *J Am Coll Cardiol.* 1989; **13**: 1637-1652.

Wetzel GT, Klizner TS. “Developmental cardiac electrophysiology . Recent advances in cellular physiology”. *Cardiovasc Res.* 1996; **31**: E52-60.

White WB, Schulmann P, Karimedini MK, Smith VE. “Regression of left ventricular mass accompanied by improvement in rapid left ventricular filling following antihypertensive therapy with metoprolol”. *Am Heart J.* 1989; **117**: 145-150.

Wickenden AD, Kaprielian R, Zamaneh K, Tsoporis JN, Tsushima R, Fishman GI, Backx PH. “The role of action potential prolongation and altered intracellular calcium handling in the pathogenesis of heart failure”. *Cardiovasc Res.* 1998; **37**: 312-323.

Wiltshire HR, Harris SR, Prior KJ, Kozlowaki UM, Worth E. “Metabolism of calcium antagonist Ro 40-5967: a case history of the use of diode-array u.v. spectroscopy and thermospray-mass spectrometry in the elucidation of a complex metabolic pathway”. *Xenobiotica.* 1992; **22**: 837-857.

Winwgrad S, Shane AM. “Calcium Flux and contractility in guinea pig atria”. *J Gen Physiol.* 1962; **45**: 371-394.

Wollert KC, Drexler H. “The renin-angiotensin system and experimental heart failure”. *Cardiovasc Res.* 1999; **43**: 838-849.

Wombolt DG, Jackson A, Pun R, Smith S, McCune TR, Williams PB. “Case report: Rhabdomyolysis induced by mibefradil in patient treated with cyclosporine and simvastatin”. *J Clin Pharmacol.* 1999; **39**: 310-312.

Wu J, Lipsius SL. "Effects of extracellular Mg on T- and L-type Ca²⁺ currents in single atrial myocytes". *Am J Physiol.* 1990; **259**: H1842-1850.

Wu L, Karpinski E, Wang R. "Modifications by solvents of the action of nifedipine on calcium channels currents of neuroblastoma cells". *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol.* 1992; **345**: 478-484.

Xenophontos XP, Watson PA, Chua BHL, Haneda T, Morgan HE. "Increased cAMP content accelerated protein synthesis in rat heart". *Circ Res.* 1989; **65**: 647-656.

Xu X, Best PM. "Decreased transient outward K⁺ current in ventricular myocytes from acromegalic rats". *Am J Physiol.* 1991; **260**: H935-942.

Xu X, Best PM. "Increased in T-type calcium current in atrial myocytes from adult rats with growth hormone secreting tumours". *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990; **87**: 4655-4659.

Xu X, Best PM. "Postnatal changes in T-type calcium current density in rat atrial myocytes". *J Physiol.* 1992; **454**: 657-672.

Xu X, Lee EW, Lee KS. "A selective dose- and state-dependent inhibitor of the T-type calcium channels in guinea pig atrial cells". *Biophys J.* 1993; **64**: 321^a.

Yaari Y, Hamon B, Lux HD. "Development of two types of calcium channels in cultured mammalian hippocampal neurons". *Scienc.* 1987; **235**: 680-682.

Yamahada H, Faris B, Allen AM. "Localization of angiotensin converting enzyme in rat heart". *Circ Res.* 1991; **68**: 141-149.

Yamazaki T, Komuro I, Kudoh S, Zou Y, Shiojima I, Hiro Y, Mizuno T, Maemura K, Kurihara H, Aikawa R, Takano H, Yazaki Y. "Endothelin 1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy". *J Biol Chem.* 1996; **271**: 3221-3228.

Yamazaki T, Yazaki Y. "Role of tissue angiotensin II in myocardial remodelling induced by mechanical stress". *J Hum Hypertens.* 1999; **13**: 43-50.

Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomore Y, Kobayasaki M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. "A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells". *Nature.* 1988; **332**: 411-415.

Yatani A, Kunze DL, Brown AM. "Rapid β -adrenergic modulation of cardiac calcium channel currents by a fast G-protein pathway". *Am J Physiol.* 1988; **254**: H140-H147.

Younes A, Feuvray D. "Cardiac metabolism and energy exchange". En: *Research in cardiac hypertrophy and failure.* Ed. Swynghedauw. Montrouge France. 1990.

Yurenev AP, de Quattro V, Devereux RB. "Hypertensive heart diseases: relationship of silent ischemia to coronary artery disease and left ventricular hypertrophy". *Am Heart J.* 1990; **120**: 928-933.

Zhou Z y Lipsius SL. "T- type calcium current in latent pacemaker cells isolated from cat right atrium". *J Mol Cell Cardiol.* 1994; **26**: 1211-1219.

Zhu Y, Yang H, Endoh M. "Negative chronotropic and inotropic effects of endothelin isopeptides in mammalian cardiac muscle". *Am J Physiol.* 1997; **273**: H119-H127.

Zhu YC, Zhu YZ, Spitznagel H, Gohlke P, Unger T. "Substrate metabolism, hormone interaction, and angiotensin-converting enzyme inhibitors in left ventricular hypertrophy". *Diabetes.* 1996; **45(supl.I)**: S59-S65.

Zierhut W, Zimmer HG. "Significance of myocardial α - and β -adrenoceptors in catecholamine-induced cardiac hypertrophy". *Circ Res.* 1989; **65**: 14717-1425.

Zierhut W, Zimmer HG. "Triiodothyronine-induces changes in function, metabolism, and weight of the rat heart: effects of α - and β - adrenergic blockade". *Basic Res Cardiol.* 1989; **84**: 359-370.

Zou Y, Komuro I, Yamzaki T, Aikawa R, Kudoh S, Shiojima I, Hiroi Y, Mizumo T, Yazaki Y. "Protein kinase C, but not tyrosin kinases or ras, plays a critical role in angiotensin II induced activation of raf-1 kinase and extracellular signal-regulated protien kinases in cardiac myocytes". *J Biol Chem.* 1996; **271**: 33592-33597.

Zygmunt AC, Gibbons WR. "Calcium-activated chloride current in rabbit ventricular myocytes". *Circ Res.* 1991; **68**: 424-437.