

DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

EFFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS MIOCÁRDICOS
INTRÍNSECOS PRODUCIDOS POR LA INHIBICIÓN DEL
SISTEMA DE INTERCAMBIO SODIO-PROTÓN, EN
CONDICIONES DE NORMOXÍA, Y TRAS LA ISQUEMIA
MIOCÁRDICA REGIONAL. ESTUDIO EXPERIMENTAL

LUIS SUCH MIQUEL

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 15 de Juliol de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Vicente López Merino
- D. Antonio M. Alberola Aguilar
- D. Antonio Iradi Casal
- D. Juan Cosín Aguilar
- D. Juan Antonio Ruipérez Abizanda

Va ser dirigida per:
D. Luis Such Belenguer

©Copyright: Servei de Publicacions
Luis Such Miquel

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6369-8

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

Universitat de València



"EFECTOS ELECTROFISIOLÓGICOS MIOCÁRDICOS INTRÍNSECOS PRODUCIDOS POR LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA DE INTERCAMBIO SODIO-PROTÓN, EN CONDICIONES DE NORMOXIA, Y TRAS LA ISQUEMIA MIOCÁRDICA REGIONAL. ESTUDIO EXPERIMENTAL".

Este trabajo de investigación ha sido subvencionado por las ayudas concedidas por el Ministerio de Ciencia y Tecnología, y la Generalitat Valenciana, para la realización de los proyectos PM98-0204, y GV99-136-1-04, respectivamente.

ÍNDICE

	Página
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Objetivos	2
1.2. Justificación de los objetivos	3
1.2.1. Los inhibidores del sistema de intercambio Na ⁺ /H ⁺ (NHE) en el campo de la protección miocárdica	3
1.2.1.1. Generalidades del NHE	3
1.2.1.2. Papel del NHE en la isquemia y reperfusión miocárdica	7
1.2.1.3. Inhibición del NHE como mecanismo de protección del miocardio isquémico	12
1.2.2. Efectos electrofisiológicos de la inhibición del NHE	15
1.2.2.1. Sobre automatismo, conducción y refractariedad	15
1.2.2.2. Sobre la fibrilación ventricular y otras arritmias	21
1.2.2.2.1. En la isquemia por disminución del flujo regional y/o global y en la reperfusión	22
1.2.2.2.2. En la fibrilación ventricular seguida de resucitación como modelo de isquemia y reperfusión	27
1.2.2.2.3. Sobre las características de la fibrilación ventricular en condiciones de isquemia y de normal oxigenación	34
1.2.2.2.4. Análisis de la fibrilación ventricular. Estudios en el dominio de la frecuencia	37
1.2.3. Resumen de la justificación de los objetivos: Hipótesis de trabajo	42
1.3. Plan de trabajo	44
2. MATERIAL Y MÉTODOS	47
2.1. Animales de experimentación	48
2.2. Reactivos	48
2.3. Aparatos	49
2.4. Definiciones	52
2.5. Metodología	57
2.6. Análisis estadístico	70
2.7. Legislación	70
3. RESULTADOS	72

3.1. Efectos de la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 0.4 μ M, sobre la inducibilidad de la fibrilación ventricular (FV) y sobre la refractariedad ventricular tras la oclusión arterial coronaria	73
3.2. Efectos electrofisiológicos en el corazón aislado y normalmente perfundido (normóxico) tras la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 0.4 μ M	75
3.2.1. Cronotropismo sinusal y conducción sinoauricular	75
3.2.2. Conducción auriculoventricular	78
3.2.3. Refractariedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular	80
3.2.4. Patrón fibrilatorio ventricular	83
3.3. Efectos del EIPA (0.4 μ M) sobre el flujo coronario en corazones aislados y normalmente perfundidos, divididos en grupo control y grupo tratado	85
3.4. Efectos electrofisiológicos en el corazón aislado y normalmente perfundido (normoxia) tras la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 1 μ M	86
3.4.1. Cronotropismo sinusal y conducción sinoauricular	86
3.4.2. Conducción auriculoventricular	88
3.4.3. Refractariedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular	90
3.4.4. Patrón fibrilatorio ventricular	93
3.5. Efectos del EIPA (1 μ M) sobre el flujo coronario en corazones aislados y normalmente perfundidos	95
4. DISCUSIÓN	96
4.1. Algunas consideraciones generales	97
4.2. Sobre la metodología y el inhibidor del NHE usado	99
4.3. Respecto a los resultados obtenidos	104
4.3.1. Inducibilidad de la fibrilación ventricular y refractariedad ventricular tras la oclusión coronaria	104
4.3.2. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas: Efectos sobre la refractariedad	109
4.3.3. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas sobre el patrón fibrilatorio ventricular	113
4.3.4. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en	

condiciones normóxicas sobre el automatismo sinusal y la conducción auriculoventricular	116
4.3.5. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas sobre el flujo coronario	124
5. CONCLUSIONES	126
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129

1. INTRODUCCIÓN.

1.1. Objetivos.

Investigar:

1) los efectos protectores de la inhibición del sistema de intercambio Na^+/H^+ (NHE) mediante la administración del inhibidor 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (EIPA) a concentración $0.4 \mu\text{M}$, sobre la protección del miocardio isquémico a través del estudio de la inducibilidad de la fibrilación ventricular y la refractariedad miocárdica ventricular tras la oclusión arterial coronaria,

2) los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos producidos por la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA a las concentraciones $0.4 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ y en condiciones de normal oxigenación, sobre el automatismo sinusal, la conducción sinoauricular y auriculoventricular (AV), y sobre la refractariedad auricular, del sistema de conducción AV y del miocardio ventricular, y

3) los efectos electrofisiológicos miocárdicos intrínsecos producidos por la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA a las concentraciones $0.4 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ y en condiciones de normal perfusión, sobre la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular inducida, en condiciones de normoxia, como una característica electrofisiológica adicional del miocardio ventricular.

1.2. Justificación de los objetivos.

1.2.1. Los inhibidores del sistema de intercambio Na^+/H^+ (NHE) en el campo de la protección miocárdica.

1.2.1.1. Generalidades del NHE

La regulación del pH intracelular en los cardiomiocitos depende esencialmente de cuatro transportadores de membrana: 1) el sistema de intercambio Na^+/H^+ , 2) el sistema de transporte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, 3) el sistema de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ y 4) el sistema de intercambio Cl^-/OH^- . Los dos primeros son activados por una disminución del pH intracelular y regulan la salida de H^+ en la célula. Los dos últimos, son estimulados por una alcalosis intracelular y son responsables de la entrada de H^+ al líquido intracelular (Karmazyn et al. 1.999).

Un aumento del pH intracelular, activa al sistema de intercambio $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$, que sustituye HCO_3^- intracelular por Cl^- extracelular (Orlowski, 1.999). En cambio, una disminución del pH intracelular, activa al contratransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ y al NHE, siendo este último, el mecanismo

predominante de restauración del pH intracelular a su valor fisiológico (Frelin et al., 1.985, Lagadic-Gossmann et al., 1.992).

El NHE, es una proteína que se localiza en el sarcolema (ver figura 1) de numerosos tipos celulares de mamíferos (Fliegel et al. 1.998).

La principal función de dicho sistema es el intercambio de un protón por un ion Na^+ , gracias a un gradiente de Na^+ , mantenido por la Na^+/K^+ ATPasa. Este intercambiador, además participa en otras muchas funciones fisiológicas en varios tipos celulares, incluyendo la regulación del pH intracelular (aunque como veremos más adelante, no lo hace propiamente en circunstancias fisiológicas, sino en aquellas circunstancias fisiopatológicas en las que se produce una importante disminución del pH), y el volumen celular, por su función de transporte de Na^+ y H^+ , así como el control del crecimiento y proliferación celular, ya que actúa como mediador de la función de algunos factores de crecimiento. Con respecto al sistema cardiovascular, un aumento de la actividad de este intercambiador, se ha relacionado con la hipertensión

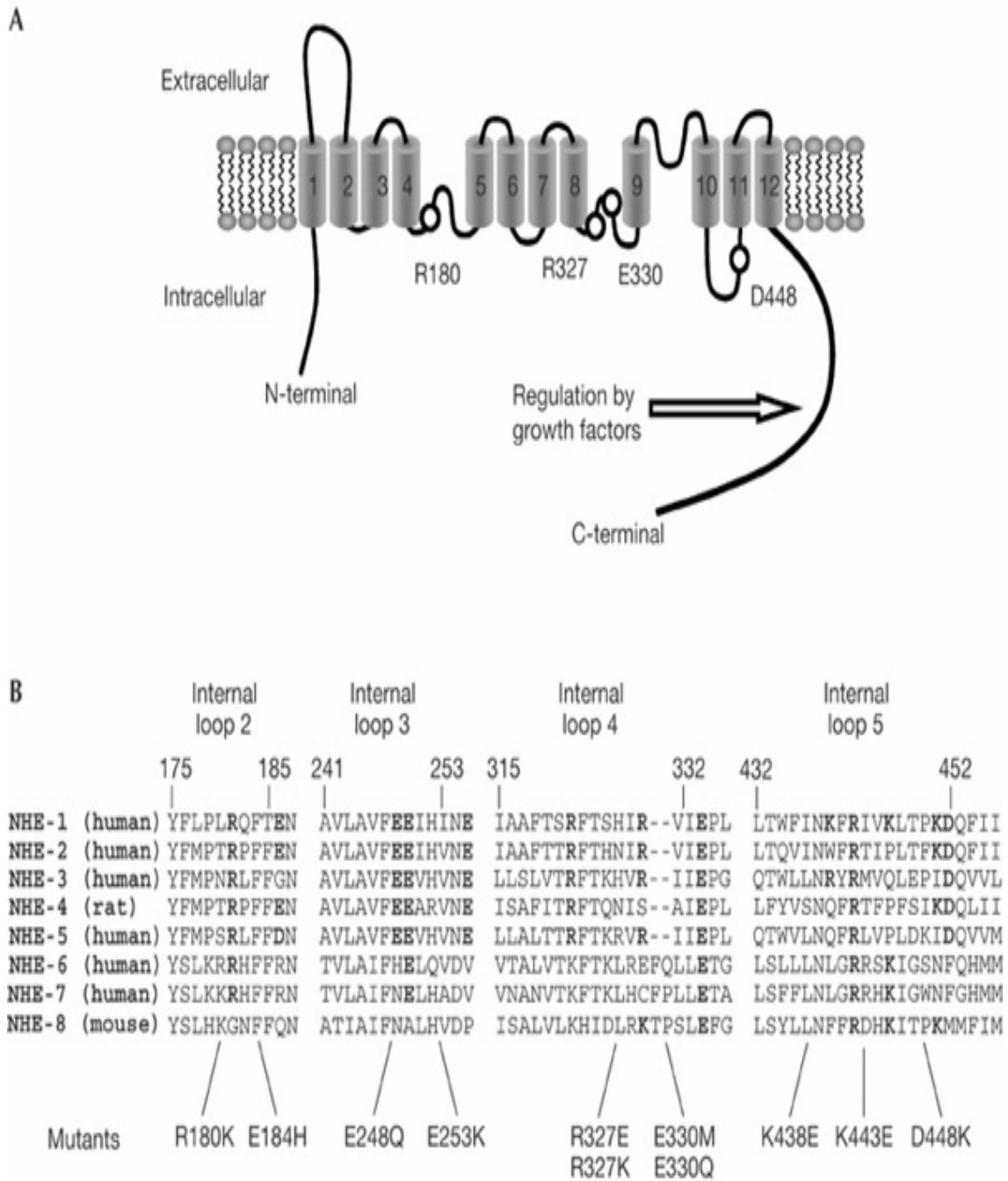


Figura 1.- A: Sistema de intercambio sodio-protón. B: Composición de las distintas isoformas. Tomado de Fliegel L. et al., 1.998.

(Roskopf et al., 1.993), la activación plaquetaria (Siffert et al., 1.995) y la proliferación de células del músculo liso arterial (Lucchesi et al., 1.995), en respuesta a una determinada lesión (Avkiran et al., 1.999).

El NHE, está regulado por diferentes mecanismos, dada la vital importancia del mantenimiento de la homeostasis iónica, como son la activación de diferentes hormonas y factores de crecimiento, aunque el principal mecanismo que activa a este intercambiador, es una disminución del pH intracelular (Fliegel et al., 1.998). Adicionalmente, en situaciones de isquemia miocárdica y posterior reperfusión, en las cuales se produce una acidosis intracelular, el contratransportador Na^+/H^+ es activado por el efecto, mediado por receptores, de algunas catecolaminas, la trombina y la endotelina, entre otros factores (Avkiran et al., 1.999).

El NHE, es el sistema que regula principalmente el pH intracelular en condiciones de acidosis, como ocurre en una situación de isquemia (Karmazyn et al., 1.999). Las condiciones necesarias para la activación del NHE, se presentan en el miocardio isquémico, incluyendo acidosis intracelular, inhibición de el sistema de intercambio Na^+/K^+ ATPasa y un incremento en la producción de metabolitos intracelulares, de tipo hormonal (Karmazyn et al., 1.999). Pero, adicionalmente, este sistema de transporte

también contribuye a un daño cardiaco asociado a la isquemia y reperfusión miocárdicas, ya que existen numerosos estudios que demuestran que la inhibición farmacológica de estos sistemas de transporte produce una protección cardiaca, independiente del modelo experimental, de la especie animal y del tipo de inhibidor del sistema (Frohlich y Karmazyn, 1.997, y Karmazyn, 1.996, citados por Humphreys et al., 1.999).

En mamíferos, se han descrito, hasta el momento, ocho isoformas diferentes del NHE, del NHE-1 hasta el NHE-8, exhibiendo cada una de ellas diferencias, en su expresión tisular, localización en membrana, y propiedades fisiológicas. Las isoformas NHE-1 y NHE-6 se localizan en la mayoría de células de mamífero, siendo la NHE-1 la que predomina en los cardiomiocitos, y la isoforma NHE-6, en tejidos con alto contenido mitocondrial. Las isoformas, de NHE-2 a la NHE-5, son más limitadas en su expresión. La isoforma NHE-2 se restringe al estómago, útero, hígado, intestino y glándula adrenal. La NHE-3, se encuentra exclusivamente, en el hígado, intestino y estómago. Por último, las isoformas NHE-4 y NHE-5 no son bien conocidas (Yun et al., 1.995). En humanos, la isoforma NHE-1 es la más importante (Buerke et al., 1.999).

1.2.1.2. Papel del NHE en la isquemia y reperfusión miocárdica.

El NHE está inactivo a valores fisiológicos de pH intracelular, pero se activa en respuesta a una acidosis intracelular, que se desarrolla rápidamente durante la isquemia miocárdica. El miocardio, en situación de isquemia obtiene la energía mediante glucólisis anaerobia, produciendo acumulación de ácido láctico dentro de la célula, y finalmente, desarrollando una acidosis intracelular, la cual activa al NHE, para restaurar el pH, expulsando de la célula el exceso de H^+ e intercambiándolos por iones Na^+ , con lo que se produce un aumento de la concentración de Na^+ intracelular. Se ha sugerido, que en estas condiciones de isquemia, los protones liberados del interior de la célula se acumulan en el líquido extracelular, con lo que desaparece el gradiente de protones a ambos lados de la membrana celular y se inhibe por tanto el NHE, que funciona por dicho gradiente, y que junto con otros mecanismos como cambios en niveles de algunos metabolitos, podrían también inhibir al citado sistema.

Durante la reperfusión, los protones son arrastrados del líquido extracelular, provocándose, de nuevo, la aparición del gradiente y por tanto, la activación del NHE, para una acelerada restauración del pH. Los protones se intercambian por Na^+ , causando un acúmulo intracelular de este ion. Es precisamente esto último lo que activa al intercambiador Na^+/Ca^{2+} (figura 2), que operando en forma reversa introduce Ca^{2+} en la célula, a expensas de la expulsión de Na^+ al líquido extracelular (Lazdunski et al., 1.985). Este aumento

en la concentración de Ca^{2+} en la isquemia y en mayor medida durante la reperfusión se relaciona con el daño celular (Kihara et al., 1.989, Lee et al., 1.992, Steenbergen et al., 1.990, citados por Park et al., 1.999).

Aunque la reperfusión es el tratamiento terapéutico idóneo para prevenir la muerte celular miocárdica debida a una isquemia prolongada, la reperfusión, por sí misma, contribuye a un daño adicional. Existen numerosos estudios experimentales, por los que se hace obvia la implicación directa del NHE, sobre todo la isoforma NHE-1, en el daño tisular miocárdico durante la reperfusión; como es la necrosis celular debida a la sobrecarga de Ca^{2+} intracelular que sigue a la reperfusión post-isquémica (para revisión ver referencia de Buerke et al., 1.999).

Los mecanismos que parecen ser responsables del daño por reperfusión son, además de la sobrecarga de Ca^{2+} , la generación de radicales libres, la pérdida de enzimas antioxidantes y la inflamación con infiltración de neutrófilos. El proceso inflamatorio producido por la activación de los neutrófilos, está asociado a su vez con necrosis celular y producción de grandes cantidades de radicales libres.

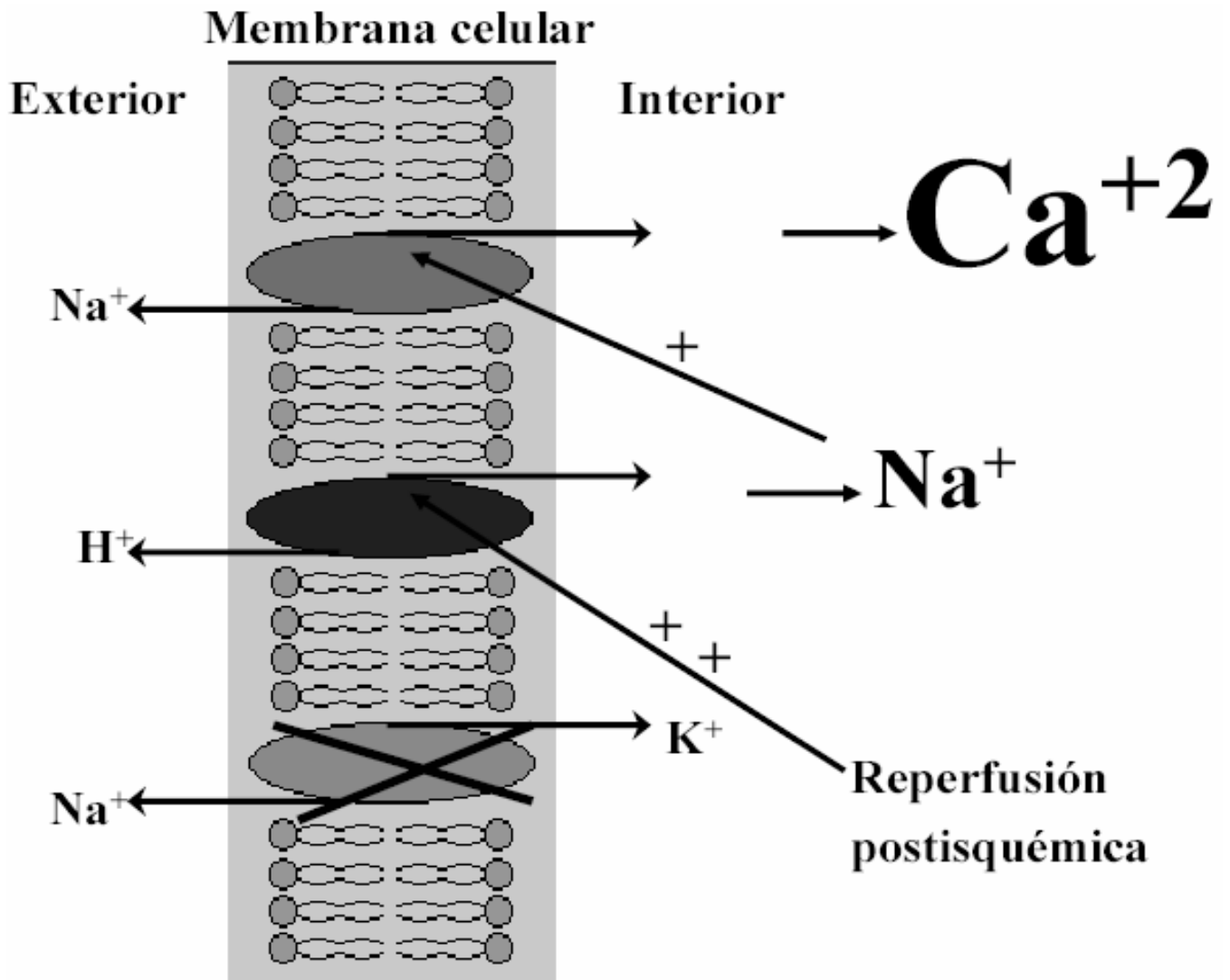


Figura 2: Proceso de intercambio sodio-protón y repercusión sobre el intercambiador sodio-calcio en el miocardio isquémico y reperfundido.

La activación de estos neutrófilos, parece relacionada con el fenómeno del "no reflujo" (para revisión ver referencia de Thérout, 1.999). En clínica humana, se han observado signos de daño por reperfusión como son: Arritmias de reperfusión, miocardio aturdido y el fenómeno de "no reflujo" (Buerke et al., 1.999). La reperfusión del miocardio sujeto a una isquemia transitoria, induce rápidamente, arritmias ventriculares severas (para revisión ver referencia de Manning y Hearse, 1.984). Varios factores están implicados en esta arritmogénesis, como son, generación de radicales libres de oxígeno, el "lavado" rápido de los iones K^+ del espacio extracelular y sobre todo, la acumulación de Ca^{2+} intracelular (Avkiran et al., 1.992). Estas arritmias severas, incluyendo la fibrilación ventricular, se han producido también en pacientes sometidos a terapia trombolítica o *bypass* de arteria coronaria (para revisión ver Karmazyn, 1.991).

La sobrecarga de calcio que se produce tras la reperfusión post-isquémica no solamente afecta al citosol sino también a las mitocondrias. De hecho algunos trabajos de investigación recientes apuntan a que la sobrecarga mitocondrial de calcio ocupa un lugar clave en la recuperación del cardiomiocito sometido a isquemia y reperfusión (Miyamae et al., 1.996, Wang et al., 2.001, citados por Gursahani y Schaefer, 2.004). Gursahani et al. (2.004) en un trabajo de investigación sobre el papel de la acidificación mitocondrial en

la captación de calcio por este orgánulo, encontró hallazgos consistentes con un importante papel de la disminución del pH mitocondrial y la sobrecarga de calcio en la lesión por isquemia y reperfusión.

1.2.1.3. Inhibición del NHE como mecanismo de protección del miocardio isquémico

El daño por reperfusión está directamente relacionado con la activación del NHE. Las nuevas y actuales investigaciones se centran en la inhibición de este sistema para evitar la acumulación de Ca^{2+} intracelular, y sus posteriores efectos deletéreos en la célula miocárdica, protegiendo así al miocardio durante la reperfusión post-isquémica.

Una gran variedad de compuestos con suficiente potencia para inhibir el NHE-1, han sido obtenidos e investigados. Algunos de estos inhibidores poco específicos, como el amiloride y algunos de sus análogos, más específicos como el dimetilamiloride (DMA), y hexametilamiloride (HMA) han exhibido un gran efecto protector sobre el miocardio isquémico y reperfundido (Meng et al., 1.993).

El compuesto 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride, se ha descrito como el más específico y selectivo de la isoforma NHE-1, de todos los derivados del amiloride. El EIPA es 100 veces más potente que el amiloride, en la inhibición del sistema de intercambio NHE-1 miocárdico (Vigne et al., 1.983). En un estudio realizado en ventrículo derecho aislado de rata y perfundido por la arteria coronaria derecha, sometido a 60 minutos de isquemia y 45 minutos de reperfusión, se ha demostrado que el EIPA es más potente que sus análogos en la protección miocárdica durante la reperfusión, si analizamos las concentraciones a las que cada uno de estos compuestos ejerció efecto protector consistente (100 μ M para el amiloride, 10 μ M el DMA, 2,5 μ M el HMA y 1 μ M el EIPA), obteniéndose el mismo efecto protector en la recuperación contráctil miocárdica, con lo que se demostró la mayor potencia del EIPA como inhibidor del NHE-1 (Meng et al., 1.993).

Existen otros inhibidores del NHE, que son altamente selectivos y específicos de la isoforma NHE-1, como son el HOE 694 y HOE 642 (cariporide). El HOE 694 exhibe la misma potencia cardioprotectora que el EIPA, presentando una marcada acción antiarrítmica en modelos animales de isquemia cardíaca. En un alto rango de dosis, el HOE 694, redujo las arritmias y previno la fibrilación ventricular durante la isquemia en ratas cuya arteria coronaria fue ligada (Scholz et al., 1.993).

En un estudio realizado en corazón aislado de rata, la administración selectiva intracoronaria de EIPA o HOE-694 en la zona sometida a isquemia y posterior reperfusión, proporcionó una gran protección frente a la fibrilación ventricular producida por la reperfusión, suprimiendo significativamente la inducción de esta fibrilación y promoviendo la recuperación espontánea del ritmo sinusal normal. El EIPA y el HOE-694 exhibieron, ambos, las mismas propiedades antiarrítmicas en cuanto a la fibrilación ventricular se refiere, con una potencia y eficacia similares (Yasutake et al., 1.994).

En corazón aislado de rata perfundido y sometido a 30 ó 45 minutos de isquemia regional y 120 minutos de reperfusión, el tratamiento con EIPA, antes de la isquemia, produjo una reducción significativa del tamaño del infarto (Bugge et al., 1.995).

La inhibición de NHE-1 durante la oclusión coronaria con cariporide disminuyó las arritmias inducidas por reperfusión, la hipercontractura y el tamaño del infarto (García-Dorado et al., 1.997).

Actualmente, se han investigado nuevos inhibidores del NHE, como es el SM-20550, que en estudios preliminares ha producido efectos cardioprotectores en el miocardio reperfundido (Hotta et al., 2.001).

El EMD-85131, inhibidor selectivo de la isoforma NHE-1, ha demostrado que su administración *in vivo* 15 minutos antes de una isquemia de 60 minutos o 15 minutos antes de una reperfusión de 180 minutos, produjo una marcada cardioprotección, en cuanto al tamaño del infarto se refiere (Gumina et al., 1.998)

El MS-31-038, redujo significativamente el tamaño del infarto, incluso cuando se administró un minuto antes de la reperfusión, en un modelo de infarto de miocardio en ratas, y previno además, la aparición de arritmias, como la fibrilación ventricular, en tratamiento preisquémico a ratas sometidas a una oclusión coronaria (Banno et al., 1.999).

El zoniporide, inhibidor más reciente, se ha descrito en estudios preliminares como un potente cardioprotector, disminuyendo el tamaño del infarto en un modelo de corazón aislado de rata (Knight et al., 2.001).

1.2.2. Efectos electrofisiológicos de la inhibición del NHE

1.2.2.1. Sobre automatismo, conducción y refractariedad

Los efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE, como es el efecto antiarritmogénico, son objeto de investigación y de debate en la actualidad.

De los primeros estudios sobre los efectos electrofisiológicos de la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ , se sabe que a nivel electrofisiológico celular, el amiloride, produce un aumento en la duración del potencial de acción de las células de Purkinje (Marchese et al., 1.985).

Yamashita et al., (1.981) investigaron el efecto de la administración de amiloride a una preparación de nodo sinusal, consistente en un fragmento de aurícula derecha irrigada a través de la arteria del nodo sinusal, canulada y perfundida con sangre a una presión constante. Estos autores encontraron un efecto cronotrópico negativo por parte del amiloride, el cual no fue antagonizado por la atropina, lo que descartó un efecto mediado por la activación de los receptores colinérgicos.

Satoh y Hashimoto (1.986) investigaron el efecto del amiloride sobre una preparación de tejido sinoauricular, perfundiendo selectivamente el nodo sinoauricular de perro, encontrando un efecto cronotrópico negativo similar al observado por los anteriores autores. Estos investigadores observaron que el

amiloride aumentaba la duración del potencial de acción de las células del nodo sinusal.

Mochizuki et al. (1.993), observaron una prolongación progresiva en el tiempo, del intervalo R-R, en corazones aislados y perfundidos, de rata, tratados con amiloride (1 mM) durante la reperfusión.

En estudios realizados en corazón aislado de rata, la infusión intracoronaria de una concentración 10 μ M de EIPA disminuyó la frecuencia cardiaca (Yasutake et al., 1.994).

Contrasta con los anteriores resultados el obtenido por Duff et al. (1.991), quien administrando amiloride a un grupo de perros anestesiados y toracotomizados, y EIPA a otro grupo, no hallaron modificaciones en la frecuencia cardiaca.

Duff et al. (1.991), administrando amiloride a pacientes con taquicardia ventricular sostenida inducible, con el fin de investigar los efectos electrofisiológicos de dicha sustancia, no encontró modificaciones significativas de ninguno de los parámetros de automatismo sinusal estudiados, esto es, la

longitud del ciclo sinusal, y el tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido.

El uso de un inhibidor más reciente y específico, el cariporide, por diferentes autores, con el fin de investigar su efecto protector sobre el miocardio isquémico, no ha modificado significativamente la frecuencia cardiaca (Wirth et al., 2.001, Jung et al., 2.004), y pese a que Banno et al (1.999) hallaron para el inhibidor específico MS-31-050, una disminución transitoria de la frecuencia cardiaca, el uso de otros inhibidores, también recientemente sintetizados, y más específicos del sistema NHE, tales como el SM-20550 (Ito et al., 1.999, Yamada et al., 2.000), y el TY-12533 (Aihara et al., 2.000) no exhibió, un efecto cronotrópico negativo a las concentraciones que ejercieron un claro efecto protector sobre el miocardio isquémico.

Respecto a los efectos de los inhibidores del NHE sobre la conducción auriculoventricular, se han realizado trabajos de investigación en los que se describe una depresión de la conducción auriculoventricular, si bien alguno de los inhibidores usados son poco específicos del NHE. Así Yamashita et al. (1.981), citado en líneas anteriores, usando una preparación de nodo AV perfundido con sangre, por la arteria septal posterior, encontró una prolongación del tiempo de conducción auriculoventricular.

En estudios realizados en corazón aislado de rata, la infusión intracoronaria de una concentración 10 μ M de EIPA prolongó el intervalo P-R y produjo un ensanchamiento del complejo ventricular QRST₉₀ (Yasutake et al., 1.994).

Como contraste a las anteriores observaciones, Duff et al. (1.991), en el trabajo de investigación previamente citado, en el cual administró amiloride a pacientes con taquicardia ventricular sostenida inducible, no encontró modificaciones significativas de los parámetros de conducción auriculoventricular estudiados.

Tampoco en ninguno de los trabajos realizados con inhibidores más recientemente sintetizados y que han sido citados en líneas anteriores, y cuyo objetivo fundamental fue investigar los efectos protectores miocárdicos, se relataron modificaciones de los parámetros de conducción auriculoventricular.

Respecto a las investigaciones realizadas sobre los efectos de la inhibición del NHE sobre la refractariedad miocárdica ventricular, el uso del potente y específico inhibidor cariporide, ya citado en el presente capítulo, obtenido con posterioridad (Scholz et al, 1.995) y del que se ha publicado su efecto

protector miocárdico (Humphreys et al., 1.999) cabe decir que el tratamiento con dicho inhibidor durante la isquemia producida por un bajo flujo de perfusión, en corazones aislados de rata, acorta la duración del potencial de acción (Perchenet et al., 1.997).

El intervalo QT, así como la longitud del ciclo sinusal, no variaron en corazones de perro y rata tras la administración de HOE 642 (1 mg/kg) (Xue et al., 1.996).

En estudios realizados en cerdos anestesiados sometidos a 10 minutos de oclusión de la arteria coronaria circunfleja izquierda y posterior reperfusión, la administración de cariporide previno el acortamiento del potencial de acción monofásico inducido por la reperfusión, no produciéndose este efecto durante la isquemia. Esto podría explicar, al menos en parte, la gran eficacia del cariporide contra la fibrilación ventricular inducida por reperfusión en numerosos modelos animales (Wirth et al., 2.001).

En estudios realizados en pacientes a los que se les analizó la actividad antiarrítmica del amiloride, la administración de éste (10 y 20 mg diarios *per os*), produjo como único efecto electrofisiológico, un cambio significativo en el periodo refractario funcional ventricular (PRFV). Además, el amiloride suprimió

los frecuentes y espontáneos latidos prematuros ventriculares en ocho de los quince pacientes (Duff et al., 1.989, 1.995).

El amiloride alarga el periodo refractario funcional del nodo AV aislado y perfundido con sangre. El amiloride, además prolonga el período refractario efectivo en preparaciones de músculo papilar perfundido con sangre, estimulado a una frecuencia de 120 estímulos / minuto (Yamashita et al., 1.981).

En el perro anestesiado y sometido a oclusión arterial coronaria, tratado con amiloride e instrumentado crónicamente para permitir las medidas electrofisiológicas de conducción y refractariedad en el tejido miocárdico infartado ventricular izquierdo y en las zona "límitrofe", el único efecto electrofisiológico del amiloride observado, fue la prolongación de la refractariedad ventricular en esta última zona (Duff et al., 1.988).

1.2.2.2. Sobre la fibrilación ventricular y otras arritmias

1.2.2.2.1. En la isquemia por disminución del flujo regional y/o global y en la reperfusión

La fibrilación ventricular, es la más grave de todas las arritmias cardiacas, ya que, de no ser detenida de manera rápida con medidas correctoras, usadas en un tiempo comprendido entre 3 y 5 minutos, concluyendo de modo fatal. Presenta colapso hemodinámico y un electrograma con ondas de contorno y amplitud muy variable. Está comúnmente asociada con la enfermedad arterial coronaria como un suceso terminal (Braunwald, 1.999).

Duan et al. (1.992), observaron en corazón aislado de rata, habiéndolo sometido a una isquemia de bajo flujo de 30 minutos de duración, que administrando amiloride, se redujeron las arritmias en un 20%, en un periodo que abarcaba los 5 primeros minutos de reperfusión.

Yano et al. (1.993), observaron asimismo en corazón aislado de rata sometido a ligadura de la arteria coronaria descendente anterior, administrando distintas dosis de amiloride, una reducción significativa de taquicardias

ventriculares y de fibrilaciones, tanto en incidencia, como en duración de las mismas.

Mochizuki et al. (1.993), en corazón aislado de rata, al que se le provocó 20 minutos de isquemia global, encontraron que administrando amiloride durante la reperfusión, disminuyeron las arritmias y la duración de sus episodios, y que durante la isquemia no se produjo ningún tipo de arritmia.

En un estudio comparativo de EIPA frente a HOE-694, realizado por Yasutake et al. (1.994), en corazón aislado de rata sometido a perfusión dual (Avkiran y Curtis, 1.991), se demostró que ambos inhibidores del sistema NHE, cuando se administraron por separado, antes de la isquemia regional (de 10 minutos de duración) y durante la reperfusión, o solamente durante la reperfusión, disminuía significativamente la incidencia de fibrilación ventricular de manera proporcional a la dosis administrada de cada fármaco.

Scholz et al (1.993), vieron que administrando el inhibidor HOE-694 a corazones aislados de rata con carga ventricular durante el experimento, a los que se les había provocado isquemia regional mediante la ligadura de la coronaria izquierda durante 15 minutos y posterior reperfusión de 30, se previno la aparición de fibrilación ventricular durante este último periodo.

Scholz et al. (1.995), tratando a los animales con el HOE-642, observaron en experimentos *in vivo* y en corazón aislado de rata, que disminuía la incidencia de fibrilación en el tiempo que abarcaba la reperfusión (30 minutos), habiendo sido precedida de una isquemia regional de 15 minutos en el caso de los experimentos *in vivo* y de 30 minutos en el órgano aislado.

Avkiran e Ibuki (1.992), en corazón aislado de rata, sometido a 10 minutos de isquemia regional y a posterior reperfusión, vieron que podían conseguir que las taquicardias ventriculares post reperfusión no progresaran a fibrilaciones ventriculares y que incluso recuperaran el ritmo sinusal, perfundiendo soluciones ácidas a distinto pH según el momento de la reperfusión.

Banno et al. (1.999), observaron que administrando a ratas, 5 minutos antes de provocar la isquemia de 30 minutos, IMG y MS-31-050, conjuntamente o por separado, estos inhibidores del NHE previnieron la inducción de la fibrilación ventricular y la mortalidad de los animales. Además, estas ratas, también experimentaron una disminución de la duración de la taquicardia ventricular y de los latidos ventriculares prematuros.

Yoshizumi et al. (1.998), vieron en corazón aislado de rata sometido a isquemia y reperfusión, que en un grupo de animales tratados con amiloride administrado 10 minutos, antes de la isquemia regional de 30 minutos y después de la misma, protegió frente a la aparición de fibrilación ventricular frente a lo que ocurrió en otro grupo experimental y en el que la administración de el amiloride se practicó tras la oclusión arterial coronaria e iniciada la reperfusión. En este segundo grupo no se manifestó la protección frente a la fibrilación observada en el anterior grupo.

Humphreys et al. (1.999), administraron vía oral cariporide a ratas durante una semana, y consiguieron, después someterlas a una isquemia regional, que variaba en tiempo según el grupo de estos animales (uno en el que duraba 225 minutos y otro, en el que la isquemia duraba 45 minutos e iba seguida de 180 minutos de reperfusión), disminuir la mortalidad, la incidencia de fibrilación ventricular, el número de extrasístoles, y la incidencia de taquicardia ventricular, así como la duración de la misma.

Gumina et al. (2.000) vieron en perros *in vivo*, expuestos a 60 minutos de isquemia regional y a 180 minutos de reperfusión, que la inhibición del NHE disminuyó las arritmias aparecidas entre el minuto 10 y el 30 tras la iniciación

de la isquemia miocárdica y la aparición de la fibrilación ventricular por reperfusión.

Gazmuri et al. (2.001), investigaron si la inhibición del NHE (con HOE-694 y/o cariporide), en corazón aislado de rata, con o sin la inhibición del cotransportador de sodio-bicarbonato (con ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N-2-etanosulfónico -HEPES-), durante la isquemia y fibrilación ventricular, podría corregir las anormalidades miocárdicas funcionales que probablemente limitan la resucitación cardiaca. Los corazones de rata comenzaron perfundiéndose in vivo para reducir el preconditionamiento, aplicándoles precarga y poscarga mediante la introducción de un balón para conseguir una presión diastólica de 10 mmHg y posteriormente fue introducido en un baño termostatado a 37° C. La isquemia fue producida reduciendo el flujo de perfusión durante la fibrilación ventricular inducida para posteriormente ser restaurada al valor basal. El resultado de la investigación fue que la inhibición simultánea del NHE y del cotransportador de sodio-bicarbonato ejerció un efecto protector contra la contractura isquémica que se desarrolla durante la fibrilación ventricular, así como otros signos de protección miocárdica, como eran una menor desviación a la izquierda de las curvas presión telediastólica-volumen tras la fibrilación ventricular.

Zhu et al. (2.002), probaron un inhibidor del NHE, el FR 168888, en un modelo de isquemia y reperfusión en corazón de rata anestesiada. Provocaron cinco minutos de isquemia miocárdica regional, por la ligadura de la arteria coronaria izquierda, para posteriormente reperfundir durante diez minutos. Con esta inhibición, redujeron la incidencia de fibrilación ventricular y la mortalidad inducida por reperfusión, aún infundiendo el fármaco tras la oclusión coronaria.

1.2.2.2.2. En la fibrilación ventricular seguida de resucitación como modelo de isquemia y reperfusión

Durante la fibrilación ventricular y después de salir de la misma (resucitación), se produce un fenómeno de isquemia y reperfusión ya que, al detenerse el flujo sanguíneo durante la fibrilación ventricular y al mantenerse e incluso aumentar el consumo de oxígeno (Gazmuri et al., 2.002), se produce isquemia; y en la resucitación, al recobrase el flujo de nuevo, ocurre la reperfusión. Tradicionalmente, los esfuerzos por disminuir el daño por resucitación, se han centrado en asegurar el aporte de oxígeno y de sustratos, o bien, limitar los daños de las intervenciones asociadas con la resucitación.

Como hemos visto, una forma eficaz de proteger frente a la isquemia y la reperfusión es la inhibición del NHE. Es por eso, que como en éste y en el siguiente apartado detallaremos, se han realizado recientemente trabajos de investigación encaminados a dilucidar el efecto de los distintos inhibidores del NHE en la fibrilación ventricular y posterior resucitación, como proceso análogo al de los modelos previamente comentados de isquemia por oclusión arterial coronaria seguida de reperfusión. Hay investigadores (Gazmuri et al. 2.002, Ayoub et al. 2.003) que perpetuando los intentos de disminuir el daño por resucitación tras la fibrilación ventricular, han estudiado algunos mecanismos patogénicos de la misma, como es la activación del intercambiador Na^+/H^+ .

En 1.999, Gazmuri et al., desarrollaron un modelo experimental encaminado a reproducir la situación de fibrilación ventricular y posterior resucitación con el fin de evaluar ciertos efectos hemodinámicos y mecánicos producidos por la dicha situación. Este modelo consistió: en preparaciones de corazón aislado de rata, el cual empezó a perfundirse dentro del animal para reducir el preconditionamiento. Se separó éste del animal, y se introdujo en el ventrículo izquierdo un balón con el fin de crear una presión telediastólica de 10 mmHg. La temperatura miocárdica se mantuvo a 37° C sumergiendo al corazón en un baño. Se le indujo fibrilación ventricular, a la vez que se le restringió el flujo coronario durante 10 minutos, y durante los 10 minutos siguientes se le

aumentó éste a sólo un 20% del normal. Después se desfibrilaron y se le repuso el flujo normal. Como resultado de las anteriores investigaciones, se concluyó que la fibrilación ventricular y la isquemia que supone, puede afectar negativamente a ciertas propiedades miocárdicas como el desarrollo de contractura isquémica, el aumento de la resistencia vascular coronaria y el favorecimiento del fallo de bomba diastólica, lo que se pondría de manifiesto tras la resucitación. Estos autores atribuyeron al aumento de la concentración de calcio citosólico, algunos de los efectos adversos, lo cual puede estar relacionado con la activación del NHE (Lazdunski et al., 1.985, tomado de Scholz et al., 1.993).

Gazmuri et al. (2.001), investigaron en corazón *in situ* e *in vitro* de rata, el efecto de la inhibición del NHE con cariporide en la fibrilación ventricular seguida de resucitación, en un modelo que se aproxima a esta situación en el caso del ser humano. Para éste propósito, sometieron a los corazones aislados de rata a 25 minutos de fibrilación ventricular, en los cuales los 10 primeros minutos no tenían riego nutricional y los 15 minutos siguientes, bajo flujo. Después se restableció el flujo junto con desfibrilación. Durante el bajo flujo, fue cuando a los corazones tratados se les empezó a infundir el cariporide, hasta 5 minutos después de desfibrilar los corazones. En el periodo de infusión del cariporide, observaron que los animales tratados tenían menor aumento de

la resistencia coronaria, lo que se constató al observar que disminuyó la compresión pectoral necesaria para obtener presiones coronarias normales durante la fibrilación ventricular y también disminuyó los latidos ventriculares prematuros y las anomalías hemodinámicas tempranas. También hubo menor incremento de la presión telediastólica ventricular izquierda. El modelo usado por estos autores, en los experimentos *in vivo*, para mantener mejor la viabilidad del animal tras la resucitación después de la fibrilación, lo describiremos brevemente: la presión de respiración positiva con 100% de oxígeno, fue iniciada con una válvula neumática, que presionaba el tórax cien veces por minuto, con el fin de que circulase la sangre simulando un masaje cardiaco. Concomitantemente, la compresión pectoral estaba acompañada de un compresor neumático sincronizado que producía dos compresiones por cada respiración (doscientas compresiones por minuto). La profundidad de compresión fue ajustada para producir una presión de perfusión coronaria que sobrepasara los veinte mmHg (umbral requerido para la resucitación exitosa). El periodo post resucitación fue de tres horas. En muchos animales, los corazones tratados con cariporide desfibrilaron espontáneamente. Los tratados con cariporide tuvieron menos latidos ectópicos y mayor presión aórtica media.

Gazmuri et al. (2.002) investigaron en corazón *in situ* e *in vivo* de rata, la protección miocárdica durante la fibrilación ventricular, inhibiendo el NHE con

cariporide, en un modelo que imitaba la isquemia y reperfusión, con un compresor pectoral. *In vitro*, la inhibición del NHE, disminuyó la magnitud de la contractura isquémica durante la fibrilación ventricular, los incrementos en la resistencia coronaria, y disminuyó también la caída de la presión diastólica así como el restablecimiento rápido de la función contráctil después de la resucitación. *In vivo*, la inhibición del NHE, disminuyó la profundidad de la compresión pectoral necesaria para conseguir presiones de perfusión normales durante la fibrilación, y también las anomalías hemodinámicas tempranas y la actividad ectópica.

Ayoub et al. (2.003), desarrollaron en otro modelo animal, el cerdo, un método de fibrilación ventricular y resucitación que evidenciaron las características de una situación de isquemia y reperfusión. Para lo cual, a semejanza del método usado por Gazmuri et al. (2.001), estudiaron la inhibición del NHE en la fibrilación ventricular, en corazón de cerdo *in situ*. Con esta finalidad, los animales fueron intubados para recibir ventilación asistida, y también preparados para que un compresor/ventilador neumático, les imprimiera en el pecho, un ritmo de 80 compresiones por minuto, y así mantener circulando a la sangre durante la fibrilación ventricular, y una respiración cada 6 compresiones. A los animales se les sometió a fibrilación ventricular inducida, mediante corriente en el ventrículo derecho. En estos

experimentos se observó: que los animales tratados con el inhibidor del NHE exhibieron un grosor de la pared ventricular izquierda menor que el de los no tratados, la presión de perfusión coronaria permaneció estable en los animales tratados, que desfibrilaron con éxito y con mínima actividad ectópica post resucitación, sin episodios de fibrilación ventricular recurrente. Los animales no tratados, fallaron al primer intento de resucitación y desarrollaron intensa actividad ectópica con frecuentes episodios de fibrilación ventricular recurrente. También los animales no tratados, tuvieron peor disfunción miocárdica a diferencia de los tratados, disminuyó en ellos la fracción de eyección ventricular izquierda, el índice cardiaco y la presión aórtica media que revirtió parcialmente durante el consiguiente intervalo post resucitación. Y finalmente estos animales mostraron intensa actividad ectópica post resucitación, con frecuentes episodios de fibrilación ventricular recurrente, con notable acortamiento de los potenciales de acción monofásicos y cambios en su morfología. Como contraste, los corazones tratados, también mantuvieron la duración del potencial de acción, mostrando una morfología similar a la basal y exhibieron menos actividad ectópica ventricular post resucitación y menos disfunción miocárdica post resucitación.

Rabkin et al. (2.003), en corazones *in vivo* de cerdo sometidos a fibrilación ventricular durante 75 segundos y posterior reperfusión de 40 minutos,

observaron que administrando, 10 minutos antes de provocar la fibrilación ventricular, un inhibidor del NHE, el BIIB 513, el trabajo de precarga no disminuyó, como ocurrió en el grupo salino. La distensibilidad del ventrículo izquierdo *in vivo* y *post mortem*, permaneció invariable, en los tratados a diferencia del grupo control. El tiempo transcurrido para recuperar la presión sanguínea, después de la fibrilación ventricular, fue significativamente mayor en los animales no tratados con el inhibidor del NHE.

Kolarova et al. (2.003), usaron en ratas un método similar al previamente descrito por Ayoub et al. (2.003) de fibrilación ventricular con mantenimiento de la presión de perfusión coronaria y posterior desfibrilación, con el fin de investigar la mejor estrategia para la desfibrilación exitosa tras fibrilación ventricular no tratada y prolongada. Estos autores encontraron en dos de los grupos experimentales planteados para tal investigación, y en los que se investigó si la inhibición del NHE-1 podría facilitar el retorno de una circulación espontánea durante los intentos repetitivos de desfibrilación, que el tratamiento con el inhibidor del NHE restauró más prematuramente la circulación espontánea, si bien no se llegó a alcanzar una significación estadística adecuada. Por otra parte el tratamiento con cariporide reprodujo los beneficios obtenidos en la resucitación y postresucitación previamente publicados. La energía administrada para la desfibrilación fue significativamente menor en las

ratas tratadas y tuvieron menos bigeminismo y menos salvos extrasistólicos. Durante los 15 primeros minutos de post resucitación, las ratas con cariporide tuvieron mayor presión de perfusión coronaria y aórtica.

1.2.2.2.3. Sobre las características de la fibrilación ventricular en condiciones de isquemia y de normal oxigenación

La fibrilación ventricular (FV) es una arritmia letal cuya aparición implica la pérdida de la contracción efectiva del corazón, la anulación del gasto cardíaco y la muerte súbita del paciente (Rodríguez Font et al., 1.999; Sanjuán et al., 1.994; Aguinaga et al., 1.998; Madrid et al., 1.996). Los avances en el conocimiento de los mecanismos básicos que determinan su inicio, su perpetuación o su cese son necesarios para intentar progresar en la prevención de la FV o en los procedimientos encaminados a interrumpirla eficazmente.

Como se desprende de lo expuesto de las investigaciones anteriormente mostradas, en ninguna de ellas, se ha visto analizado el efecto de la inhibición del NHE sobre las características de la fibrilación ventricular, ya que, incluso en los trabajos en los que el modelo experimental fue la fibrilación seguida de resucitación, los parámetros analizados estuvieron relacionados con la función

mecánica del corazón como bomba, y con la capacidad de los inhibidores del sistema de intercambio citado para disminuir la incidencia de arritmias tras la reperfusión, tanto por eliminación de la oclusión coronaria (en el caso de la isquemia regional) como la resucitación tras la fibrilación ventricular que es, con los modelos experimentales anteriormente usados, una forma de reperfusión postisquémica. No obstante, en ningún caso de los anteriormente citados se analizaron las propias características de la fibrilación ventricular, que podrían relacionarse con la mejor o peor situación en la que quedaría el corazón tras la desaparición de la misma, así como con la mayor o menor facilidad para la cardioversión exitosa.

Expondremos brevemente a continuación, las observaciones realizadas por diferentes autores que correlacionan algunas características de la fibrilación ventricular, con la mayor o menor malignidad de la misma.

Strohmenher et al. (1.997) realizaron una investigación con el propósito de analizar si en pacientes con fibrilación ventricular extrahospitalaria, la frecuencia de esta arritmia y la amplitud de la misma eran predictivas de cardioversión exitosa, y hallaron que el mayor voltaje de la fibrilación ventricular, se correlacionó con unas mejores posibilidades de cardioversión; mientras que la fibrilación "fina" fue más rebelde al tratamiento. Asimismo, se correlacionó bien

con el éxito de la cardioversión, la frecuencia dominante de la fibrilación, hallada mediante la aplicación de la transformada rápida de Fourier. Es decir, las posibilidades de éxito se vieron con valores de frecuencia dominante más altos que aquellos obtenidos en la fibrilación cuyo tratamiento no fue exitoso.

Otro parámetro también analizado fue la frecuencia mediana con la cual se obtuvo una buena correlación entre este parámetro y el buen resultado de la desfibrilación. Para estos autores, la isquemia progresiva debida a parada cardiaca resulta en una depleción de fosfágenos (Neumar et al., 1.990) y un deterioro de la excitabilidad celular (Zipes et al., 1.975), así como una sobrecarga celular de calcio (Clusin et al., 1.984), lo cual, declina la frecuencia de la fibrilación ventricular e incrementa la probabilidad de disociación electromecánica que sigue a la desfibrilación (Martin et al., 1.986, Hillsley et al., 1.994).

Marn-Pernat et al. (2.001), trataron también de encontrar un índice pronóstico para predecir el éxito en la aplicación de choques eléctricos y así restaurar el ritmo del corazón al que tiene con la normal perfusión; estos autores, validaron un algoritmo para predecir la probabilidad de que un choque eléctrico pudiera restaurar un ritmo de perfusión en el modelo experimental usado por los mismos, y midieron el área bajo la curva correspondiente al

trazado fibrilatorio a partir de la amplitud y de la frecuencia obtenidos mediante el análisis espectral de la señal, obteniendo así el índice AMSA (*amplitude spectrum area*) = $\sum A_i \times F_i$, donde A_i es la amplitud de la frecuencia (F) i-ésima. No solamente hubo una buena correlación entre este índice y el buen resultado de la desfibrilación en el sentido de que AMSA permitió orientar hacia el tiempo óptimo de la desfibrilación, sino que también encontraron una buena correlación con otros parámetros predictivos como fueron la frecuencia mediana y la amplitud media de la fibrilación, siendo estos dos últimos, menos discriminativos para la predicción de choques con éxito y sin éxito.

1.2.2.2.4. Análisis de la fibrilación ventricular.

Estudios en el dominio de la frecuencia

El análisis de la activación ventricular durante la FV es complejo debido a las características de la arritmia y a las limitaciones de las técnicas utilizadas para su estudio, que ha sido abordado utilizando métodos y técnicas diversas (Moe, 1.962, Abildskov, 1.994, Allessie et al., 1.996, Carlisle et al., 1.990, Stewart et al., 1.996, Chorro et al., 1.996, Chorro et al., 1.998, Lee et al., 1.996, Cha et al., 1.994, Rogers et al., 1.999, Gray et al., 1.995, Kwan et al., 1.998, Gray et al., 1.998, Chorro et al., 2.000), entre los que se encuentran el

análisis de las características del ECG, registros endocárdicos, intracelulares o de los potenciales de acción monofásicos, el análisis de las características espectrales de las señales fibrilatorias, los estudios basados en técnicas cartográficas y la utilización de simulaciones mediante ordenador.

La cartografía epicárdica de la activación ventricular, empleando electrodos múltiples con los que se registran potenciales extracelulares (Lee et al., 1.996, Cha et al., 1.994, Rogers et al., 1.999, Dillon et al., 1.988, Brugada et al., 1.990) o sistemas ópticos basados en la utilización de marcadores sensibles a los cambios de voltaje y en los que las variaciones en la fluorescencia de la señal indican los cambios del potencial transmembrana de grupos de células próximas entre sí (Davidenko et al., 1.992; Pertsov et al., 1.993, Cabo et al., 1.994, Witkowski et al., 1.998, Gray 1.999, Efimov. et al., 1.999, Zhou et al., 1.995), ha aportado información sobre las características de la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares y han supuesto el soporte metodológico de diversos trabajos sobre la FV en los que se han objetivado los patrones de activación y la existencia de activación reentrante tanto en el inicio de la arritmia como durante la evolución de la misma (Lee et al., 1.996, Cha et al., 1.994, Rogers et al., 1.999; Kwan et al., 1.998, Chorro et al., 2.000, Witkowski et al., 1.998, Weiss et al., 1.999), siendo más limitada la

información disponible sobre su cese mediante procedimientos distintos a la desfibrilación eléctrica (Cha et al., 1.994).

Los métodos basados en el análisis del dominio de la frecuencia tales como los análisis del poder espectral y del espectro de coherencia examinan la distribución de la energía de los electrogramas como una función de la frecuencia (Ropella 2.001). Para el análisis espectral puede ser usado un método matemático como es el de la transformación rápida de Fourier; el análisis de Fourier es un método no paramétrico que descompone las señales en una suma de componentes sinusoidales.

La utilización de técnicas situadas en el dominio de la frecuencia ha ampliado la capacidad de análisis de las ondas fibrilatorias obtenidas con el ECG de superficie o mediante electrodos epi- o endocárdicos. En el espectro de frecuencias los componentes principales de las señales fibrilatorias se agrupan en bandas alrededor de valores definidos que se pueden identificar con facilidad y permiten caracterizar mejor las fases evolutivas de la arritmia. La información proporcionada por las técnicas espectrales y la obtenida mediante la determinación de parámetros en el dominio del tiempo como la mediana de los intervalos VV durante la FV, proporciona información superponible (Chorro et al., 2.000) y son instrumentos útiles para caracterizar las acciones de fármacos

u otros procedimientos terapéuticos. Varias son las características del poder espectral que han sido analizadas en la fibrilación ventricular con el fin de establecer su carácter predictivo en relación con las consecuencias de la misma tras la desfibrilación.

Así, como relatan Gazmuri et al. (2.001) en una revisión al respecto, han sido analizadas: 1) la frecuencia mediana que es la frecuencia que bisecciona el espectro de potencia (Strohmenger et al., 1.997) (Brown et al., 1.991, 1.993, citados por Gazmuri et al., 2.001); 2) la frecuencia límite, que es la frecuencia por debajo de la cual reside el 95% del área del espectro de potencia (Strohmenger et al., 1.997, citado por Gazmuri et al., 2.001); 3) el llamado índice AMSA (amplitud del área del espectro) previamente comentado, que se obtiene integrando el área bajo la amplitud del espectro de frecuencia dentro de un ancho de banda que elimina ciertos artefactos como es el caso del ruido ambiental (Marn-Pernat et al., 2.001); 4) la frecuencia dominante, que corresponde al máximo espectro de potencia (Strohmenger et al., 1.997, citado por Gazmuri et al., 2.001). En el presente trabajo, se pretende usar este último parámetro para el análisis de la fibrilación ventricular.

Otras técnicas de estudio de la fibrilación ventricular han sido las basadas en el análisis de las características del electrocardiograma. Así Moe et al.

(1.941), analizaron la variación en la amplitud de las ondas del ECG caracterizando así la evolución del patrón fibrilatorio desde su inicio. Sobre estos criterios se ha distinguido la fibrilación "fina", de la "grosera" con el fin de establecer situaciones diferentes en la evolución de la fibrilación ventricular, conceptos estos (los de "fina" y "grosera") cuya utilidad ha sido objeto de polémica.

También han sido utilizados métodos de estudio que se han basado en el análisis de los potenciales de acción monofásicos y/o incluso en el del registro intracelular de potenciales de acción mediante el uso de microelectrodos. Estos últimos métodos, han sido de gran utilidad para aportar información adicional sobre la fibrilación ventricular, la cual, origina modificaciones en el potencial de acción como la disminución del tiempo de repolarización (Swartz et al., 1.993).

Otros estudios se han basado en técnicas cartográficas que permiten la obtención de información tanto espacial como temporal, sobre la activación miocárdica durante las arritmias ventriculares. Mediante este método, se identifican los momentos de activación en diferentes lugares explorados pudiéndose construir líneas isócronas: También se pueden construir mapas isopotenciales, esto es, que muestran las zonas con idéntica amplitud de los voltajes en un momento determinado y por tanto, las variaciones de los mismos

a lo largo del tiempo. Estos procedimientos, suponen el registro de electrogramas obtenidos con electrodos múltiples epicárdicos, endocárdicos y/o intramiocárdicos, habiendo sido usados por múltiples autores como son Ideker et al. (1.977), Rogers et al. (1.999), Dillon et al. (1.988), Brugada et al. (1.990), Rankovic et al. (1.999), autores estos citados por Cánoves (2.001).

En la presente tesis doctoral, se plantea como uno de los objetivos analizar la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular inducida, tras inhibir el NHE, en situación de perfusión coronaria con una normal oxigenación, ya que en este caso la frecuencia dominante es una propiedad que se correlaciona bien con otra propiedad relacionada con la aparición de arritmias por re-entrada y con la perpetuación de las mismas, como es la refractariedad miocárdica.

1.2.3. Resumen de la justificación de los objetivos:

Hipótesis de trabajo

1) Dado que la inhibición del intercambiador Na^+/H^+ en la isquemia y reperfusión miocárdicas impide una secuencia de mecanismos que producen efectos deletéreos para el cardiomiocito, y dadas las investigaciones en las que se demuestra una acción beneficiosa sobre el miocardio isquémico y

reperfundido, por parte de los inhibidores de dicho sistema, nos planteamos investigar en corazón aislado de conejo sometido a oclusión arterial coronaria, los efectos que ejerce la administración de un inhibidor del NHE, sobre la inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación de extraestímulos, y sobre la refractariedad miocárdica ventricular, en dicha situación de isquemia regional.

2) Dada la relativamente incompleta información y conclusiones respecto a los efectos electrofisiológicos intrínsecos (automatismo sinusal, conducción auriculoventricular y refractariedad miocárdica ventricular) producidos por la inhibición del NHE en situación de normoxia, nos planteamos investigar en corazón aislado de conejo no sometido a ninguna manipulación, las consecuencias que tiene en esta situación, la inhibición del NHE sobre los parámetros electrofisiológicos citados. Asentamos fundamentalmente, y como acabamos de ver extensamente en líneas anteriores, la idea de que disponemos de información incompleta a este respecto, por las siguientes razones: a) la heterogeneidad de los modelos experimentales utilizados para estudiar en cada caso, alguno de los efectos electrofisiológicos de la inhibición del NHE; b) la falta de especificidad de alguno de los inhibidores usados para la realización de estudios electrofisiológicos amplios; c) las concentraciones usadas de tales inhibidores, que en el caso de gran parte de los estudios realizados *in vitro*,

fueron suprafarmacológicas, d) los estudios realizados con los más recientes y más específicos inhibidores no han tenido como objetivo fundamental realizar estudios electrofisiológicos, sino más bien, otros relacionados con la protección del miocardio isquémico, y e) que nosotros buscamos evidenciar los posibles efectos electrofisiológicos de carácter intrínseco producidos por la inhibición del NHE, en condiciones de normal oxigenación.

3) Finalmente, dada la inexistencia de estudios en los que se ha analizado las características intrínsecas de la fibrilación ventricular (inducida), en condiciones de normoxia, y tras inhibición del NHE, nos hemos propuesto investigar también las posibles modificaciones de la frecuencia dominante de la FV en tales condiciones, como una característica electrofisiológica adicional del miocardio ventricular, y relacionada, al igual que la refractariedad, con la aparición y perpetuación de las arritmias re-entrantes.

1.3. Plan de trabajo

En corazón aislado y perfundido de conejo, procederemos a la oclusión de la arteria coronaria circunfleja izquierda, y trataremos de inducir la fibrilación ventricular mediante la introducción de uno, dos y tres extraestímulos acoplados, así como al estudio de la refractariedad miocárdica ventricular en

tales condiciones. Dicho estudio lo realizaremos en corazones control y en aquellos sometidos a tratamiento con EIPA 0.4 μ M.

En otras series de experimentos con la misma preparación de corazón aislado, pero no sometido a oclusión arterial coronaria, analizaremos los parámetros de:

1) Refractariedad efectiva y funcional auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular.

2) Frecuencia dominante de la fibrilación ventricular inducida por estimulación a frecuencias crecientes.

3) Automatismo sinusal (longitud del ciclo sinusal y tiempo de recuperación del nodo sinusal).

4) Tiempo de conducción sinoauricular.

5) Conducción auriculoventricular, mediante el análisis del intervalo AV, y la longitud del ciclo de Wenckebach.

6) Conducción ventriculoauricular retrógrada mediante el análisis de la longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado.

Estos parámetros serán estudiados en situación control, e inhibiendo el NHE, mediante el inhibidor citado anteriormente, EIPA. Investigaremos dos concentraciones de dicho inhibidor, 0.4 μM , y 1 μM . La primera concentración se halla en el rango de la IC_{50} para el sistema de intercambio de Na^+/H^+ . En cuanto a la segunda, es la concentración más comúnmente usada para investigar los efectos protectores del miocardio isquémico, producidos por la inhibición del NHE.

Posteriormente, con los resultados obtenidos, aplicaremos los tests estadísticos adecuados, comparando los resultados control, con los tratados, para extraer las correspondientes conclusiones.

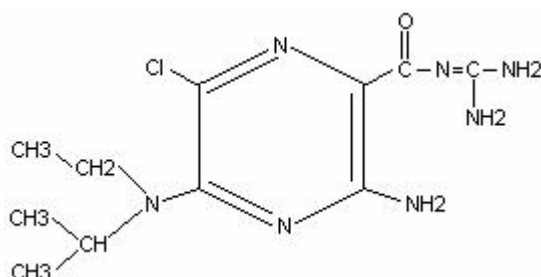
2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Animales de experimentación.

Se efectuó el estudio en corazones aislados de conejos machos de 2.5 ± 0.4 kg de la raza Nueva Zelanda (*Oryctolagus cuniculus*), alimentados *ad libitum*.

2.2. Reactivos.

CaCl₂, MgCl₂, ClK, NaH₂PO₄, glucosa, NaHCO₃, NaCl (Panreac Química S.A.), Ketamina (Ketolar[®] Parke-Davis[®]), heparina sódica al 5% (Rovi[®]) y 5-(N-etil-N-isopropil) amiloride (Sigma[®]) que ha sido el inhibidor del sistema de intercambio Na⁺/H⁺ usado en el presente estudio y cuya estructura química es (Kleyman et Cragoe, 1.998; Van Emous et al., 1.998):



Los más potentes inhibidores del NHE son los análogos del amiloride con grupos hidrofóbicos en posición 5-amino (Simchowitz y Cragoe Jr., 1.986 citados por Kleyman y Cragoe Jr., 1.988) que comparten uno o dos sustituyentes. Dos sustituyentes son generalmente superiores a uno y los sustituyentes son generalmente hidrofóbicos en la naturaleza.

2.3. Aparatos.

a) Sistema de estimulación:

Electrodos bipolares de estimulación de acero inoxidable con un diámetro de 0.125 mm, y distancia interelectrodo de 1 mm.

Estimulador Grass S88 (Grass Instruments[®], Inc., Quincy, MA, U.S.A.) provisto de una unidad de aislamiento de estímulo (SIU5). El estimulador permite emitir pulsos de corriente rectangulares, con una duración de 2 msecs

y en el que podemos controlar parámetros tales como, frecuencia de estimulación, intensidad de estímulo y tiempo de duración del estímulo.

Sistema computarizado conectado al estimulador para estimulación programada.

b) Sistemas de registro:

Electrodo bipolar con diámetro de 0.5 mm y una separación inter-electrodo de 1mm, para el registro del auriculograma.

Electrodo múltiple para registro de los electrogramas ventriculares, compuesto de 256 electrodos unipolares de acero inoxidable, de un diámetro 0.125 mm, y una distancia interelectrodo de 1 mm.

Computador PC (Pentium® 1500 MHz) con software Pacemap®.

Sistema de cartografía de actividad eléctrica cardiaca (MAPTECH®, Waalre, Holanda), que permite la amplificación con una ganancia de 50 a 300, el filtrado que puede eliminar frecuencias situadas fuera de la banda comprendida entre

uno y 400 Hz y multiplexar los electrogramas. La frecuencia de cada canal, ha sido de 1 KHz.

Sistema de soporte magnético Panasonic[®], para grabación de las señales eléctricas que permite el análisis posterior de las mismas.

c) Sistema de perfusión del corazón (figura 3):

Sistema de soporte metabólico tipo Langendorff.

Bomba peristáltica Masterflex[®], Inc., Barrington, IL, U.S.A.

Baños para termostatación Radnoti[®].

d) Otros:

Desfibrilador desarrollado por el grupo de Bioingeniería BET del Departamento de Ingeniería Electrónica de la Universidad Politécnica de Valencia, de descarga basada en exponencial truncada de energía seleccionable.

Bomba de infusión Masterflex[®] y monitores Lucius & Baer[®].

Computador PC con *software* Pacemap[®] para adquisición y mediciones electrofisiológicas de automatismo, conducción y refractariedad.

Computador PC con *software* Matlab[®] versión 6.5 para medición de frecuencias dominantes máximas, mínimas y medias y desviaciones estándar de las mismas.

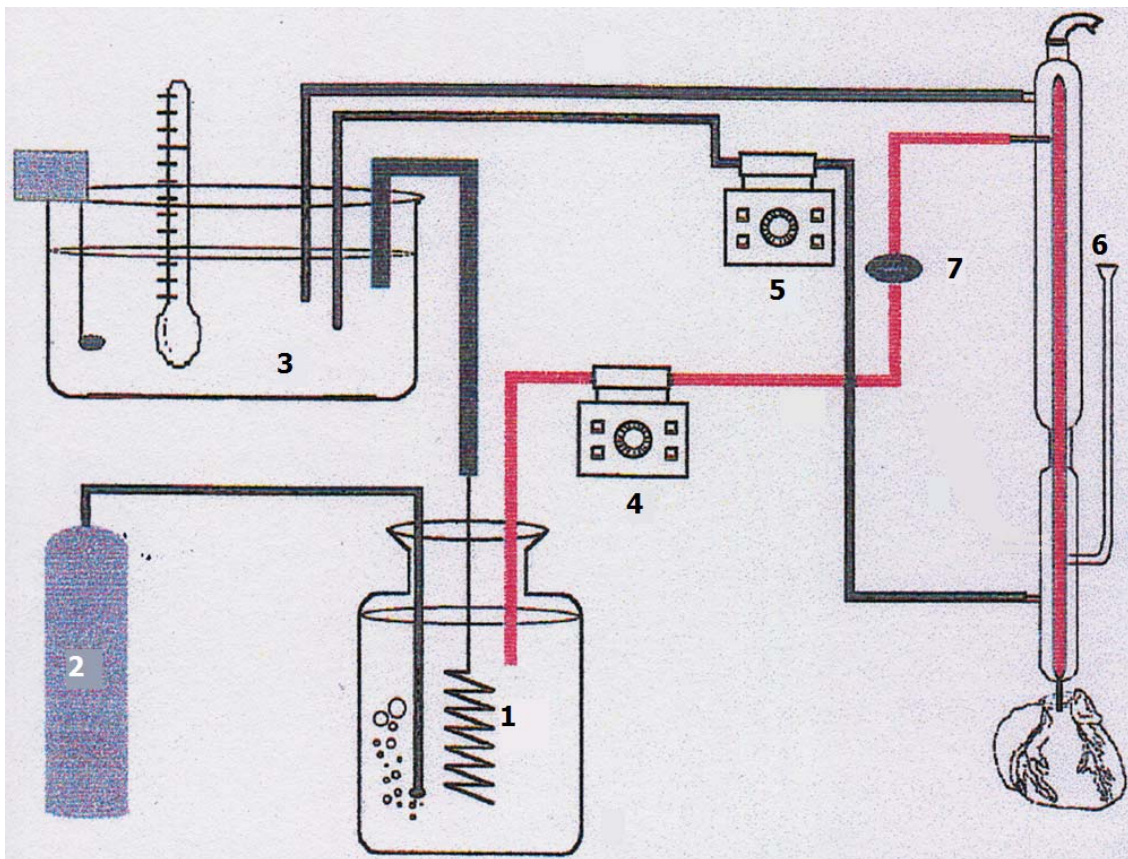


Figura 3: Esquema de una preparación de corazón aislado de conejo, en la que se indica la ubicación del líquido nutricional (Tyrode) en un recipiente (1) conectado a un depósito de carbógeno (2), con baño para termostatar el líquido nutricional (3), y bombas de perfusión (4 y 5), sistema de registro de la presión de perfusión (6), filtros (7), conducción de Tyrode (en rojo), y del líquido termostatizante (en líneas negras gruesas).

2.4. Definiciones.

- Parámetros electrofisiológicos para la valoración del **automatismo sinusal**:

A-A o V-V: longitud del ciclo sinusal cardiaco. Es la longitud, medida en milisegundos, que existe entre una despolarización auricular o ventricular, respectivamente y la siguiente.

Tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido (TRNSc): El tiempo de recuperación del nodo sinusal (TRNS) es la diferencia entre longitud del ciclo A_1 - A_2 después de la estimulación auricular (A_1 representa el último latido de un tren de estimulación auricular, y A_2 el primer latido espontáneo después de la estimulación). Pues bien, el TRNSc corresponde a la diferencia entre el TRNS y la longitud del ciclo sinusal base.

- Parámetros electrofisiológicos para la valoración de la **conducción**:

a) Sinoauricular:

Tiempo de conducción sinoauricular (TCSA): $0.5 \times$ (longitud del ciclo de retorno - la longitud del ciclo sinusal)

b) Auriculoventricular:

Tiempo de conducción auriculoventricular (intervalo A-V): Es el tiempo, expresado en milisegundos, que existe entre una despolarización auricular y la despolarización ventricular que le sigue.

Longitud del ciclo de Wenckebach (LCW): Longitud del ciclo máximo de estimulación auricular que produce bloqueo auriculoventricular tipo Wenckebach.

c) Ventriculoauricular:

Longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado (LCWr): Longitud del ciclo máximo de estimulación ventricular que dificulta una conducción 1:1 ventriculoauricular.

- Parámetros electrofisiológicos usados para la valoración de la **refractoriedad miocárdica**:

a) Auricular.

Período refractario efectivo auricular (PREA): Es el intervalo más largo S_1 - S_2 en el que el extraestímulo S_2 no consigue despolarizar la aurícula (S_1 es el artefacto del último estímulo del tren y S_2 es el artefacto del extraestímulo).

Período refractario funcional auricular (PRFA): Es el intervalo A_1 - A_2 más corto propagado de dos estímulos sobre aurícula con el test del extraestímulo auricular (A_1 es el último electrograma del tren fijo de estimulación y A_2 el electrograma auricular correspondiente al extraestímulo).

b) Del sistema de conducción.

Período refractario efectivo del sistema de conducción auriculoventricular (PRESCAV): Es el intervalo A_1 - A_2 más largo, sin el V_2 correspondiente.

Período refractario funcional del sistema de conducción auriculoventricular (PRFSCAV): Es el mínimo intervalo de acoplamiento entre el electrograma ventricular, producido por el último estímulo del tren base auricular y el que está producido por el extraestímulo (el mínimo V_1-V_2).

Período refractario efectivo ventricular (PREV): Es el máximo intervalo de acoplamiento del extraestímulo ventricular (S_1-S_2) sin captura ventricular (S_2 sin V_2).

Período refractario funcional ventricular (PRFV): Es el mínimo intervalo entre el electrograma ventricular producido por el último estímulo del tren base ventricular, y el desencadenado por el extraestímulo (mínimo V_1-V_2).

- Parámetros electrofisiológicos para el análisis de la **fibrilación ventricular** (FV):

Frecuencia dominante máxima (FrDMáx): Es la frecuencia máxima del espectro registrado por el multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.

Frecuencia dominante mínima (FrDMín): Es la frecuencia mínima del espectro registrado por el multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.

Frecuencia dominante media (FrDM): Es la media de las frecuencias dominantes registradas por el multielectrodo en un tiempo determinado de la fibrilación ventricular.

2.5. Metodología.

a) Preparación y perfusión.

Tras la heparinización (0.5 ml) y anestesia intravenosa (1 ml Ketolar[®] a través de la vena marginal de la oreja, los conejos se sacrificaron mediante dislocación cervical. Después de una toracotomía mediosternal y una pericardiotomía, se extrajo el corazón rápidamente y se sumergió en una solución de Tyrode frío (8° C), para posterior preparación. Después de seccionar la arteria pulmonar y posteriormente diseccionar la arteria aorta ascendente, ésta se seccionó también y se conectó a un sistema de Langendorff, perfundiendo por la aorta al corazón con la solución de Tyrode a 37° C, y pH 7.4, oxigenada, y que contenía en concentraciones mM: NaCl 130, KCl 4.7, CaCl₂ 2.2, MgCl₂ 0.6, NaH₂PO₄ 1.2, NaHCO₃ 24.2 y glucosa 12.

Asimismo, el Tyrode fue gaseado con carbógeno (O₂ al 95% y CO₂ al 5%). La presión de perfusión inicial se fijó en 60 mmHg.

Una vez ubicado el corazón en el sistema, se eliminaron los restos de otros tejidos (pulmón, tráquea, etc.) y mediante una pequeña sección en la aurícula izquierda, se procedió al corte de las cuerdas tendinosas de la válvula mitral con el fin de hacerla insuficiente y permitir el escape del líquido por la aurícula izquierda, evitando así posibles acumulaciones de Tyrode en el ventrículo izquierdo, en el caso de no ser suficientemente competente la válvula aórtica.

b) Posición de los electrodos.

Se situaron dos electrodos bipolares sobre la aurícula derecha, uno para estimulación y otro para registro. De igual modo, otros dos electrodos bipolares se ubicaron en el ventrículo izquierdo, para estimulación y registro. Los electrodos de estimulación estaban conectados a un estimulador Grass S88, quien a su vez estaba conectado, a un sistema computarizado para estimulación programada. Además un multielectrodo de registro 256 electrodos monopares, fue situado en la zona supuestamente irrigada por la arteria circunfleja izquierda, para registrar los electrogramas correspondientes a una

amplia zona ventricular. Los electrodos de registro se conectaron a los amplificadores incorporados al MAPTECH®.

c) Medida del flujo coronario.

El flujo coronario se midió, directamente por colección durante un minuto en cada toma, y se cuantificó gravimétricamente.

d) Determinación de umbrales de estimulación.

Antes de comenzar el protocolo electrofisiológico, que más tarde describiremos, medimos el umbral de estimulación del corazón, con el estimulador Grass. Con una frecuencia de estimulación constante a 4-5 pulsos por segundo y una duración del estímulo, también constante de 2 milisegundos, disminuimos progresivamente la intensidad de estimulación, hasta alcanzar el umbral diastólico, que es la mínima intensidad de estimulación que aplicamos capaz de excitar al corazón. Para realizar el protocolo, estimulamos el corazón con una intensidad doble del umbral diastólico.

e) Determinación de los parámetros de automatismo:

R-R: Medimos el intervalo entre dos despolarizaciones espontáneas auriculares o ventriculares. Es la inversa de la frecuencia cardiaca.

Tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido: Se sustrae al valor del TRNS el valor de la longitud del ciclo sinusal básico. En cuanto a la determinación del TRNS, se procede como sigue: Se estimula la aurícula derecha durante 30 segundos, a una frecuencia 10% sobre la espontánea y cesamos la estimulación durante los 30 segundos siguientes. Volvemos a estimular a una frecuencia incrementada en 40 pulsos por minuto (p.p.m.), durante 30 segundos y dejamos de estimular a los otros 30 segundos siguientes y así sucesivamente hasta que la máxima frecuencia con captura auricular fue alcanzada. Se mide el tiempo, en milisegundos, que existe entre el último auriculograma provocado por el tren de estímulos y el primer auriculograma espontáneo del corazón, que aparece cuando dejamos de estimular cada vez. Este tiempo se mide para cada frecuencia, siendo el TRNS la medida de mayor tiempo de duración.

f) Determinación de los parámetros electrofisiológicos para la valoración de la conducción.

Sinoauricular:

TCSA: Se realizó aplicando el test de Narula (1.978) que consiste en la estimulación auricular con un tren corto de ocho estímulos a una frecuencia ligeramente superior a la espontánea, y se determinó, como hemos señalado en líneas anteriores, multiplicando la diferencia entre la longitud del ciclo de retorno y la del ciclo sinusal base, por 0.5.

Auriculoventricular:

Intervalo A-V: Medimos la distancia entre un auriculograma y el ventriculograma que le sigue.

LCW: Se estimula la aurícula derecha a frecuencias crecientes, con incrementos de 6 p.p.m. cada 3 segundos. Se mide el tiempo, en milisegundos, del menor ciclo de estimulación, que produce un bloqueo auriculoventricular de tipo Wenckebach. Se observa que hay un incremento progresivo del intervalo A-V, hasta que se produce un bloqueo auriculoventricular completo momentáneo, para posteriormente repetirse el fenómeno.

g) Determinación de los parámetros electrofisiológicos para la valoración de la refractariedad miocárdica.

Refractariedad auricular: Se realiza mediante el test del extraestímulo auricular: estimulamos a la aurícula mediante trenes de 10 estímulos, seguidos de un extraestímulo. La frecuencia del tren fue un 10% superior a la espontánea. Este extraestímulo, como se ha descrito anteriormente, se va acercando en intervalos de 5 milisegundos, al último estímulo del tren, hasta que no aparece el auriculograma correspondiente al extraestímulo auricular (S_2 sin A_2).

Refractariedad del sistema de conducción aurículoventricular: Se realiza mediante el test del extraestímulo auricular: estimulamos a la aurícula mediante trenes de 10 estímulos, seguidos de un extraestímulo. La frecuencia del tren fue un 10% superior a la espontánea. Este extraestímulo, como se ha descrito anteriormente, se va acercando en intervalos de 5 milisegundos, al último estímulo del tren, hasta que no aparece el ventriculograma correspondiente al extraestímulo auricular (A_2 sin V_2).

Refractariedad ventricular: Se realiza, de igual modo, mediante el test del extraestímulo ventricular; es decir, estimulamos al ventrículo mediante trenes de 10 estímulos, seguidos de un extraestímulo. Este extraestímulo, se va acercando en intervalos de 5 milisegundos, al último estímulo del tren, hasta

que, el ventriculograma correspondiente al último estímulo del tren, no va seguido del ventriculograma correspondiente al extraestímulo (V_1 sin V_2).

h) Determinación de los parámetros representativos de las características de la fibrilación ventricular (análisis espectral).

Se estimuló el ventrículo izquierdo a frecuencias crecientes usando una intensidad de estimulación ligeramente superior al doble del umbral, que es la intensidad que excepto para la inducción de la fibrilación ventricular, ha sido usada para el estudio de la reactividad. La estimulación fue cesada en el momento en que visualizamos la instauración de la fibrilación ventricular.

Para obtener el poder espectral de las señales fibrilatorias registradas con todos los electrodos unipolares localizados en el ventrículo, se usó el método de Welch. En la figura 3 podemos ver representados un fragmento de la fibrilación ventricular junto con el espectro de frecuencias que la componen.

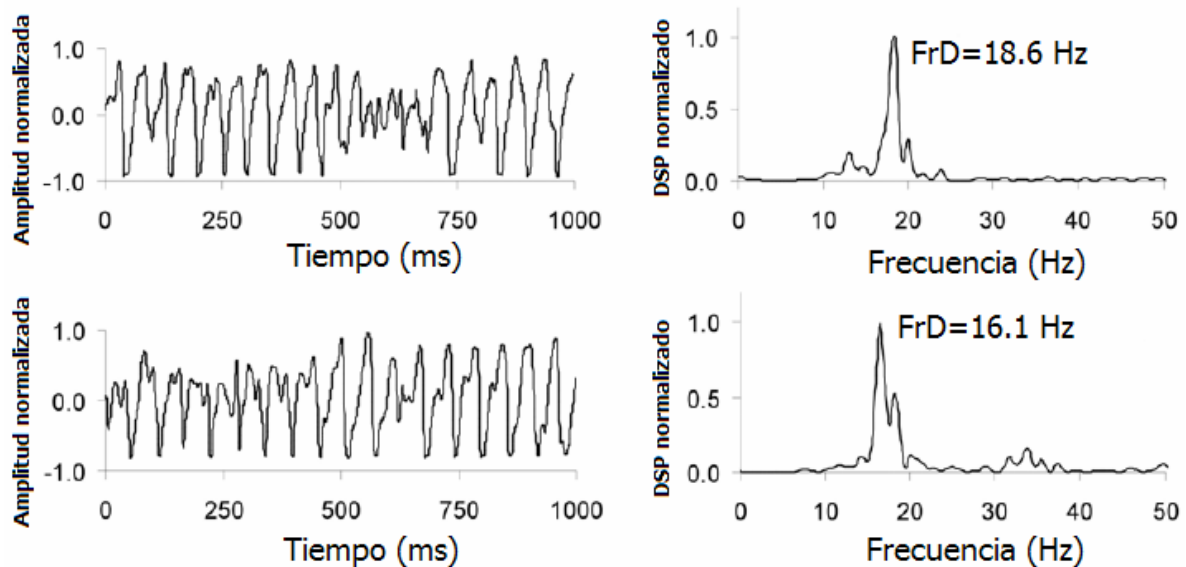


Figura 4: Densidad espectral de potencia (derecha) y registros de fibrilación ventricular obtenidos (izquierda) durante un segundo, tras cinco minutos después de iniciado el proceso fibrilatorio y con el electrodo múltiple epicárdico ubicado en el miocardio ventricular, en una situación control y en un corazón tratado con EIPA 0.4 μ M.

i) Administración del fármaco.

En el caso de los estudios de los efectos de la administración de EIPA a una concentración 0.4 μ M, dicha sustancia se infundió en la raíz aórtica del corazón una disolución de EIPA. La concentración de EIPA que debía recibir el corazón fue de 0.4 μ M. Para alcanzarla, se infundió con una jeringa una disolución, de EIPA en Tyrode (16 μ M) en la raíz aórtica media mediante una bomba, a distinta velocidad, según el flujo coronario del corazón (Tabla 1).

Respecto al estudio de los efectos electrofisiológicos producidos por la administración del EIPA 0.4 μ M sobre las características de la fibrilación ventricular, y para el caso de los efectos del EIPA a una concentración 1 μ M, tanto sobre automatismo, conducción y refractariedad como sobre las características de la fibrilación ventricular, el EIPA se disolvió en el Tyrode. Asimismo, el EIPA también se disolvió en Tyrode para el estudio de la inducibilidad de la fibrilación ventricular tras la oclusión arterial coronaria. Como se verá más adelante, los experimentos en los que se administró EIPA 1 μ M, obligaron a hacer 2 grupos independientes de experimentos: uno control, con corazones perfundidos solamente con Tyrode y, uno tratado al que como acabamos de comentar, la perfusión fue de Tyrode con EIPA.

FLUJO TOTAL	FLUJO TYRODE	INFUSIÓN (ml/min)	V. BOMBA (ml/h)	FLUJO TOTAL	FLUJO TYRODE	INFUSIÓN (ml/min)	V. BOMBA (ml/h)
20	19,5	0,5	30	40	39	1	60
21	20,475	0,525	31,5	41	39,975	1,025	61,5
22	21,45	0,55	33	42	40,95	1,05	63
23	22,425	0,575	34,5	43	41,925	1,075	64,5
24	23,4	0,6	36	44	42,9	1,1	66
25	24,375	0,625	37,5	45	43,875	1,125	67,5
26	25,35	0,65	39	46	44,85	1,15	69
27	26,325	0,675	40,5	47	45,825	1,175	70,5
28	27,3	0,7	42	48	46,8	1,2	72
29	28,275	0,725	43,5	49	47,775	1,225	73,5
30	29,25	0,75	45	50	48,75	1,25	75

31	30,225	0,775	46,5	51	49,725	1,275	76,5
32	31,2	0,8	48	52	50,7	1,3	78
33	32,175	0,825	49,5	53	51,675	1,325	79,5
34	33,15	0,85	51	54	52,65	1,35	81
35	34,125	0,875	52,5	55	53,625	1,375	82,5
36	35,1	0,9	54	56	54,6	1,4	84
37	36,075	0,925	55,5	57	55,575	1,425	85,5
38	37,05	0,95	57	58	56,55	1,45	87
39	38,025	0,975	58,5	59	57,525	1,475	88,5

Tabla 1.- Velocidad programada de la infusión de EIPA 0.4 μ M, en función del flujo coronario.

j) Inducción de la FV.

La fibrilación se desencadenó, excepto en el estudio de la inducibilidad de la fibrilación ventricular en la oclusión coronaria, mediante estimulación ventricular izquierda a frecuencias progresivamente crecientes.

Para el caso del estudio de la inducibilidad de la fibrilación ventricular en los corazones sometidos a oclusión arterial coronaria, se recurrió a la introducción de extraestímulos en la forma que más adelante describimos con detalle.

k) Desfibrilación.

La desfibrilación se llevó a cabo mediante palas metálicas eléctricas, que descargaban después de ser aplicadas a ambos lados del corazón.

l) Protocolo experimental.

1) En el caso del estudio de los parámetros electrofisiológicos de automatismo, conducción y refractariedad y del flujo coronario tras inhibir el NHE con EIPA 0.4 μM , procedimos del siguiente modo: después de analizar dichos parámetros una vez ubicado el corazón en el sistema de Langendorff, y tal como se ha descrito previamente, se procedió posteriormente a la infusión de EIPA y diez minutos después de iniciada la infusión se repitió el estudio electrofisiológico y la medición del flujo coronario.

2) En el caso del análisis de la fibrilación ventricular tras inhibir el NHE con EIPA 0.4 μM , la forma de proceder fue la siguiente: en el grupo control, tras inducir la fibrilación, esta se mantuvo durante cinco minutos, a lo largo de los cuales se realizó el correspondiente registro. Asimismo, en el grupo tratado se registró la fibrilación durante cinco minutos después de iniciada la arritmia..

3) En el caso del estudio de los parámetros electrofisiológicos de automatismo, conducción y refractariedad y del flujo coronario tras inhibir el

NHE con EIPA 1 μM , procedimos del siguiente modo: en un grupo (control), tras ubicar el corazón en el sistema de Langendorff, se realizó el estudio electrofisiológico de automatismo, conducción y refractariedad, y del flujo coronario. En otro grupo (tratado), tras la infusión del EIPA se procedió a realizar el mismo estudio.

4) En el caso del análisis de la fibrilación ventricular tras inhibir el NHE con EIPA 1 μM , la forma de proceder fue la siguiente: tanto en el grupo control como en el tratado, tras inducir la fibrilación, esta se mantuvo durante cinco minutos, a lo largo de los cuales se realizó el correspondiente registro.

5) Estudios con oclusión arterial coronaria (isquemia):

La preparación en el sistema de Langendorff se realizó siguiendo la misma metodología que acabamos de describir para el caso del corazón normalmente oxigenado. Asimismo, la determinación de los distintos parámetros electrofisiológicos se realizaron siguiendo también las mismas técnicas; y lo mismo cabe decir para la determinación del flujo sanguíneo coronario.

En los corazones en los que se ocluyó la arteria coronaria y fueron tratados con EIPA, éste se disolvió en el Tyrode ubicado en el recipiente que contenía dicho líquido nutritivo.

La oclusión arterial coronaria se realizó pasando una aguja de sutura (1/2 x 17mm) con hilo de poliéster (2-0) a través del miocardio adyacente a la arteria a ocluir. Al hilo de sutura se le incorporó un ocluser, el cual se utilizó para interrumpir el flujo coronario. La efectividad de la oclusión se comprobó a través de la observación del incremento de la presión registrada en la raíz aórtica mediante el manómetro de agua conectado lateralmente al sistema de Langendorff, así como por el desnivel del segmento ST observado en los diferentes electrogramas ventriculares epicárdicos.

La sistemática para el análisis de la inducibilidad de la fibrilación ventricular mediante la aplicación de extraestímulos fue la siguiente:

1. En primer lugar se practicó el test del extraestímulo ventricular para la determinación del periodo refractario efectivo ventricular.

2. Posteriormente se aplicó un segundo test del extraestímulo ventricular con introducción de dos extraestímulos (uno de acoplamiento fijo, con intervalo de acoplamiento ligeramente mayor que el periodo refractario determinado con el test señalado en el apartado anterior), y otro posterior, de acoplamiento variable, que sirve además para determinar el período refractario que tendremos como referencia para la aplicación un tercer extraestímulo, según mencionamos en el siguiente apartado.

3. Finalmente, un tercer test del extraestímulo ventricular con introducción de tres extraestímulos (dos de acoplamiento fijo y un tercero de acoplamiento variable).

La metodología para investigar la inducibilidad de la fibrilación ventricular se aplicó tanto al principio del experimento, como asimismo, cinco minutos después de la oclusión coronaria.

2.6. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico de los resultados, se ha utilizado el test de la "t" de *Student* para muestras apareadas, comparando los resultados antes,

versus después de la administración de EIPA 0.4 μM , para el caso de los parámetros de automatismo, conducción y refractariedad.

Para la comparación de los parámetros antes citados cuando la concentración de EIPA estudiada era 1 μM , y para la comparación de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular tanto cuando la concentración de EIPA fue de 0.4 μM , como cuando fue de 1 μM , el test utilizado fue el test "t" de *Student* para muestras no apareadas.

Finalmente, para el análisis del porcentaje de fibrilación ventricular obtenida mediante la aplicación de extraestímulos el test empleado fue el de la χ -cuadrado. El nivel de significación establecido ha sido para una $p < 0.05$.

2.7. Legislación.

Todos los estudios fueron realizados de acuerdo con lo establecido en la Convención Europea de Estrasburgo, el 18 de marzo de 1.986 (B. O. E. 10 de febrero de 1.990).

3. RESULTADOS

3.1. Efectos de la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 0.4 μ M, sobre la inducibilidad de la fibrilación ventricular (FV) y sobre la refractariedad ventricular tras la oclusión arterial coronaria.

En los experimentos en que se pudo inducir FV, ésta se desencadenó al aplicar los tests del extraestímulo durante el periodo de isquemia. La inhibición del NHE redujo la incidencia de FV del grupo tratado con EIPA 0.4 μ M, respecto al control (30% *vs.* 81%, $p < 0.05$; figura 5). El número de experimentos del grupo tratado fue de 10, mientras que el del grupo control fue de 16.

Respecto a los periodos refractarios ventriculares efectivo y funcional determinados en el grupo control, éstos disminuyeron significativamente un 16% (125 ± 12 *vs.* 105 ± 14 ; $p < 0.05$, figura 6), y un 13% (138 ± 9 *vs.* 120 ± 16 ; $p < 0.05$, figura 6) respectivamente tras la oclusión arterial coronaria. A diferencia de lo que ocurrió en el grupo control, en los tratados, si bien disminuyeron ligeramente, esta diferencia no alcanzó una significación estadística, tanto en el caso del PREV (130 ± 13 *vs.* 116 ± 14 , figura 7), como en el del PRFV (148 ± 14 *vs.* 132 ± 15 , figura 7).

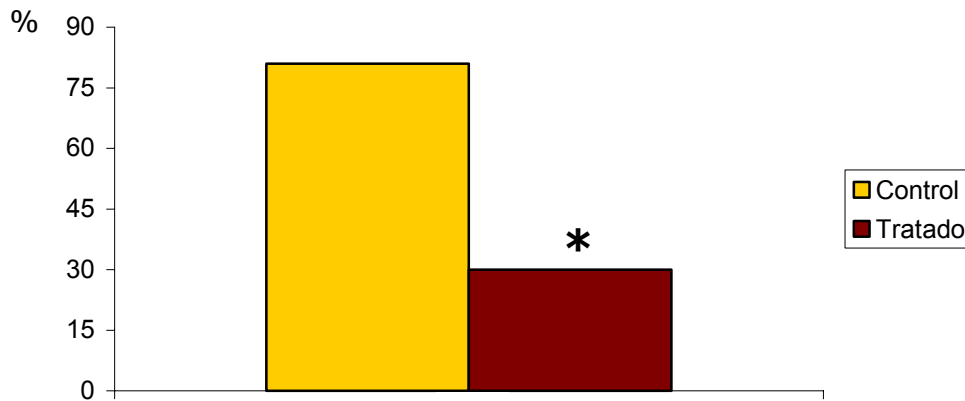


Figura 5: Porcentaje de incidencia de fibrilación ventricular inducida mediante la aplicación de extraestímulos, 5 minutos después de la oclusión coronaria, en el grupo control y en el grupo tratado con EIPA 0.4 μ M. * $p < 0.05$.

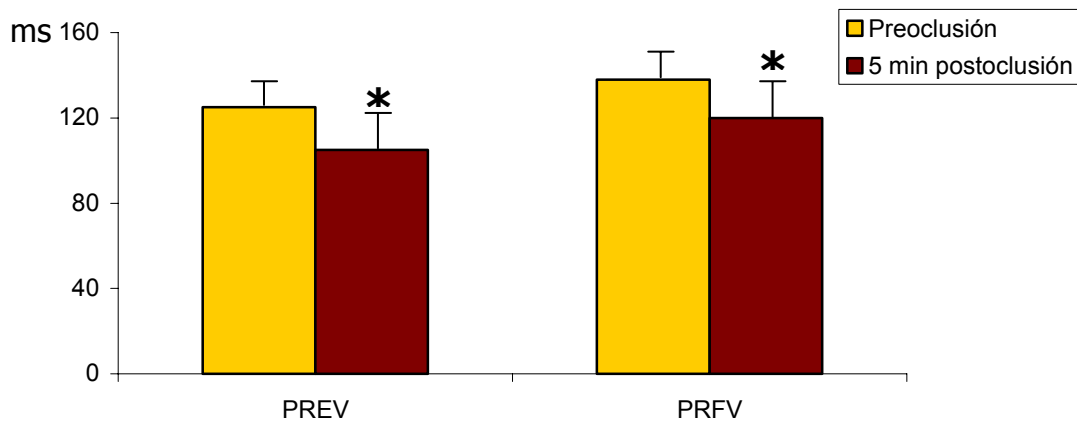


Figura 6: Efectos de la isquemia regional sobre los periodos refractarios ventriculares efectivo y funcional (PREV y PRFV respectivamente) en el grupo control. * $p < 0.05$.

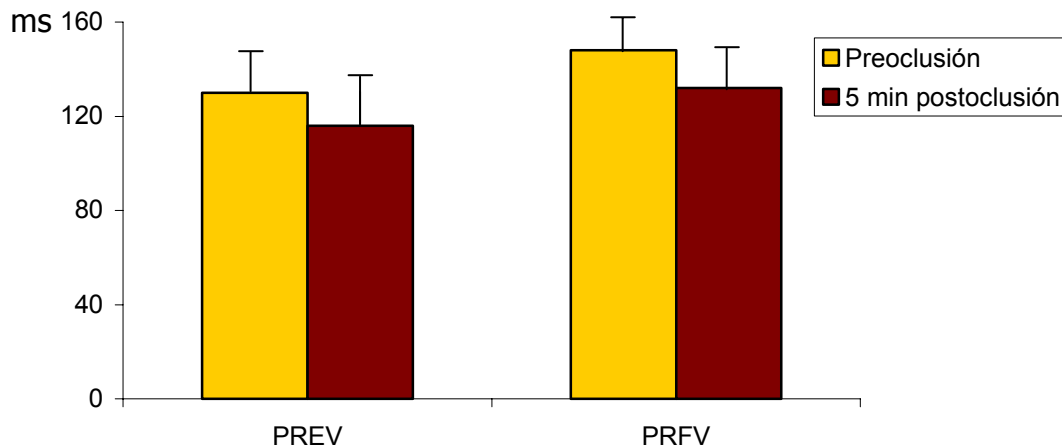


Figura 7: Efectos de la isquemia regional sobre los periodos refractarios ventriculares efectivo y funcional (PREV y PRFV respectivamente) en el grupo tratado con EIPA 0.4 μ M.

3.2. Efectos electrofisiológicos en el corazón aislado y normalmente perfundido (normóxico) tras la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 0.4 μ M.

3.2.1. Cronotropismo sinusal y conducción sinoauricular.

El intervalo R-R aumentó un 15% tras la administración de EIPA (tabla 2 y figuras 8, 9 y 10). Respecto a los demás parámetros de cronotropismo y conducción sinoauricular no se observaron diferencias significativas.

	AUTOMATISMO		CONDUCCIÓN SA
	R-R	TRNSc	TCSA
CONTROL	327±61 (10)	145±54 (10)	62±23 (10)
EIPA (0.4 μM)	377±62* (10)	185±74 (10)	70±28 (10)

Tabla 2: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de automatismo y conducción sinoauricular. Valores expresados en ms. R-R: Intervalo R-R, TRNSc: tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido, TCSA: tiempo de conducción sinoauricular. Número de experimentos entre paréntesis. *p<0.05.

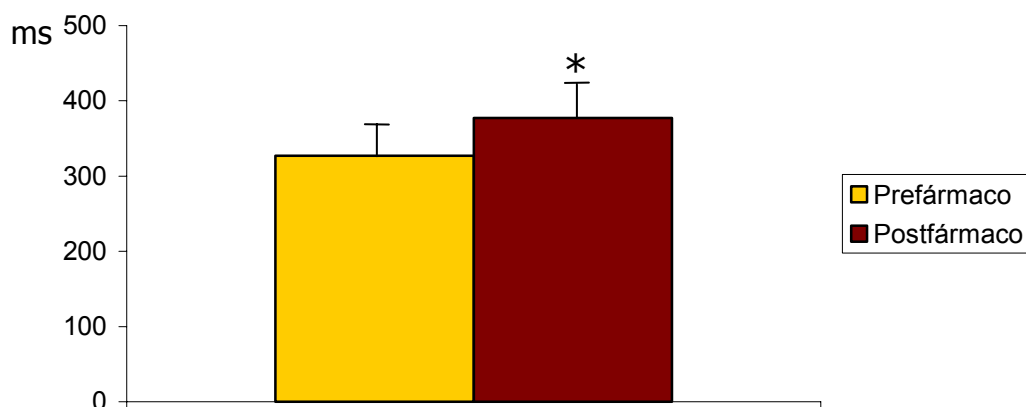


Figura 8: Efecto de la administración de EIPA 0.4 μM sobre la longitud del ciclo sinusal básico (intervalo R-R). *p<0.05.

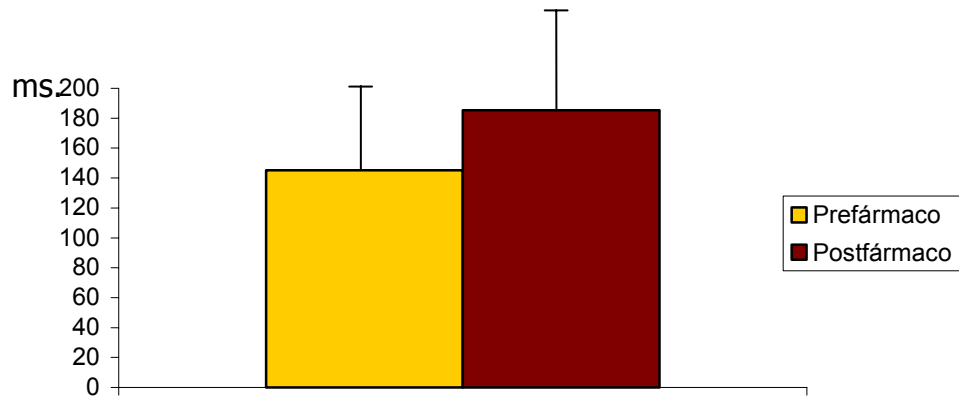


Figura 9: Efecto de la administración de EIPA ($0.4 \mu\text{M}$) sobre el tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido.

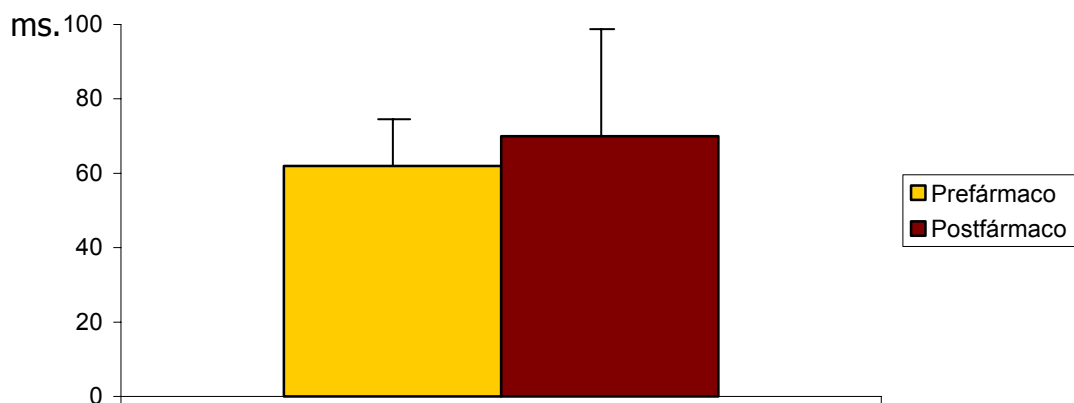


Figura 10: Efectos de la administración de EIPA $0.4 \mu\text{M}$ sobre el tiempo de conducción sinoauricular.

3.2.2. Conducción auriculoventricular.

Tanto la longitud del ciclo de Wenckebach como la longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado, aumentaron respectivamente un 7 y un 16% tras la infusión de EIPA 0.4 μM . Asimismo, el intervalo A-V aumentó significativamente un 17% (tabla 3 y figura 11, 12 y 13).

	CONDUCCIÓN AV		
	LCW	LCWr	INTERVALO A-V
CONTROL	124±16 (10)	148±30 (10)	51±19 (10)
EIPA (0.4 μM)	133±12* (10)	172±25* (10)	60±18* (10)

Tabla 3: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de conducción auriculoventricular. Valores expresados en ms. LCW: Longitud del ciclo de Wenckebach. LCWr: Longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado. A-V:Intervalo A-V. Número de experimentos entre paréntesis. *p<0.05.

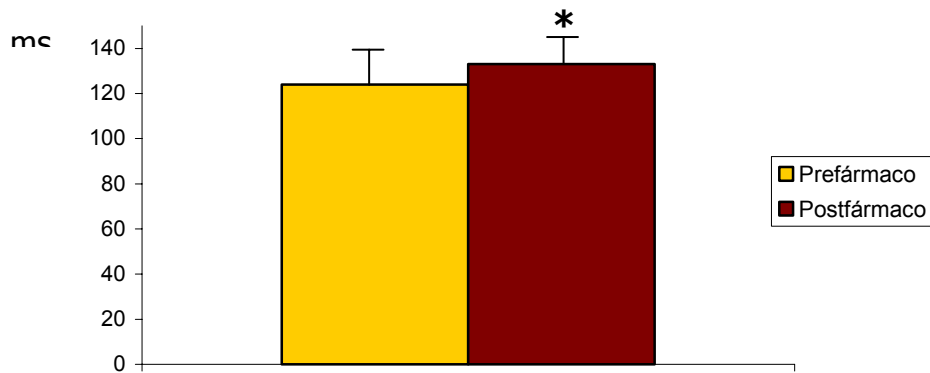


Figura 11: Efecto de la administración de EIPA 0.4 μ M sobre la longitud del ciclo de Wenckebach. * $p < 0.05$.

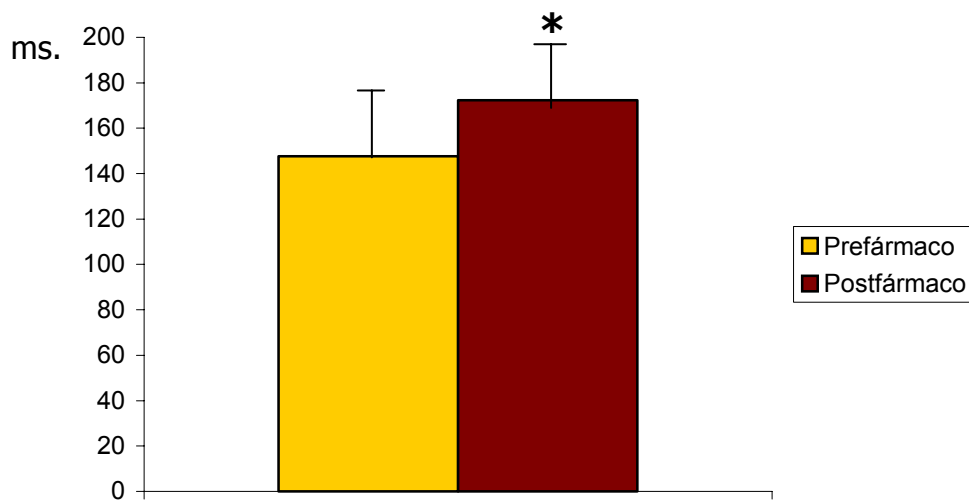


Figura 12: Efecto de la administración de EIPA 0.4 μ M sobre la longitud del ciclo Wenckebach retrógrado. * $p < 0.05$.

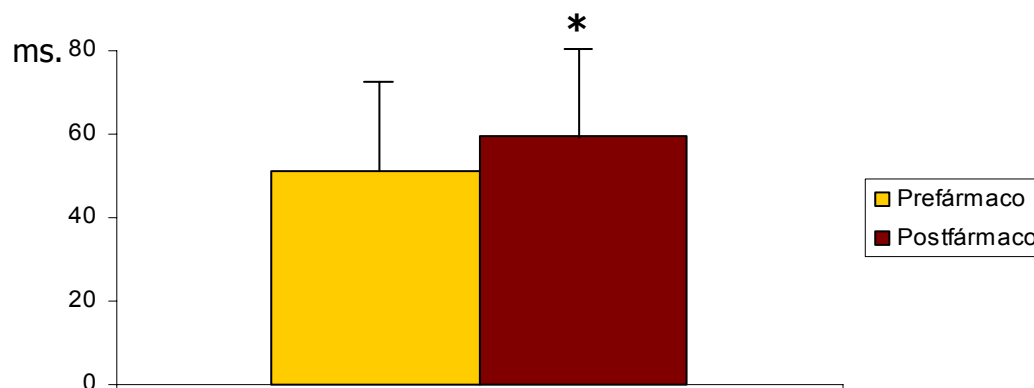


Figura 13: Efecto de la administración de EIPA 0.4 μ M sobre la longitud del intervalo A-V. * $p < 0.05$.

3.2.3. Refractariedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular.

En las tablas 4 y 5, se presentan los valores de los parámetros electrofisiológicos de refractariedad en condiciones basales, y diez minutos después de la infusión de EIPA. La inhibición del contratransportador Na^+/H^+ tras la infusión de EIPA no varió significativamente ninguno de los periodos refractarios analizados, esto es PREA, PRFA, PREV, PRFV, PRESCAV y PRFSCAV (ver figuras 14 y 15).

	REFRACTARIEDAD			
	PREA	PRFA	PREV	PRFV
CONTROL	86±26 (10)	107±30 (10)	127±23 (10)	138±21 (10)
EIPA (0.4 μM)	87±22 (10)	111±27 (10)	135±20 (10)	146±19 (10)

Tabla 4: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los periodos refractarios. Valores expresados en ms. PREA: Periodo refractario efectivo auricular. PRFA: Periodo refractario funcional auricular. PREV: Periodo refractario efectivo ventricular. PRFV: Periodo refractario funcional ventricular. Número de experimentos entre paréntesis. * $p < 0.05$.

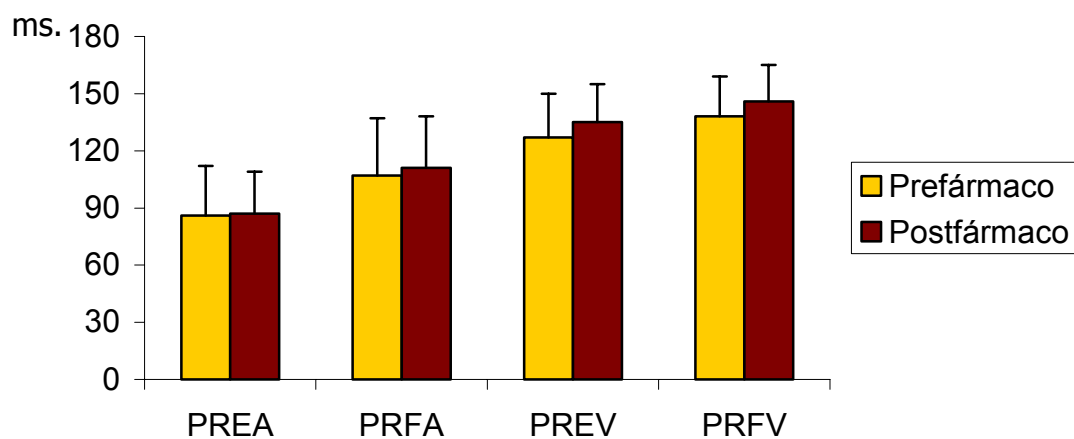


Figura 14: Efectos de la administración de EIPA 0.4 μM sobre el periodo refractario efectivo auricular (PREA), periodo refractario funcional

auricular (PRFA), periodo refractario efectivo ventricular (PREV) y periodo refractario funcional ventricular (PRFV).

	REFRACTARIEDAD	
	PRESCAV	PRFSCAV
CONTROL	112±17 (3)	141±18 (3)
EIPA (0.4 µM)	97±25 (4)	145±17 (4)

Tabla 5: Medias y desviaciones estándar de los valores (en ms.) correspondientes a la refractariedad del sistema de conducción AV. Periodos refractarios efectivo y funcional del sistema de conducción auriculoventricular (PRESCAV y PRFSCAV respectivamente). Número de experimentos entre paréntesis.

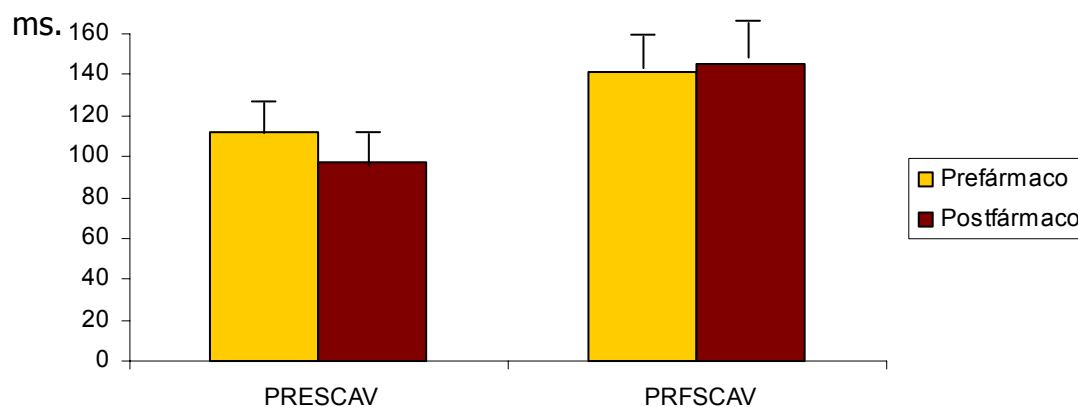


Figura 15: Efectos de la administración de EIPA 0.4 µM sobre los periodos refractarios efectivo y funcional del sistema de conducción auriculoventricular (PRESCAV y PRFSCAV respectivamente).

El hecho de que no pudiésemos determinar los periodos refractarios del sistema de conducción auriculoventricular en la mayor parte de casos, fue debido a que durante la ejecución del test del extraestímulo auricular, se alcanzó el periodo refractario auricular antes que el del sistema de conducción auriculoventricular.

3.2.4. Patrón fibrilatorio ventricular.

En los experimentos en los que se pudo inducir por estimulación a frecuencias crecientes una fibrilación ventricular sostenida, se determinó la frecuencia dominante media, máxima y mínima, a los 5 minutos después de desencadenado el proceso fibrilatorio.

En la tabla 6 se muestran los resultados referentes a las frecuencias dominantes media, máxima y mínima de la fibrilación ventricular determinados 5 minutos después de inducir la arritmia. En las figuras 16 y 17 se representan gráficamente las frecuencias dominantes. No se encontraron diferencias significativas.

	FRECUENCIAS DOMINANTES		
	FrD Media	FrD Máxima	FrD Mínima
CONTROL	18±3 (10)	22±6 (7)	13±2 (7)
EIPA (0.4 μM)	16±5 (10)	19±5 (10)	12±3 (10)

Tabla 6: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a las frecuencias dominantes. Valores expresados en Hertz. FrD: Frecuencia dominante. Número de experimentos entre paréntesis.

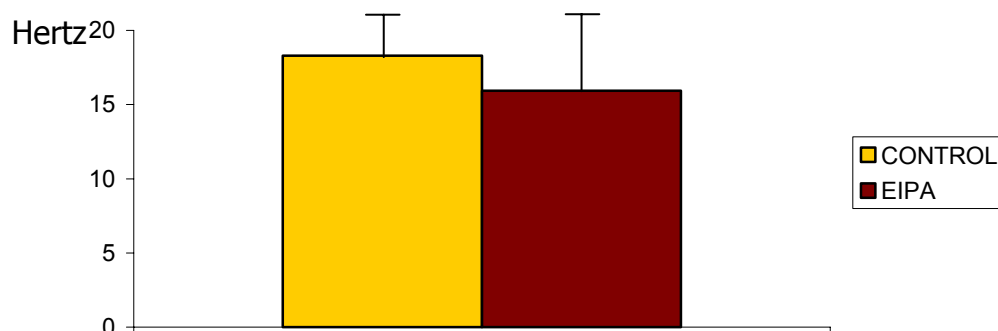


Figura 16: Frecuencia dominante media de la fibrilación ventricular en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 0.4 μM.

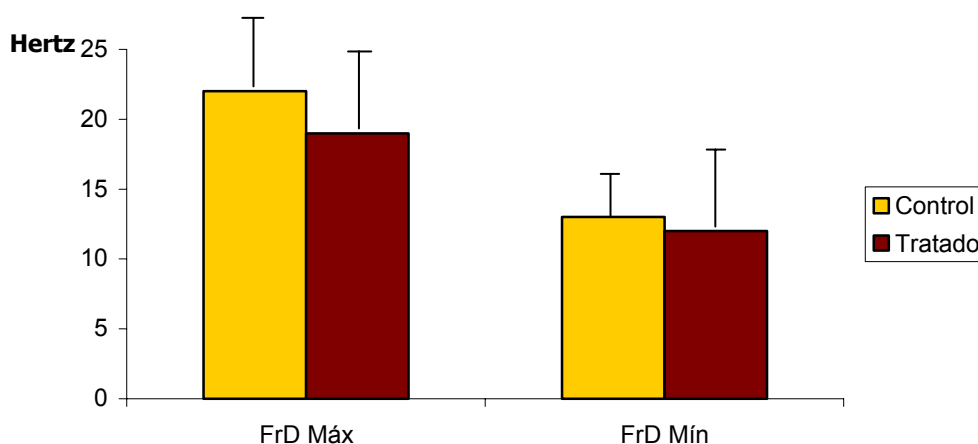


Figura 17: Frecuencias dominantes máxima y mínima, de la fibrilación ventricular en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 0.4 μ M.

3.3. Efectos del EIPA (0.4 μ M) sobre el flujo coronario en corazones aislados y normalmente perfundidos, divididos en grupo control y grupo tratado.

Respecto a los resultados correspondientes al flujo coronario, tras la infusión de EIPA se observó una tendencia a la disminución del flujo, independientemente de que se expresase en ml/min/g de tejido (4.8 ± 2 vs. 3.2 ± 1 ml/min/g respectivamente) o en ml/min/g/latido (0.023 ± 0.010 vs. 0.018 ± 0.05 respectivamente). En ambos casos, esta disminución no fue estadísticamente significativa.

3.4. Efectos electrofisiológicos en el corazón aislado y normalmente perfundido (normoxia) tras la inhibición del NHE mediante la administración de EIPA, 1 μ M.

Recordemos que, como ya fue descrito en el capítulo de Material y Métodos, que a diferencia de los experimentos realizados con EIPA a concentración 0.4 μ M, la solución de Tyrode ya contenía disuelto el EIPA, desde el comienzo del experimento, para el caso de los animales tratados. Obviamente en el grupo control, los corazones se perfundieron solamente con Tyrode. A continuación mostramos los resultados obtenidos al comparar las medidas de los parámetros del grupo control frente a los del grupo tratado con EIPA.

3.4.1. Cronotropismo sinusal y conducción sinoauricular.

El TRNSc fue un 63% más largo en el grupo tratado que en el control (tabla 7 y figura 18). Ninguno de los demás parámetros, tanto de cronotropismo, como de conducción sinoauricular, fueron diferentes entre grupos.

	AUTOMATISMO		CONDUCCIÓN
	R-R	TRNSc	TCSA
CONTROL	327±61 (10)	145±57 (10)	58±23 (12)
EIPA (1 μM)	356±68 (10)	236±24* (9)	59±21 (9)

Tabla 7: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de automatismo y conducción sinoauricular. Valores expresados en ms. R-R: Intervalo R-R, TRNSc: tiempo de recuperación del nodo sinusal corregido, TCSA: tiempo de conducción sinoauricular. Número de experimentos entre paréntesis. *p<0.05.

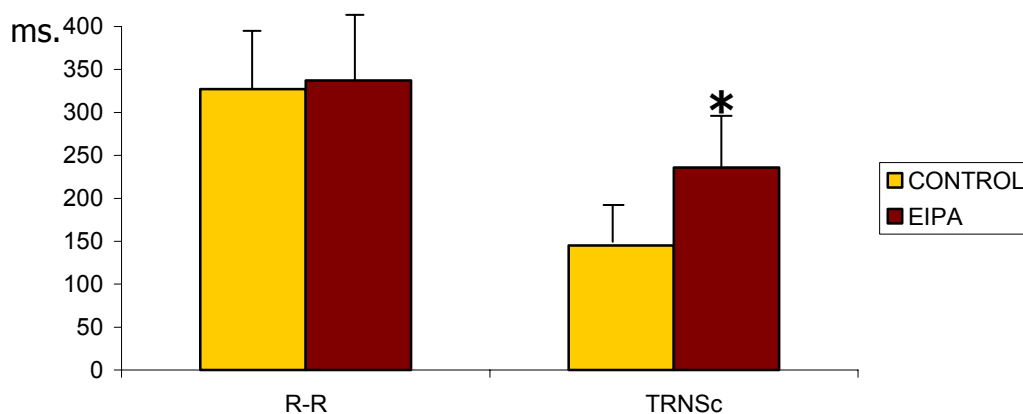


Figura 18: Intervalo R-R y TRNSc en corazones control y en corazones tratados con EIPA 1 μM. *p<0.05.

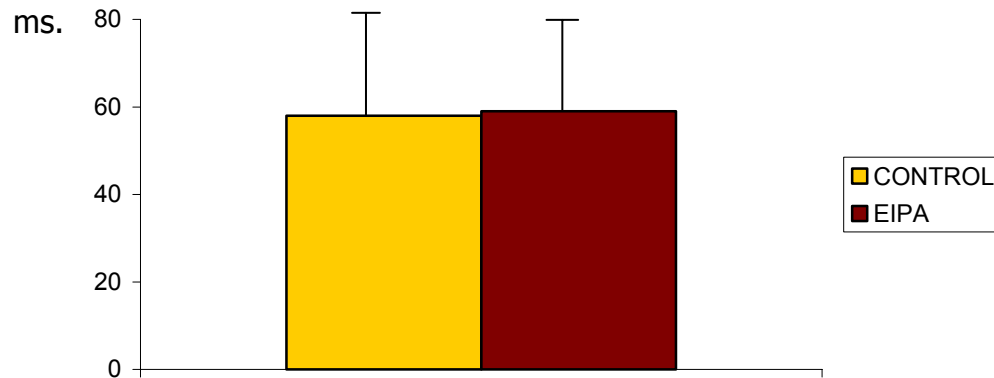


Figura 19: TCSA en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μ M.

3.4.2. Conducción auriculoventricular

Los tres parámetros de conducción auriculoventricular, aumentaron significativamente en los corazones tratados con EIPA 1 μ M. respecto a los corazones del grupo control. La longitud del ciclo de Wenckebach, la longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado fueron un 22% y un 21% respectivamente, más largos en los corazones tratados. Respecto al intervalo de conducción auriculoventricular, éste fue un 29% más largo en los corazones tratados (tabla 8 y figuras 20 y 21).

	CONDUCCIÓN A-V		
	LCW	LCWr	A-V
CONTROL	124±15 (12)	145±27 (12)	51±19 (10)
EIPA (1 μM)	152±25* (9)	176±18* (10)	66±7* (10)

Tabla 8: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de conducción auriculoventricular. Valores expresados en ms. LCW: Longitud del ciclo de Wenckebach. LCWr: Longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado. A-V: Intervalo A-V. Número de experimentos entre paréntesis. * $p < 0.05$.

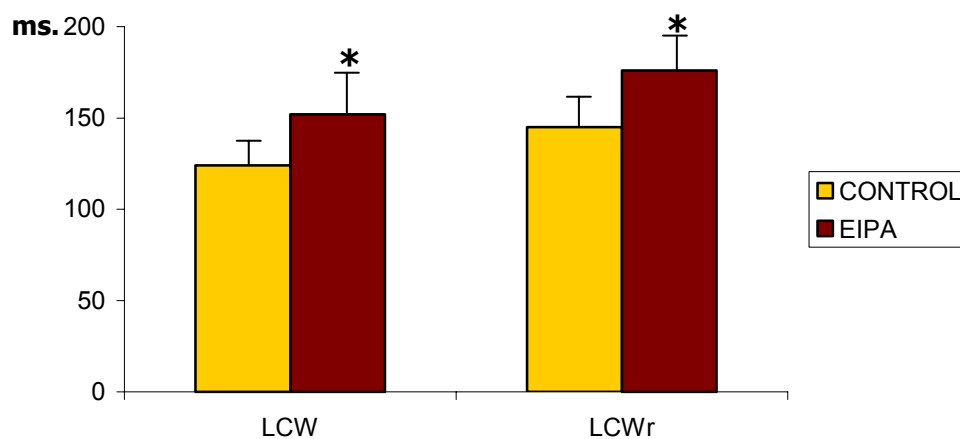


Figura 20: Longitud del ciclo de Wenckebach (LCW) y longitud del ciclo de Wenckebach retrógrado (LCWr) en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μM. * $p < 0.05$.

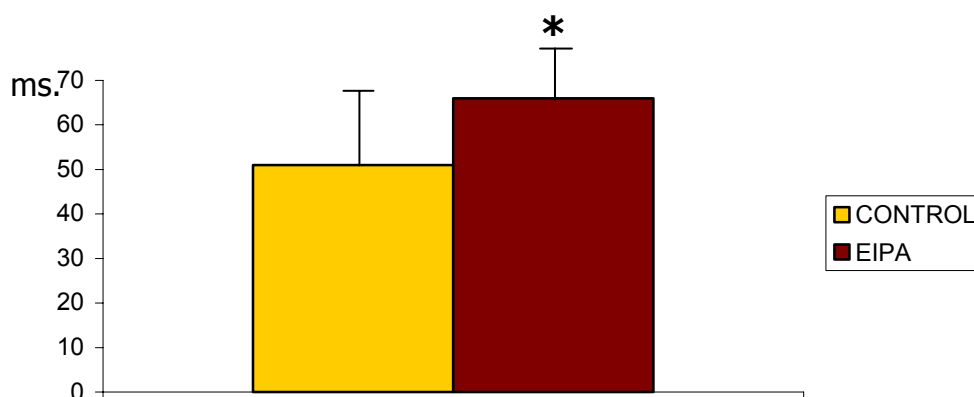


Figura 21: Intervalo A-V en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μ M. * $p < 0.05$.

3.4.3. Refractoriedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular.

Los valores de refractoriedad auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular no variaron durante la infusión de EIPA 1 μ M, excepto en el caso del periodo refractario efectivo del sistema de conducción AV, que fue 16 % mayor en los corazones perfundidos con EIPA que en los controles. La razón de que no se determinaran la refractoriedad del sistema de conducción AV en muchos casos, fue la misma que para los corazones tratados con EIPA 0.4 μ M. (tabla 9 y figura 22, y tabla 10 y figura 23).

	REFRACTARIEDAD			
	PREA	PRFA	PREV	PRFV
CONTROL	77±23 (12)	96±31 (12)	125±21 (12)	138±19 (12)
EIPA (1 µM)	76±8 (10)	95±12 (10)	126±13 (10)	149±11 (10)

Tabla 9: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de refractariedad. Valores expresados en milisegundos. PREA: Periodo refractario efectivo auricular. PRFA: Periodo refractario funcional auricular. PREV: Periodo refractario efectivo ventricular. PRFV: Periodo refractario funcional ventricular. Número de experimentos entre paréntesis.

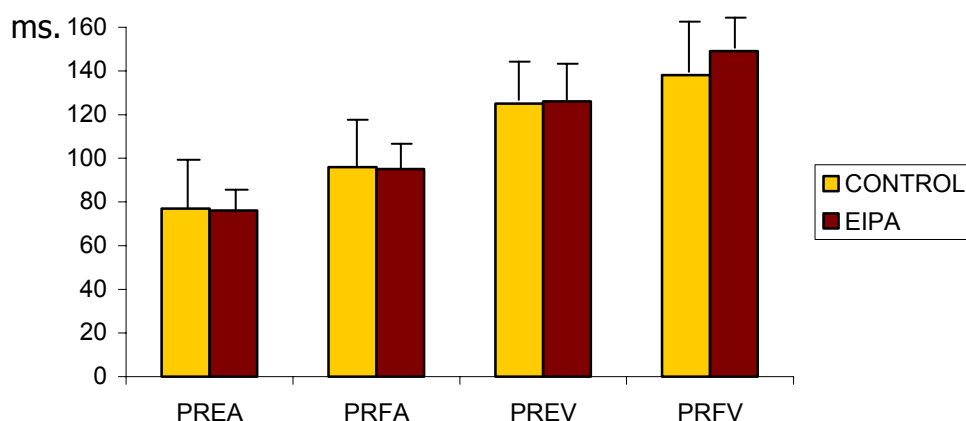


Figura 22: PREA, PRFA, PREV y PRFV, en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 µM.

	REFRACTARIEDAD	
	PRESCAV	PRFSCAV
CONTROL	112±7 (3)	141±18 (3)
EIPA (1 μM)	130±10* (3)	161±11 (3)

Tabla 10: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de refractariedad del sistema de conducción AV. Valores expresados en ms. PRESCAV: Periodo refractario efectivo del sistema de conducción auriculoventricular. PRFSCAV: Periodo refractario funcional del sistema de conducción auriculoventricular. Número de experimentos entre paréntesis. *p<0.05.

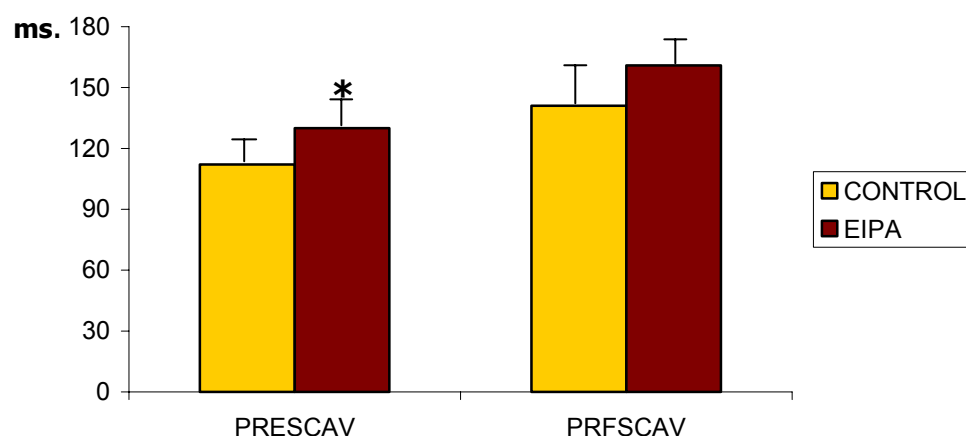


Figura 23: PRESCAV y PRFSCAV en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μM. *p<0.05.

3.4.4. Patrón fibrilatorio ventricular.

En los experimentos en los que se pudo inducir por estimulación a frecuencias crecientes una fibrilación ventricular sostenida, se determinó la frecuencia dominante media, máxima y mínima, no observándose cambios significativos al comparar los resultados obtenidos a los 5 minutos de fibrilación, entre el grupo control y el grupo tratado con EIPA 1 μ M. Tampoco se observaron cambios entre los diferentes momentos analizados a lo largo del tiempo, dentro de cada grupo (resultados no mostrados). Tabla 11, figuras 24 y 25.

	FRECUENCIAS DOMINANTES		
	FrD Media	FrD Máxima	FrD Mínima
CONTROL	15\pm6 (11)	17\pm2 (11)	10\pm3 (11)
EIPA (1 μM)	16\pm2 (6)	20\pm6 (6)	10\pm3 (6)

Tabla 11: Medias y desviaciones estándar de los valores correspondientes a los parámetros de frecuencias dominantes. Valores expresados en Hertz. FrD: Frecuencia dominante. Número de experimentos entre paréntesis.

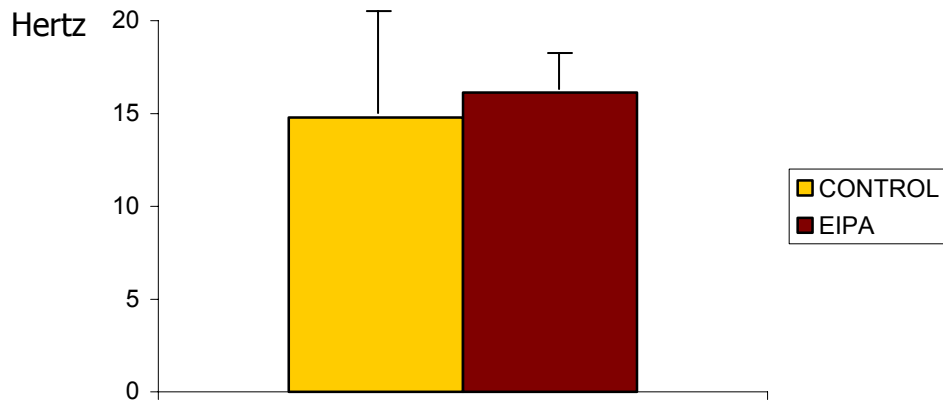


Figura 24: Efectos del EIPA 1 μM sobre la Frecuencia dominante media en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μM .

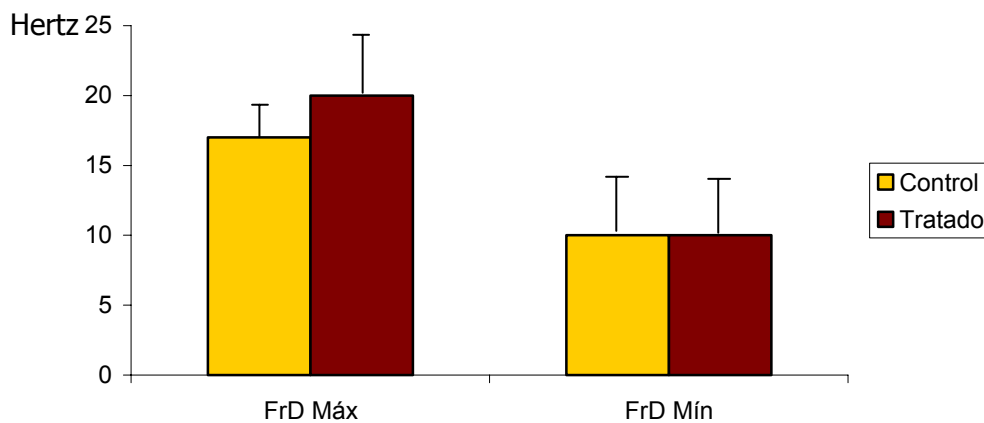


Figura 25: Efectos del EIPA 1 μM sobre las frecuencias dominantes máxima y mínima en corazones control y en corazones perfundidos con EIPA 1 μM .

3.5. Efectos del EIPA (1 μ M) sobre el flujo coronario en corazones aislados y normalmente perfundidos.

Cuando se expresó en ml/min/g de tejido se observaron diferencias significativas en corazones del grupo control frente a los corazones del grupo tratado (4.72 ± 1.46 vs. 2.77 ± 1.63 respectivamente), esto es, una disminución del 41 %; sin embargo, no hubo diferencias significativas cuando el flujo se normalizó a ml/min/g/latido (0.024 ± 0.009 vs. 0.017 ± 0.006).

4. DISCUSIÓN

4.1. Algunas consideraciones generales.

En el presente estudio se ha investigado un aspecto más de la protección miocárdica producida por la inhibición del NHE, mediante el análisis de la inducibilidad de la fibrilación ventricular a través de la aplicación de extra-estímulos, y el análisis de la refractariedad ventricular, en el miocardio sometido a oclusión arterial coronaria. Asimismo ha sido objeto de esta tesis investigar si la inhibición del NHE produce modificaciones de carácter intrínseco sobre automatismo, conducción auriculoventricular y muy prioritariamente sobre la refractariedad miocárdica (auricular, ventricular y del sistema de conducción auriculoventricular), y las características de la fibrilación ventricular, en el miocardio perfundido con una normal oxigenación.

Como se ha venido exponiendo a lo largo del capítulo de Introducción, ha sido demostrado ampliamente y desde hace algunos años, que la inhibición del NHE en el miocardio isquémico y reperfundido, evita una serie de acontecimientos celulares que ejercen un efecto deletéreo. La gran cantidad de publicaciones en las que se demuestran efectos beneficiosos a diferentes niveles, tras la inhibición del sistema de intercambio mencionado, y que

asimismo han sido comentadas, ha avalado la hipótesis según la cual inhibiendo el NHE en la isquemia, se protege al cardiomiocito durante la reperfusión post-isquémica.

Nosotros hemos pretendido aportar más datos en el sentido que acabamos de exponer, pero investigando un aspecto algo diferente, y que ha sido, el de la protección durante la isquemia (no seguida de reperfusión), frente a algún mecanismo inductor de arritmias re-entrantes, y también investigar uno de los mecanismos implicados, que es la refractariedad del ventrículo afectado por la oclusión coronaria.

Haber estudiado la refractariedad intrínseca de los diferentes territorios miocárdicos, y especialmente la ventricular, en situación normóxica y tras la inhibición del NHE, nos permite investigar la posibilidad de que se produzcan modificaciones directas del citado parámetro electrofisiológico, por la mencionada inhibición. Como ya hemos apuntado previamente, se piensa que el NHE no juega ningún papel en condiciones normales, y solamente en situaciones en las que se deprime intensamente el pH, como ocurre en la isquemia, se pone en acción tal contratransportador. Es por ello que hemos querido investigar si efectivamente en condiciones normóxicas se mantiene la refractariedad tras la inhibición del NHE. Fundamentalmente nos ha interesado

la refractariedad ventricular por su relación con las arritmias por re-entrada como taquicardias ventriculares y fibrilación ventricular, que son arritmias muy frecuentes en la isquemia y reperfusión cardiaca.

También hemos querido investigar otros efectos que podría exhibir la inhibición del NHE, sobre otras propiedades electrofisiológicas miocárdicas, como son el automatismo sinusal y la conducción sinoauricular y auriculoventricular. El estudio de estas propiedades electrofisiológicas, lo consideramos de menor interés desde el punto de vista de la explicación de los efectos beneficiosos que exhibe la inhibición del NHE sobre la protección miocárdica; además el EIPA quizá no sea el mejor inhibidor para el análisis de estos parámetros, si bien es el más específico al que hemos tenido acceso. No obstante, hemos considerado también objetivo de esta tesis el estudio de la modificación de estos parámetros tras la inhibición del NHE, por las razones que hemos apuntado en la hipótesis de trabajo y en la justificación de los objetivos precedentes, y que se resumen en la ausencia de resultados publicados, suficientemente concluyentes, a nuestro entender, sobre los efectos intrínsecos de la inhibición del NHE sobre los mismos.

4.2. Sobre la metodología y el inhibidor del NHE usado.

Para la realización de la presente investigación ha sido usada una preparación de corazón aislado con el fin de excluir influencias nerviosas y/o humorales sobre los resultados. Éste es un modelo usado comúnmente para el estudio de efectos electrofisiológicos directos o intrínsecos de fármacos o de diversas manipulaciones como son estiramientos, lesiones por radiofrecuencia, variaciones térmicas, hipoxia global, etc. (Chorro et al., 1.997, 1.999, 2.000, Such et al., 2.002).

El modelo de corazón aislado de conejo, presenta la ventaja respecto al corazón aislado de perro, que no requiere sangre para su perfusión, sino líquidos de fácil disponibilidad y preparación como es el Tyrode; además es de fácil manipulación, lo que le da también ventajas respecto al corazón de animales más pequeños como es el de rata o cobaya.

Respecto al inhibidor del NHE, y las concentraciones del mismo usadas hay que decir que: el EIPA es un inhibidor del NHE mucho más específico que el amiloride, siendo uno de los cientos de derivados del mismo, y se halla entre una serie de análogos con grupos hidrofóbicos sobre el átomo de nitrógeno del $-NH_2$ situado en posición 5, que exhiben una potencia de 10 a 500 veces superior a la del amiloride en la inhibición del NHE (Kleyman y Cragoe 1.988) y en cuanto a la concentración de EIPA usada, ha sido doble: $0.4 \mu M$, que es una

concentración muy similar a la IC_{50} para el NHE , y $1 \mu M$, que ha sido una concentración muy usada para investigar los efectos protectores de la inhibición del NHE sobre el miocardio isquémico y reperfundido.

EIPA $0.4 \mu M$, es una concentración ligeramente superior a aquéllas para las que se ha demostrado una reducción en la producción de arritmias durante la isquemia y reperfusión miocárdica, y además es una concentración similar a las usadas por otros autores que investigaron el papel de la inhibición del NHE, no sólo en la protección miocárdica, sino también sobre fenómenos como el preconditionamiento.

Efectivamente Scholz et al. (1.992), usando una concentración $0.3 \mu M$ de EIPA en un modelo de isquemia y reperfusión en corazón aislado de rata encontraron una reducción muy marcada de la incidencia y de la duración de la fibrilación ventricular. Este efecto claramente protector se manifestó a nivel metabólico ya que los contenidos miocárdicos de glucógeno, ATP y fosfato de creatina se mantuvieron en valores más altos que en los corazones control.

Yasutake et al. (1.994), incluso con una concentración de EIPA cuatro veces inferior a la usada por nosotros, hallaron una reducción significativa en la

aparición de fibrilación ventricular, en corazones aislados de ratas sometidos a isquemia y reperfusión.

Por otra parte, esta concentración de EIPA está muy lejos de aquéllas que han mostrado efectos adversos (Kleyman y Cragoe 1.988). Amiloride y mucho menos sus derivados son sustancias bradicardizantes. La concentración de 0.4 μM , es, según se desprende de un estudio previo realizado por nosotros, la que menor efecto depresor manifiesta sobre el automatismo y la conducción auriculoventricular, y que sigue teniendo, según se desprende de los trabajos de investigación revisados por nosotros, un efecto protector sobre el miocardio isquémico y reperfundido.

En el citado estudio realizado por nuestro grupo de trabajo (Blanco et al., 2.000) investigamos en corazón aislado de conejo el efecto de la administración de diferentes concentraciones de EIPA (4×10^{-7} , 8×10^{-7} , y 8×10^{-6} M), sobre el automatismo sinusal, mediante el análisis de la longitud del ciclo sinusal (intervalo R-R) y la conducción auriculoventricular, mediante el análisis del intervalo A-V y de la longitud del ciclo de Wenckebach. De las concentraciones investigadas, la que menos modificó los parámetros mencionados fue la menor concentración usada en la presente tesis, y hemos querido que una de las dos

concentraciones investigadas fuera la que menos efectos secundarios de carácter electrofisiológico exhibiera.

Respecto a la concentración más alta usada por nosotros, para algunos autores, 1 μM es una concentración que abolió la aparición de fibrilación ventricular durante la reperfusión post-isquémica, aunque 0.4 μM , como acabamos de comentar, también reduce marcadamente la incidencia de fibrilación ventricular (Scholz et al., 1.992). Además, 1 μM inhibió totalmente el flujo de Na^+ (dependiente del intercambiador de Na^+/H^+) en cardiomiocitos aislados y acidificados por la adición de propionato al medio de cultivo, lo cual indica una inhibición total del intercambiador mediante la adición de la mencionada concentración. El número de investigadores que han usado 1 μM de EIPA con el fin de analizar la capacidad protectora de dicho inhibidor sobre el miocardio isquémico es elevado (Imashashi et al., 1.998, Sholz et al., 1.992, Toda et al., 1.999, Schäfer et al., 1.999, Mosca and Cingolani, 2.000), y es por ello que la mayor concentración usada por nosotros haya sido ésta.

Por las razones anteriormente comentadas, hemos creído que usar dos concentraciones, respondería mejor a los objetivos propuestos. Más adelante comentaremos algunos aspectos relacionados con las implicaciones que tiene a nivel electrofisiológico, el uso de diferentes concentraciones de EIPA.

4.3. Respecto a los resultados obtenidos.

4.3.1. Inducibilidad de la fibrilación ventricular y refractariedad ventricular tras la oclusión coronaria.

Como hemos comentado en el capítulo de Material y Métodos, la protección miocárdica mediante la inhibición del sistema de intercambio objeto de este trabajo, ha sido investigada a nivel de la producción de arritmias, el tamaño del infarto, la aparición de "aturdimiento" miocárdico, la hemodinámica, parámetros metabólicos y otras variables (Hendrikx et al., 1.994, Scholz et al., 1.995, García-Dorado et al., 1.997, Knight et al., 2.001, Gazmuri et al., 2.001, Scholz et al., 1.993, Yasutake et al., 1.994, Bugge et al., 1.995), así como también sobre la resucitación tras un episodio de fibrilación ventricular, en tanto que dicha situación entraña también un proceso de isquemia seguido de reperfusión, y que también ha sido comentado en el capítulo de Introducción.

En el presente estudio hemos investigado la protección ejercida por la inhibición del NHE con EIPA sobre la inducibilidad de la fibrilación ventricular. Como hemos visto en el capítulo de Resultados, en lo que respecta a este aspecto de la investigación, la administración de EIPA protegió de una forma

importante frente a la producción de dicha arritmia tras la aplicación de extraestímulos. Pensamos que es ésta una aportación adicional a las múltiples en las que se demuestra un efecto protector de la inhibición del NHE en el miocardio isquémico. El estudio sobre la inducibilidad de la fibrilación ventricular, así como sobre la refractariedad ventricular tras la oclusión arterial coronaria ha sido realizado únicamente con la concentración de EIPA menor de las dos usadas por nosotros, esto es, 0.4 μ M.

La menor incidencia de fibrilación ventricular inducida por la aplicación de extraestímulos en los animales tratados con EIPA probablemente se halla en relación con el hecho de que en tales animales se ha mantenido mejor la refractariedad tras la oclusión coronaria, que en los animales control, ya que como hemos podido comprobar en el capítulo de Resultados, el valor de dicho parámetro no se modificó significativamente respecto al que tenía previamente a la oclusión coronaria; lo que no ocurrió en los controles, en los cuales tras la oclusión coronaria se evidenció una disminución de la refractariedad.

La razón por la cual se ha mantenido el valor de la refractariedad en los corazones sometidos a oclusión arterial coronaria y tratados con EIPA, probablemente se podría relacionar, al menos en parte, con el hecho de que los mecanismos que producen las alteraciones subsiguientes a la activación del

NHE durante la isquemia y no solamente durante la reperfusión, puedan haber operado sobre el sustrato morfofuncional sobre el que se asienta la refractariedad.

Otros autores han investigado el efecto de la inhibición del NHE sobre determinados parámetros electrofisiológicos, entre los que está la refractariedad. Así Duff et al. (1.991) relataron un aumento de la refractariedad en la zona fronteriza ubicada entre el miocardio infartado y el sano, en perros sometidos a oclusión arterial coronaria y tratados con amiloride. Dichos autores atribuyeron el incremento de la refractariedad al hecho de que al inhibir el sistema de intercambio sodio-protón, se produciría una disminución del pH intracelular que afectaría a las corrientes repolarizantes del cardiomiocito ventricular, I_{K1} , lo que alargaría tanto la repolarización, como el periodo refractario. No obstante estos mismos autores no encontraron ninguna modificación en animales tratados con EIPA y sometidos a las mismas manipulaciones.

Wirth et al. (2.001), investigaron el efecto de la oclusión arterial seguida de reperfusión en cerdos, sobre las modificaciones del potencial de acción monofásico durante la reperfusión post-isquémica, y hallaron un resultado similar al que nosotros hemos encontrado para la refractariedad, ya que tales

autores observaron que la inhibición del NHE previno el acortamiento del potencial de acción monofásico inducido por la reperfusión.

Es interesante resaltar el hecho de que la protección exhibida mediante la administración de EIPA se ha manifestado durante la fase de oclusión coronaria. La mayor parte de estudios analiza la protección miocárdica en modelos en los que tras la oclusión arterial se produce la reperfusión, y durante la misma se analiza una serie de parámetros como son los diversos tipos de arritmias, la hemodinámica, la aparición de aturdimiento miocárdico, etc.; pero en nuestro modelo de isquemia sin reperfusión, también ha exhibido un efecto protector.

Otros autores también observaron efectos protectores del EIPA, a nivel de la producción de arritmias, durante el periodo de oclusión coronaria, en corazón de conejo *in situ* (Scholz et al., 1.992). Maron (1.989), citado por Scholz et al. (1.992) observó que la caída de las concentraciones de ATP en corazones aislados y sometidos a isquemia, se atenuaba por la administración de otro derivado del amiloride, el metil-isobutil-amiloride (MIA).

En trabajos de investigación más recientes se implica a procesos que tienen lugar durante la isquemia, y que son modificados por el uso de

inhibidores del NHE, con el efecto protector de tales inhibidores. Nos referimos al mantenimiento del gradiente de protones mitocondrial, de los niveles de ATP mitocondrial, y al retraso de la acidificación de la matriz mitocondrial (Ruiz-Meana et al., 2.003).

La interpretación dada a los efectos protectores de la inhibición del NHE, ha sido la de que durante la isquemia se produce una sobrecarga celular de sodio, como consecuencia de la activación del NHE, y que debido a los deplecionados niveles celulares de ATP, la extrusión de Na⁺ a través de la bomba de sodio-potasio, no puede producirse, con lo que el aumento intracelular de Na⁺ empeora la expulsión de calcio, a través de la bomba de Na⁺/Ca²⁺, quien, más aún, como consecuencia de esta situación comienza a funcionar en forma reversa, expulsando sodio e intercambiándolo con calcio, lo que aumentará más la concentración de calcio intracelular y las consecuencias deletéreas que ello conlleva (Lazdunski et al., 1.985, Frelin et al., 1.985 y Pierce et al., 1.990). Ahora bien, el aumento extracelular de la concentración de protones que se produce, va a inhibir al NHE. Solamente con la reperusión y la disminución de la concentración extracelular de protones (efecto de lavado), se volverá a activar el NHE y con ello la sobrecarga de calcio. Por tanto parece ser que en la fase de isquemia no operan significativamente estos mecanismos.

No obstante se ha hipotetizado que durante la isquemia la inhibición del NHE operaría facilitando el efecto protector de la acidosis sobre el mantenimiento de los niveles de ATP, y disminuyendo la actividad de la bomba de sodio-potasio, ahorrándose este sustrato de alto nivel energético.

4.3.2. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas: Efectos sobre la refractariedad.

En el presente estudio también hemos investigado los efectos intrínsecos de la inhibición del NHE por el EIPA sobre la refractariedad miocárdica, las características de la fibrilación ventricular producida por estimulación a frecuencias crecientes, y el automatismo, conducción sinoauricular, auriculoventricular y ventriculoauricular, bajo condiciones normóxicas.

A la vista de los resultados obtenidos, la inhibición del NHE no parece influir sobre la refractariedad ventricular. Respecto a este parámetro y en nuestras condiciones experimentales (corazón aislado y normoxia) pocos son los estudios que han sido realizados.

De entre las primeras observaciones cabe destacar el incremento de la duración del potencial de acción de las células de Purkinje producido por el amiloride, pero usando dicha sustancia a concentraciones suprafarmacológicas (Marchese et al., 1.985).

En investigaciones clínicas se ha observado que la administración de amiloride a pacientes con taquicardia ventricular sostenida produce un ligero incremento en el periodo refractario funcional ventricular (Duff et al., 1.989). Otros autores en investigaciones de carácter experimental han relatado modificaciones en la refractariedad o en el potencial de acción, solamente en el miocardio dañado. De hecho, y como ya hemos apuntado en líneas anteriores, Duff et al. (1.991) describieron una prolongación de la refractariedad en la zona *border* en miocardio isquémico de perro tras la oclusión-reperfusión de la arteria coronaria.

También ha sido señalado previamente que el inhibidor del NHE-1, cariporide, previene el acortamiento del potencial de acción monofásico producido por la perfusión que sigue a la isquemia coronaria en cerdos. Cuando dicha sustancia se administró a concentraciones que podríamos considerar suprafarmacológicas, algunos autores observaron alargamiento de la

duración del potencial de acción en las células del nodo sinoauricular (Sato y Hashimoto, 1.986).

Para algunos autores la disminución en la duración de las arritmias derivadas de la reperfusión, observadas en corazones tratados con amiloride durante la reperfusión, podría ser atribuida a los efectos electrofisiológicos directos de dicha sustancia (Mochizuki et al., 1.993), lo que implica una ausencia de efecto sobre las propiedades ligadas a la aparición de arritmias, tales como la refractariedad, a través de la inhibición del NHE.

El mantenimiento de la refractariedad ventricular en condiciones de normoxia contrasta con el mantenimiento de dicho parámetro en el miocardio sometido a oclusión coronaria, ya que en este segundo caso, tal y conforme ha ocurrido en los controles, los periodos refractarios han disminuido con la isquemia, situación en la cual, el mantenimiento de la refractariedad miocárdica reviste unas características muy diferentes. Sin embargo, e insistiendo una vez más, en los animales tratados con EIPA y a los que se les ocluyó la arteria coronaria, no ha habido una modificación significativa de dicho parámetro; es decir, la inhibición del NHE mediante EIPA operó de algún modo, directo o indirecto, sobre los mecanismos sobre los que se asienta tal parámetro. Sin embargo, en el caso del miocardio aislado y normalmente perfundido

(normoxia) ningún mecanismo implicado en la propiedad de la refractariedad parece modificarse tras la administración de EIPA.

Nuestros resultados respecto a la refractariedad ventricular en situación de normal perfusión miocárdica, junto con los obtenidos en situación de isquemia revisten un especial interés, ya que se adaptan a la idea asentada por diferentes autores que indican la ausencia de efectos electrofisiológicos tras la administración de EIPA en los tejidos no sometidos a isquemia. Ello a su vez se asienta sobre la idea de que el intercambiador sodio-protón no tiene un papel electrofisiológico significativo en situación normal, y solamente se manifiesta su efecto cuando se produce una disminución muy acusada del pH intracelular, lo cual sucede en circunstancias fisiopatológicas como es el caso de la isquemia miocárdica, lo que, como recordaremos, ha sido apuntado en el inicio de nuestro trabajo, y donde se responsabilizaba a otros sistemas de transporte como más implicados en el mantenimiento de la concentración de hidrogeniones en los tejidos que se hallan en circunstancias fisiológicas.

Respecto a la refractariedad auricular, cabe decir que EIPA no ha modificado los periodos refractarios, efectivo y funcional, con ninguna de las concentraciones administradas. Lo mismo podemos afirmar respecto a la refractariedad del sistema de conducción AV, con la sola excepción del periodo

refractorio efectivo de este sistema cuando se ha tratado al corazón con EIPA 1 μ M. La refractariedad del sistema de conducción AV no ha podido medirse en muchos casos por la siguiente razón: como es sabido para determinar el periodo refractorio efectivo del sistema de conducción AV, se requiere realizar el test del extraestímulo auricular, y así hemos procedido nosotros. No obstante, en casi todos los casos hemos alcanzado con el test mencionado, el periodo refractorio auricular antes que el del sistema de conducción, con lo cual no cabe, obviamente, continuar el test citado para la determinación de la refractariedad AV.

4.3.3. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas sobre el patrón fibrilatorio ventricular.

En el presente estudio también se han investigado los efectos directos del EIPA en la fibrilación ventricular, basándose en el análisis espectral, para evaluar los cambios de dicho parámetro electrofisiológico bajo condiciones normóxicas. La transformación desde el dominio del tiempo a la frecuencia dominante es llevada a cabo mediante la transformada de Fourier, que nos permite examinar la señal energética como una función de la frecuencia.

Distintos autores han aplicado el análisis de la frecuencia dominante como un parámetro más de los estudios cardiacos electrofisiológicos (Chorro et al., 2.000, Ropella, 2.001). Por otra parte, hemos mencionado previamente que la frecuencia dominante y las frecuencias medianas son predictivas del éxito de los choques eléctricos en humanos. Como ya relatamos en la Introducción, Strohmer et al. (1.997), encontraron una correlación entre el valor de la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular y el éxito de la desfibrilación y del posterior curso del paciente. Como comentan estos autores, el hecho de que en recientes años, varios estudios han encontrado que el análisis de la fibrilación ventricular mediante la transformada rápida de Fourier, en general y la frecuencia mediana, en particular, sean un reflejo del flujo sanguíneo miocárdico durante la resucitación cardiopulmonar y del éxito de la cardioversión, ha sido decisivo para la realización de ensayos de sustancias presumiblemente protectoras.

La densidad del espectro de potencia de la fibrilación ventricular, permanece constante durante bastantes minutos siempre que la perfusión coronaria se mantenga; ahora bien, la parada cardiaca crea una situación de ischemia progresiva y por lo tanto una disminución de ATP y de fosfágenos, una alteración de la excitabilidad de la membrana, trastornos iónicos, como la

sobrecarga intracelular de calcio y a nivel electrocardiográfico ocurre una disminución de la frecuencia fibrilatoria, todo lo cual se acompaña, asimismo, de una probabilidad aumentada de que tras la cardioversión se produzca una disociación electromecánica. Contrariamente, mantener la perfusión miocárdica evita la caída de la frecuencia fibrilatoria y simultáneamente aumenta la probabilidad de una desfibrilación eficaz. Strohmenger et al. (1.997), en concordancia con otros autores, hallaron en pacientes una gran probabilidad de evolución favorable después de la desfibrilación cuando los valores de la frecuencia dominante y de la mediana se mantenían.

La frecuencia dominante de la fibrilación ventricular está relacionada con las propiedades electrofisiológicas miocárdicas y de ahí que, la ausencia de cambios en este parámetro es un buen marcador de la falta de modificaciones electrofisiológicas, y en nuestro modelo experimental, analizar la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular en circunstancias de normal perfusión miocárdica y su posible modificación por fármacos, es analizar una propiedad electrofisiológica más del miocardio ventricular como lo es la refractariedad (Chorro et al., 2.000).

De la misma manera que en el caso de la refractariedad, la inhibición del NHE con EIPA no modificó la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular bajo condiciones normóxicas.

4.3.4. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas sobre el automatismo sinusal y la conducción auriculoventricular.

Como hemos visto en el capítulo de Resultados, la administración de EIPA ejerció un ligero pero significativo efecto cronotrópico negativo. Dicho efecto solamente se ha manifestado por un aumento de la longitud del ciclo sinusal; es decir, ha habido una ligera disminución de la frecuencia cardiaca y solamente en los corazones tratados con EIPA 0.4 μ M. Por otra parte, el TRNS corregido, que es el otro parámetro de automatismo investigado por nosotros, no ha sufrido modificación significativa alguna en los animales tratados con EIPA 0.4 μ M, pese a que el TRNS no corregido se modificó significativamente en ambos grupos, aunque sí aumentó en los corazones tratados con la concentración mayor de EIPA.

Previas investigaciones, han descrito también un efecto cronotrópico negativo, para el caso del amiloride, sustancia de la que el EIPA es un derivado. Gran parte de las investigaciones a este respecto han sido ya comentadas en el capítulo de Introducción. Así Yamashita et al. (1.981), en experimentos realizados en preparaciones del nodo sinoauricular de perro, encontró que la administración de amiloride a través de la arteria que irriga el nodo sinusal, produjo un efecto depresor del automatismo, no antagonizado por la atropina, y administrando el amiloride a una concentración de 0.2 μ moles/ml; estos autores atribuyeron el efecto cronotrópico negativo del amiloride, administrado a dosis suprafarmacológicas, a la prolongación de la duración del potencial de acción, como así ocurre con la bradicardia que producen sustancias como la amiodarona (Goupil et al., 1.976).

Asimismo, como ya se apuntó previamente, Satoh et al. (1.986), en una preparación de nodo sinoauricular de perro, halló un efecto cronotrópico negativo tras la administración de amiloride (4.4×10^{-4} - 1.3×10^{-2} mol/l).

Otros autores también han relatado un efecto cronotrópico negativo para el amiloride, administrado a una concentración 100 μ M a corazones aislados de rata. Al contrario de los anteriores estudios, existen otras investigaciones en las

que la administración de amiloride a humanos, y a perros a los que se les provocó oclusión coronaria aguda, a concentraciones menores que en las anteriores investigaciones consideradas suprafarmacológicas, y a las cuales el amiloride exhibe un efecto antiarrítmico, no se mencionó ninguna modificación de la frecuencia cardíaca (Duff et al., 1.988 y 1.989).

Diversos estudios experimentales en preparaciones *in vivo* han sido publicados, en los que la administración de EIPA no exhibió modificaciones en el automatismo sinusal. Así Duff et al. (1.991) administrando EIPA a perros, mediante infusiones que llegaron a alcanzar una concentración cercana a 0.3 μM , no describió ninguna modificación de frecuencia cardíaca. Yasutake et al. (1.994) utilizando una amplia gama de concentraciones de EIPA (0.01, 0.1, 1 y 10 μM), relataron una ligera disminución de la frecuencia cardíaca a las concentraciones 1 y 10 μM .

La administración de EIPA 1 μM en algunos estudios *in vitro* no modificó la frecuencia cardíaca (Bugge et al., 1.995). No obstante lo anterior, Scholz et al. (1.992) encontraron que tras la administración de EIPA 10 μM , a corazones aislados de rata sometidos a isquemia y posterior reperfusión, sí que hubo una disminución significativa de la frecuencia cardíaca durante la isquemia.

La mayor parte de trabajos realizados usando los inhibidores más específicos recientemente sintetizados, no relatan ninguna modificación sobre el cronotropismo sinusal. Así, destacan los trabajos realizados con el HOE-642 o cariporide, administrado a cerdos a los que se les provocó oclusión coronaria seguida de reperfusión, en los cuales dicho inhibidor no modificó la frecuencia cardiaca a lo largo del experimento, ni respecto a la de los animales control (Wirth et al., 2.001).

La administración de HOE-694 en corazones de rata aislados, no modificó la frecuencia cardiaca (Yasutake et al., 1.994), y la administración de HOE-694 y de HOE-642, en un modelo de corazón aislado de rata, no modificó la frecuencia cardiaca respecto al control (Gazmuri et al., 2.001).

Con la administración de zoniporide, inhibidor altamente específico del NHE y previamente mencionado, a corazones de conejo tanto *in vivo* como aislados, no se observó cambios en la frecuencia cardiaca respecto al grupo control, administrando una concentración de 0.05 nM de zoniporide. Dosis mayores, si bien disminuyeron ligeramente la frecuencia cardiaca respecto a control, tal disminución no alcanzó significación estadística (Knight et al. 2.001).

No obstante lo anterior, en un trabajo llevado a cabo por Banno et al. (1.999) en los que se administraron los inhibidores MS-31-038, MS-31-050 e IMGGM a ratas anestesiadas y sometidas a isquemia y reperfusión, solamente hallaron una disminución significativa de la frecuencia cardiaca en los animales tratados con MS-31-050, y además ésta fue una disminución transitoria. La ligera disminución de la frecuencia cardiaca hallada para los otros dos inhibidores, no alcanzó significación estadística.

Pese a las anteriores observaciones, la mayor parte de estudios efectuados con más específicos y más recientemente sintetizados inhibidores del NHE no encontraron efectos cronotrópicos o dromotrópicos negativos (Gazmuri et al., 2.001, Knight et al., 2.001, Wirth et al., 2.001, Yasutake et al., 1.994).

Desconocemos las razones por las cuales la administración de EIPA ha ejercido un ligero efecto cronotrópico negativo, a la concentración 0.4 μ M, que está en el rango de las concentraciones que se postulan como IC₅₀ para el NHE. Cabe pensar que puede estar relacionado con la posibilidad de que conserve parte del efecto del amiloride, del cual como hemos indicado repetidas veces, el EIPA es un derivado. Nos referimos al efecto sobre la supresión de las corrientes lentas de entrada I_{si} de calcio y de sodio en el nodo sinoauricular como demostraron Satoh et al. (1.986), usando técnicas de fijación de voltaje.

Si bien la concentración de EIPA usada por nosotros queda muy por debajo de las concentraciones que interfieren con otros mecanismos como son el intercambio de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (IC_{50} 129 μM ; Kleyman y Cragoe, 1.988) o los canales de sodio voltaje dependientes (IC_{50} 10 μM ; Gold y Strichartz, 1.991), pensamos la posibilidad como antes hemos apuntado de que, aunque en mucha menor medida, pueda afectarse el cronotropismo sinusal ligeramente.

No obstante, el hecho de que algunos investigadores no hallaran ninguna modificación sobre el cronotropismo administrando EIPA en experimentos realizados *in vivo*, y nosotros sí la halláramos en experimentos *in vitro* tal y como hemos comentado en líneas anteriores, nos plantea la posibilidad de que tal vez la inhibición del NHE pueda, de alguna manera, afectar directa o indirectamente al cronotropismo sinusal, máxime cuando como acabamos de ver en determinados casos, sí que ha sido observada alguna modificación de la frecuencia cardiaca, tras la administración de ciertos inhibidores recientemente usados y de gran especificidad.

En este sentido, cabe comentar que nosotros hemos observado que la administración de un inhibidor llamado halocina H7, considerado como un inhibidor específico irreversible del NHE, también exhibe efectos cronotrópicos

negativos (Such et al., 1.998). La halocina H7 es una bacteriocina producida por una halobacteria halófila extrema, capaz de inhibir específicamente el NHE localizado en la membrana celular de las halobacterias (Meseguer et al., 1.995). Recientemente se ha observado por otros investigadores (O'Connor et al., observaciones aún no publicadas) que la halocina H7 inhibe el intercambiador Na^+/H^+ en células de mamífero.

Respecto a los efectos producidos por el EIPA, sobre la conducción auriculoventricular, como hemos podido ver en el capítulo de Resultados, dicha sustancia ha modificado significativamente los parámetros de conducción, esto es: intervalo A-V, LCW y LCWr. Estos parámetros aumentaron ligeramente pero de una manera significativa tras la administración de EIPA. Diversos autores han investigado los efectos del amiloride, administrado a concentraciones consideradas suprafarmacológicas, sobre la conducción en preparaciones de nodo auriculoventricular aislado, habiendo observado un efecto depresor sobre dicho sistema (Yamashita et al., 1.981). Duff et al. (1.991), administrando EIPA a concentraciones cercanas a $0.3 \mu\text{M}$ a perros, no relataron ninguna modificación en la conducción AV. Bugge e Ytrehus (1.995), tampoco relataron ninguna modificación en la conducción AV al administrar EIPA a corazones aislados de rata en los que se pretendía ver el efecto protector de dicho fármaco sobre la isquemia regional y reperfusión. Otros autores, usando

inhibidores más específicos del NHE, tales como HOE 694, HOE 642 (Scholz et al., 1.993), SM-20550 (Hotta et al., 2.001), EMD-85131 (Gumina et al., 1.998), MS-31-038 (Banno et al., 1.999) y zoniporide (Knight et al., 2.001), con el fin de evidenciar sus efectos protectores sobre el miocardio isquémico y reperfundido, no han relatado efecto ninguno sobre el sistema de conducción auriculoventricular.

Como contraste a las observaciones realizadas anteriormente, hay que decir que Yasutake et al. (1.994), sí que hallaron una modificación del intervalo P-R, y por tanto de la conducción auriculoventricular en corazones aislados de rata, a los que se les administró EIPA a una concentración de 10 μ M, que es una concentración muy superior a la usada por nosotros en el presente estudio.

Los mecanismos por los cuales la administración de EIPA 0.4 μ M ha deprimido la conducción auriculoventricular, en el presente estudio, podrían ser:

1) Por una parte, que el EIPA actuara sobre algún mecanismo en el sistema de conducción AV como los que ejerce el amiloride, sustancia de la cual como hemos dicho repetidas veces, el EIPA es un derivado. Como hemos descrito anteriormente, Satoh et al. (1.986) apuntaron que el amiloride

suprimió la corriente de entrada lenta I_{si} y la corriente de salida I_k , sin alterar el *steady-state* de inactivación de I_{si} y la activación de I_k ; también la corriente de entrada activada por la hiperpolarización (I_h) fue reducida. El hecho de que tales corrientes también se hallen presentes en el nodo AV (Irishawa et al., 1.990), nos permite sospechar que el mecanismo dromotrópico negativo del amiloride, observado por Yamashita et al. (1.981) puede estar relacionado también con los mecanismos citados. El EIPA es un inhibidor más específico del NHE que el amiloride, y por otra parte, las concentraciones usadas por nosotros son menores que las usadas por los autores anteriormente citados pero también, y del mismo modo que comentábamos para explicar el efecto cronotrópico negativo, si el EIPA conservara la posibilidad de operar sobre los mecanismos en los que opera el amiloride, aunque sea en menor medida, podría deprimir también la conducción AV tanto en sentido ortodrómico como retrógrado.

2) Por otra parte, y también como dijimos para explicar los efectos cronotrópicos negativos del EIPA cabe pensar en la posibilidad, altamente improbable desde nuestro punto de vista, de que la inhibición del NHE, pueda estar relacionada directa o indirectamente, con la ligera depresión de la conducción AV observada por nosotros.

4.3.5. Efectos electrofisiológicos producidos por la inhibición del NHE en condiciones normóxicas sobre el flujo coronario.

En cuanto a las modificaciones hemodinámicas a nivel del flujo sanguíneo coronario producidas por el EIPA, éstas no alcanzaron nivel de significación estadística, y la tendencia que se observa cuando el flujo coronario se expresa en ml/minuto, nosotros la atribuimos no a un efecto directo del EIPA, sino más bien al hecho de que al disminuir la frecuencia cardíaca, disminuyen también las demandas de oxígeno por el miocardio, y por tanto el flujo coronario, ya que como sabemos, estos parámetros se hallan estrechamente relacionados.

5. CONCLUSIONES

1) La inhibición del sistema de intercambio Na^+/H^+ con EIPA $0,4 \mu\text{M}$, en corazón aislado de conejo y sometido a isquemia regional ha ejercido un efecto protector sobre el miocardio isquémico, manifestado por la menor facilidad para el desencadenamiento de la fibrilación ventricular.

2) Este efecto protector, probablemente está relacionado, al menos en parte, con el mantenimiento de la refractariedad ventricular en el miocardio isquémico producido por la administración de EIPA.

La inhibición del sistema de intercambio Na^+/H^+ con EIPA $0,4 \mu\text{M}$ y $1 \mu\text{M}$ en el miocardio perfundido y en condiciones de normal oxigenación:

3) No modifica la refractariedad auricular ni la ventricular intrínsecas.

4) No modifica tampoco las características de la fibrilación ventricular inducida, en el dominio de la frecuencia.

5) Deprime ligeramente el cronotropismo sinusal y la conducción auriculoventricular intrínsecos, si bien pensamos que estos podrían ser efectos secundarios, relacionados con la capacidad depresora del automatismo sinusal y la conducción auriculoventricular que ejerce el amiloride, del cual deriva el EIPA.

Como conclusión final, podemos decir que el hecho de que la inhibición del sistema de intercambio Na^+/H^+ con EIPA, manifieste efectos electrofisiológicos antiarrítmicos intrínsecos sobre el miocardio isquémico como ha sido impedir la caída de la refractariedad que ocurrió en los controles, y no ejerza ninguna modificación electrofisiológica sobre las propiedades ligadas a la aparición de arritmias por re-entrada, en condiciones de normal oxigenación, como la refractariedad y la frecuencia dominante de la fibrilación ventricular, coincide con lo relatado por diversos investigadores acerca del escaso, sino nulo, papel del sistema de intercambio objeto de estudio en situación fisiológica, y su gran importancia en circunstancias fisiopatológicas, como la isquemia.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abildskov J.A. Additions to the wavelet hypothesis of cardiac fibrillation. J Cardiovasc Electrophysiol. 1.994; 5: 553-559.

Aguinaga L., Mont L., Anguera I., Valentino M., Matas M., Brugada J. Pacientes con cardiopatía estructural, síncope de etiología desconocida y arritmias ventriculares inducibles tratados con desfibrilador implantable. Rev Esp Cardiol. 1.998; 51: 566-571.

Aihara K., Hisa H., Sato T., Yoneyama F., Sasamori Y., Yamaguchi F., Yoneyama S., Mizuno Y., Takahashi A., Nagai A., Kimura T., Cogí K., Satoh S. Cardioprotective effect of TY-12533, a novel Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on ischemia/reperfusion injury. Eur. J. Pharmacol. 2.000; 404: 221–229.

Allessie M.A., Konings K., Kirchhof C.J.H.J., Wijffels M. Electrophysiologic mechanisms of perpetuation of atrial fibrillation. Am J Cardiol. 1.996; 77: 10A-23A.

Avkiran M., Curtis M. J. Independent dual perfusion of left and right coronary arteries in isolated rat hearts. Am. J. Physiol. 1.991; 261: H2082-H2090.

Avkiran M., Haworth R. Regulation of cardiac sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger activity by endogenous ligands. Relevance to ischemia. Ann. N. Acad. Sci. 1.999; 335-345.

Avkiran M., Ibuki C. Reperfusion-induced arrhythmias. A role for washout of extracellular protons? Circulation Research. 1.992; 71: 1429-1440.

Ayoub I.M., Kolarova J., Yi Z., Trevedi A., Deshmukh H., Lubell D.L., Franz M.R., Maldonado F.A., Gazmuri R.J. Sodium-Hydrogen Exchange Inhibition During Ventricular Fibrillation. Circulation. 2.003; 1804-1809.

Banno H., Fujiwara J., Hosoya J., Kitamori T., Mori H., Yamashita H., Ikeda F. Effects of MS-31-038, a novel Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on the myocardial infarct size in rats after postischemic administration. Arzneim.-Forsch./Drug Res. 1.999; 49(I): 304-310.

Blanco A., Alberola A., Chorro F.J., Salvador R., Laiglesia N., Such L.M., Such L. Modificaciones intrínsecas del automatismo y conducción miocárdicas debidas a la inhibición del intercambiador

Na⁺/H⁺ por 5 (N-etil-N-isopropil) amiloride. (Abs.). 3er Congreso de la Federación Española de Sociedades de Biología Experimental (FESBE). 2.000.

Braunwald E., Tratado de cardiología. 1. Edición 5ª; McGraw-Hill Interamericana. 1.999; 24: 709-710.

Brugada J., Boersma L., Kirchhof C., Brugada P., Havenith M., Wellens H.J.J., Allessie M. Double-wave reentry as a mechanism of acceleration of ventricular tachycardia. Circulation 1.990; 81: 1633-1643.

Buerke M., Rupprecht H., Vom Dahl J., Terres W., Seyfarth M., Schultheiss H., Richardt G., Sheehan F., Drexler H. Sodium – Hydrogen exchange inhibition: novel strategy to prevent myocardial injury following ischemia and reperfusion. Am. J. Cardiol. 1.999; 83: 19G-22G.

Bugge E., Ytrehus K. Inhibiton of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart – a protective additive to ischaemic preconditioning. Cardiovasc. Res. 1.995; 29: 269-274.

Cabo C., Pertsov A.M., Baxter W.T., Davidenko J.M., Gray R.A., Jalife J. Wave-front curvature as a cause of slow conduction and block in isolated cardiac muscle. Circ Res. 1.994; 75: 1014-1028.

Cánoves J. Estudio experimental de la relación existente entre la longitud de onda del proceso de activación miocárdico y las características espectrales de la fibrilación ventricular. Tesis. 2.001; 20-21.

Carlisle E.J.F., Allen J.D., Kernohan G., Leahey W., Adgey A.A.J. Pharmacological analysis of established ventricular fibrillation. Br J Pharmacol. 1.990; 100: 530-534.

Cha Y.M., Birgersdotter-Green U., Wolf P.L., Peters B.B., Chen P.S. The mechanism of termination of reentrant activity in ventricular fibrillation. Circ Res. 1.994; 74: 495-506.

Chorro F.J., Cánoves J., Guerrero J., Mainar L., Sanchis J., Such L., López-Merino V. Alteration of ventricular fibrillation by flecainide, verapamil and sotalol. An experimental study. Circulation. 2.000; 101: 1606-1615.

Chorro F.J., Guerrero J., Cánoves J., Martínez-Sober M., Mainar L., Sanchis J., Calpe J., Llavador E., Espi J., López-Merino V. Quantification of the modifications in the dominant frequency of ventricular fibrillation under conditions of ischemia and reperfusion: An experimental study. Pacing Clin Electrophysiol. 1.998; 21: 1716-1723.

Chorro F.J., Sánchez-Muñoz J.J., Sanchis J., Cortina J., Bataller M., Guerrero J., Espi J., Ruiperez J.A., López-Merino V. Modifications in the evolution of the dominant frequency in ventricular fibrillation induced by amiodarone, diltiazem, and flecainide. J Electrocardiol. 1.996; 29: 319-326.

Clusin W.T., Buchbinder M., Ellis A.K., Kernoff R.S., Giacomini J.C., Harrison D.C. Reduction of ischemic repolarization by the calcium channel blocker diltiazem. Circ. Res. 1.984; 54: 10-20.

Davidenko J.M., Pertsov A.V., Salomonsz J.R., Baxter W., Jalife J. Stationary and drifting spiral waves of excitation in isolated cardiac muscle. Nature. 1.992; 355: 349-351.

Dillon S.M., Allessie M.A., Ursell P.C., Wit A.L. Influences of anisotropic tissue structure on reentrant circuits in the epicardial border zone of subacute canine infarcts. Circ Res. 1.988; 63: 182-206.

Dolz M., O'Connor J. E., Lequerica J. L. Flow cytometric kinetic assay of the activity of Na⁺/H⁺ antiporter in mammalian cells. Cytometry. 2.004; 61 A (2): 99-104.

Duan J., Karmazyn M. Protective effects of amiloride on the ischemic reperfused rat heart. Relation to mitochondrial function. European Journal of Pharmacology. 1.992; 210: 149-157.

Duff H. J. Clinical and *in vivo* antiarrhythmic potencial of sodium-hydrogen exchange inhibitors. Cardiovascular Research. 1.995; 29: 189-193.

Duff H.J., Brown E., Cragoe E.J., Rahmberg M. Antiarrhythmic Activity of Amiloride. Mechanisms. Journal of Cardiovascular Pharmacology. 1.991; 17: 879-888.

Duff H.J., Lester W.M., Rahmberg M. Antiarrhythmic and electrophysiological activity in the dog. *Circulation*. 1.988; 78: 1469-77.

Duff H.J., Mitchell L.B., Kavanagh K.M., Manyari D.E., Gillis A.M., Wyse D.G. Amiloride. Antiarrhythmic and electrophysiologic actions in patients with inducible sustained ventricular tachycardia. *Circulation*. 1.989; 79: 1257- 63.

Efimov I.R., Sidorov V., Cheng Y., Wollenzier B. Evidence of three-dimensional scroll waves with ribbon-shaped filament as a mechanism of ventricular tachycardia in the isolated rabbit heart. *J Cardiovasc Electrophysiol*. 1.999; 10: 1452-1462.

Fliegel L., Murtazina R., Dibrov P., Harris C., Moor A., Fernández-Rachubinski F. Regulation and characterization of the Na⁺/H⁺ exchanger. *Biochem. Cell. Biol*. 1.998; 76: 735-741.

Frelin C., Vigne P., Lazdunski M. The role of Na⁺-H⁺ exchange system in the regulation of the internal pH in cultured cardiac cells. *Eur J Biochem*. 1.985; 149: 1-4.

García-Dorado D., González M., Barrabés J., Ruiz-Meana M., Solares J., Lidon R., Blanco J., Puigfel Y., Piper H.M., Soler-Soler J. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange Cardiovascular Research. 1.997; 35: 80-89.

Gazmuri R.J., Ayoub I.M., Hoffner E., Kolarova J.D. Successful Ventricular Defibrillation by the Selective Sodium-Hydrogen Exchanger Isoform-1 Inhibitor Cariporide. Circulation. 2.001; 104: 234-239.

Gazmuri R.J., Ayoub I.M., Kolarova J.D., Karmazyn M. Myocardial protection during VF by inhibition of the sodium-hydrogen exchanger isoform-1. Crit Care Med. 2.002; 30 (4): S166-S171.

Gazmuri R.J., Ayoub I.M., Shidrokt A.S. Ventricular fibrillation waveform analysis for guiding the time for electrical defibrillation. Crit Care Med. 2.001; 29 (12): 2395-2397.

Gazmuri R.J., Berkowitz M., Cajigas H. Myocardial effects of ventricular fibrillation in the isolated rat heart. Crit Care Med. 1.999; 27: 1542-1550.

Gazmuri R.J., Deshmukh S., Shah P. R. Myocardial effects of repeated electrical defibrillation in the isolated fibrillating rat heart. Crit Care Med. 2.000; 28: 2690-2696.

Gazmuri R.J., Hoffner E., Kalcheim J., Ho H., Patel M., Ayoub I.M., Epstein M., Kingston S., Han Y. Myocardial protection during ventricular fibrillation by reduction of proton-driven sarcolemnal sodium infux. J Lab Clin Med. 2.001; 137: 43-45.

Goupil N., Lenfant J. The effects of amiodarona on the sinus node activity of the rabbit heart. Eur. J. Pharmacol. 1.976; 39: 23-31.

Gray R.A. What exactly are optically recorded "Action potentials"? J Cardiovasc Electrophysiol. 1.999; 10: 1463-1465.

Gray R., Jalife J., Panfilov A., Baxter W.T., Cabo C., Davidenko J.M., Pertsov A.M. Mechanisms of cardiac fibrillation. Science. 1.995; 270: 1222-1223.

Gray R.A., Pertsov A.M., Jalife J. Spatial and temporal organization during cardiac fibrillation. Nature. 1.998; 392: 75-78.

Gumina R.J., Daemmgen J., Gross G.J. Inhibition of the Na⁺/H⁺ exchanger attenuates phase 1b ischemic arrhythmias and reperfusion-induced ventricular fibrillation. Eur J Pharmacol. 2.000; 396: 119-124.

Gumina R.J., Mizumura T., Beier N., Schelling P., Schultz J. G.J. Gross. A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dogs when administered before or after coronary artery occlusion. JPET. 1.998; 286: 175-183.

Gursahani, H.I. y Schaefer. Acidification reduces mitochondrial calcium uptake in rat cardiac mitochondria. Am. J. Physiol. 2004; 287: H2659-H2665.

Hillsley R.E., Wharton J.M., Cates A.W., Wolf PD, Ideker RE. Why do some patients have high defibrillation thresholds at defibrillation implantation? PACE. 1.994; 17: 222-39.

Hotta Y., Nakagawa J., Ishikawa N., Wakida Y., Ando H., Takeya K., Ohashi N., Matsui K. Protective effect of SM-20550, a selective

Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on ischemia-reperfusion-injured hearts. J. Cardiovasc. Pharmacol. 2001; 37(2): 143-154.

Humphreys R.A., Haist J.V., Chakrabarti S., Feng Q., Arnold M.O., Karmazyn M. Orally administered NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion. Am. J. Physiol. 1999; 276: H749-H757.

Imahashi K., Hashimoto K., Yamaguchi H., Nishimura T., Kusuoka H. Alteration of intracellular Na⁺ during ischemia in diabetic rat hearts: the role of reduced activity in Na⁺/H⁺ exchange against stunning. J Mol Cell Cardiol. 1998; 30: 509-17.

Irishawa H., Giles W.R. Sinus and atrioventricular cells: Cellular electrophysiology. In Zipes, D.P., Jalife J. (eds): Cardiac Electrophysiology. From Cell to Bedside. Philadelphia, W. B. Saunders Company. 1990; 95.

Ito, Y., Imai, S., Ui, G., Nakano, M., Imai, K., Kamiyama, H., Naganuma, Matsui, K., Ohashi, N., y Nagai, R. A Na⁺-H exchange inhibitor SM-

20550 protects from microvascular deterioration and myocardial injury after reperfusion . Eur. J. Pharmacol. 1.999; 374: 355–366.

Jung O., Albus U., Lang H.J., Busch A.E., Linz W. Effects of acute and chronic treatment with the sodium hydrogen exchanger 1 (NHE-1) inhibitor cariporide on myocardial infarct mass in rabbits with hypercholesterolaemia. Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2.004; 95: 24-30.

Karmazyn M. Ischemic and reperfusion injury in the heart. Cellular mechanisms and pharmacological interventions. Can. J. Physiol. Pharmacol. 1.991; 69: 719-730.

Karmazyn M., Gan X. T., Humphreys R. A., Yoshida H., Kusumoto K. The myocardial Na⁺/H⁺ exchange. Structure, regulation and its role in heart disease. Circ. Res. 1.999; 85: 777-786.

Kleyman T. R., Cragoe E. J. Jr. Amiloride and its Analogs as Tools in the Study of Ion Transport. J. Membrane Biol. 1.998; 105: 1-21.

Knight D., Smith A., Flynn D., Macandrew J., Ellery S., Kong J., Marala R., Wester R., Guzman-Pérez A., Hill R., Magee W., R. Tracey. A novel sodium-hydrogen exchanger isoform-1 inhibitor, Zoniporide, reduces ischemic myocardial injury in vitro and in vivo. J. Pharm. Exp. Ther. 2.001; 297: 254-259.

Kolarova J., Ayoub I. M., Yi Z., Gazmuri R. J. Optimal timing for electrical defibrillation after prolonged untreated ventricular fibrillation. Crit Care Med. 2.003; 31: 2022-2028.

Kwan Y.Y., Fan W., Hough D., Lee J.J., Fishbein M.C., Karagueuzian H.S., Chen P.S. Effects of procainamide on wave-front dynamics during ventricular fibrillation in open-chest dogs. Circulation. 1.998; 97: 1828-1836.

Lacroix J., Poët M., Maehrel C., Counillon L. A mechanism for the activation of the Na/H exchanger NHE-1 by cytoplasmic acidification and mitogens. EMBO reports 5. 2.004; 1: 91–96.

Lagadic-Gossmann, D., Buckler, K.J., and Vaughan-Jones, R.D. Role of bicarbonate in pH recovery from intracellular acidosis in the guinea-pig ventricular myocyte. *J. Physiol.(London)*. 1.992; 458: 361-384.

Lazdunski M., Frelin C., Vigne P. The sodium-hydrogen exchange system in cardiac cells:its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol*. 1.985; 17: 1029-1042.

Lee J.J., Kamjoo K., Hough D., Hwang C., Fan W., Fishbein M.C., Bonometti C., Ikeda T., Karagueuzian H.S., Chen PS. Reentrant wave fronts in Wiggers' stage II ventricular fibrillation. Characteristics and mechanisms of termination and spontaneous regeneration. *Circ Res*. 1.996; 78: 660-675.

Lucchesi P. A., Berk B. C. Regulation of sodium-hydrogen exchange in vascular smooth muscle. *Cardiovascular Res*. 1.995; 29: 172-177.

Madrid A.H., Cinca J., Moro C. Registro nacional de desfibriladores automáticos implantables en 1996. *Rev Esp Cardiol*. 1.998; 51: 349-355.

Manning, A.S., Hearse D.J. Reperfusion induced arrhythmias. Mechanisms and prevention. J.Moll.Cell.Cardiol. 1.984;16:497-518.

Marchese A. C., Hill J. A., Xie P. D., Strauss H. C. Electrophysiologic effects of amiloride in canine Purkinje fibers: evidence for a delayed effect on repolarization. J Pharmacol Exp Ther. 1.985; 232:485-91.

Marn-Pernat A., Weil M.H., Tang W. Optimizing timing of ventricular fibrillation. Crit Care Med. 2.001; 29: 2360-2365.

Martin G., Cosín J., Such M., Hernandez A, Llamas P. Relation between power spectrum time course during ventricular fibrillation and electromechanical dissociation: effects on coronary perfusion and nifedipine. Eur. Heart J. 1.986; 7: 560-69.

Meng H., Maddaford T. G., Pierce G.N. Effect of amiloride and selected analogues on postischemic recovery of cardiac contractile function. Am. J. Physiol. 1.993; 264: H1831-H1835.

Meseguer I., Torreblanca M., Konishi T. Specific Inhibition of the Halobacterial Na⁺/H⁺ Antiporter by Halocin H6. J. Biol. Chem. 1.995; 270: 6450-6454.

Miyamae M., Camacho SA., Weiner M.W., and Figueredo VM. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of (Ca²⁺)_m overload in rats Am. J. Physiol.1996; 271: H2145-H2153.

Mochizuki S., Seki S., Ejima M., Onodera T., Taniguchi M., Ishikawa S. Na⁺/H⁺ exchanger and reperfusion-induced ventricular arrhythmias in isolated perfused heart: possible role of amiloride. Mol. Cell Biochem. 1.993; 119: 151-157.

Moe G.K. On the multiple wavelet hypothesis of atrial fibrillation. Arch Int Pharmacodyn Ther. 1.962; 140: 183-188.

Moe G.K., Harris S., Wiggers C.J. Analysis of the initiation of fibrillation by electrocardiographic studies. Am J Physiol. 1.941; 134: 473-487.

Mosca S.M., Cingolani H.E. Comparison of the protective effects of ischemic preconditioning and the Na⁺/H⁺ exchanger blockade. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2.000; 362: 7-13.

Narula O.S., Shanta N., Vásquez M., Town W. D., Linhart J. W. A new method for measurement of sinoatrial conduction time. Circulation. 1.978; 58: 706-714.

Neumar R.W., Brown C.G., Robitaille P.M., Altschuld R.A. Myocardial high energy phosphate metabolism during ventricular fibrillation with total circulatory arrest. Resuscitation. 1.990; 19: 199-226.

Orlowski J. Na⁺/H⁺ Exchangers. Molecular Diversity and Relevance to Heart. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1.999; 874: 346-353.

Park C., Xiao X., Allen D. G. Changes in intracellular Na⁺ and pH in rat heart during ischemia: role of Na⁺/H⁺ exchanger. Am. J. Physiol. 1.999; 276: H1581- H1590.

Perchenet L., Rochetaing A., Gallois Y., Kreher P. Electrophysiological approach of the role of Na⁺/H⁺ exchange in low-flow global ischemia

and in ischemic preconditioning. *Can. J. Pharmacol.* 1.997; 75: 120-127.

Pertsov A.M., Davidenko J.M., Salomonsz R., Baxter W.T., Jalife J. Spiral waves of excitation underlie reentrant activity in isolated cardiac muscle. *Circ Res.* 1.993; 72: 631-650.

Pierce G.N., Maddaford T.G., Kroegere E.A., Cragoe E.J. Protection by benzamil against dysfunction and damage in rat myocardium after calcium depletion and repletion. *Am. J. Physiol.* 1.990; 258: H17-H23.

Rabkin D. G., Cabreriza S. E., La Corte J. C., Weinberg A. D., Coku L., Walsh R., Mosca R., Spotnitz H. M. Sodium-hydrogen exchange inhibition preserves ventricular function after ventricular fibrillation in the intact swine heart. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery.* 2.003; 125: 1499-1509.

Rodríguez Font E., Viñolas Prat X. Muerte súbita (III). Causas de muerte súbita. Problemas a la hora de establecer y clasificar los tipos de muerte. *Rev Esp Cardiol.* 1.999; 52: 1004-1014.

Rogers J.M., Huang J., Smith W.M., Ideker R.E. Incidence, evolution, and spatial distribution of functional reentry during ventricular fibrillation in pigs. Circ Res. 1.999; 84: 945-954.

Ropella K.M. Frequency domain analysis of endocardial signals. Ann. Ist. Super. Sanità. 2.001; 3: 351-359.

Roskopf D., Düsing R., Siffert W. Membrane sodium-proton exchange and primary hypertension. Hypertension. 1.993; 21: 607-617.

Ruiz-Meana M., Garcia-Dorado D., Pina P., Inserte J., Agullo L., Soler-Soler J. Cariporide preserves mitochondrial proton gradient and delays ATP depletion in cardiomyocytes during ischemic conditions. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2.003; 285: H999-1006.

Sanjuán R., Morell S., Samper J., García-Civera R., Ruiz R., Muñoz J., Botella S., López Merino V. Incidencia y significado de los potenciales tardíos en pacientes con muerte súbita abortada. Rev Esp Cardiol. 1.994; 47: 157-164.

Satoh H., Hashimoto K. An electrophysiological study of amiloride on sinoatrial node cells and ventricular muscle of rabbit and dog. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 1.986; 333: 83-90.

Schäfer C.Y., Ladilov V., Schäfer M., Piper H.M. Inhibition of NHE protects reoxygenated cardiomyocytes independently of anoxic Ca²⁺ overload and acidosis . Am J Physiol. 2.000; 279: H2143-H2150.

Scholz W., Albus U., Lang H. J., Linz W., Martorana P. A., Englert H. C., Schölkens B. A. HOE 694, a new Na⁺/H⁺ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. Br. J. Pharmacol. 1.993; 109: 562-568.

Scholz W., Albus U., Linz W., Martorana P. A., Lang H.J., Schölkens B. A. Effects of Na⁺/H⁺ Exchange Inhibitors in Cardiac Ischemia. J Mol Cell Cardiol. 1.992; 24, 731-740.

Scholz W., Albus U., Counillon L., Gögelein H., Lang H. J., Linz W., Weichert A., Schölkens B. A. Protective effects of HOE642, aselective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. Cardiovascular Research. 1.995; 29: 260-268.

Siffert W. Regulation of platelet function by sodium-hydrogen exchange. Cardiovascular Res. 1.995; 29: 160-166.

Stewart A.J., Allen J.D., Devine A.B., Adgey A.A.J. Effects of blockade of fast and slow inward current channels on ventricular fibrillation in the pig heart. Heart. 1.996; 76: 513-519.

Strohmenher H.-U., Lindner K.H., Brown C.G. Analysis of the ventricular fibrillation ECG signal amplitude and frequency parameters as predictors of countershock success in humans. CHEST. 1.997; 111: 584-89.

Such L., Chorro F. J., Colom F., Alba I., Secaduras A., Such L. M., Meseguer I., Soria B., Alberola A. Effects of halocyn H7 on A-V nodal conduction and heart rate in isolated rabbit heart. J. Physiol (London). 1.998; 509.P: 148P-149P.

Such L., Rodríguez A., Alberola A., López L., Ruiz R., Artal L., Pons I., Pons M.L., García C., Chorro F.J. Intrinsic changes on automatism, conduction, end refractoriness by exercise in isolated rabbit heart. J. Appl. Physiol. 2.002; 92: 225-229.

Swartz J.F., Jones J.L., Fletcher R.D. Characterization of ventricular fibrillation based on monophasic action potential morphology in the human heart. *Circulation*. 1.993; 87: 1907-1914.

Thérroux P. Protection of the myocardial cell during ischemia. *Am. J. Cardiol*. 1.999; 83: 3G-9G.

Toda H., Noguchi T., Miyagishi A., Ito N., Umekawa K., Sato Y., Kitano M., Ohashi N. Cardioprotection of SM-15681, an Na⁺/H⁺ exchange inhibitor in ischemic and hypoxic isolated perfused rat hearts. *Int J Tissue React*. 1.999; 21: 61-70.

Van Emous J. G., Schreur J. H. M., Ruigrok T. J. C., Van Echteld C. J. A. Both Na⁺/K⁺ ATPase and Na⁺/H⁺ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J. Moll. Cell Cardiol*. 1.998; 30: 337-348.

Vigne P., Frelin C., Cragoe E. J., Lazdunski M. Ethylisopropyl-amiloride: a new and highly potent derivative of amiloride for inhibition of the Na⁺/H⁺ exchange system in various cell types. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 1.983; 116(1): 86-90.

Wang L., Cherednichenko G., Hernández L., Halow J., Camacho S.a., Figueredo V., and Schaefer S. Preconditioning limits mitochondrial Ca⁺⁺ during ischemia in rat hearts: role of K_{ATP} channels Am. J. Physiol;2001; 280:H2321-H2328.

Weaver W.D., Cobb L. A., Dennis D., Ray R., Hallstrom A.P., Copass M.K. Annals of internal medicine. 1.985; 102: 53-55.

Weiss J.N., Garfinkel A., Karagueuzian H.S., Qu Z., Chen P.S. Chaos and the transition to ventricular fibrillation. A new approach to antiarrhythmic drug evaluation. Circulation. 1.999; 99: 2819-2826.

Wirth K. J., Maier T., Busch A. E. NHE1-inhibitor cariporide prevents the transient reperfusion-induced shortening of the monophasic action potential after coronary ischemia in pigs. Basic. Res. Cardiol. 2.001; 96: 192-197.

Witkowski F.X., Leon L.J., Penkoske P.A., Giles W.R., Spano M.L., Ditto W.L., Winfree A.T. Spatiotemporal evolution of ventricular fibrillation. Nature. 1.998; 392: 78-82.

Xue V. X., Aye N. N., Hashimoto K. Antiarrhythmic effects of HOE 642, a novel Na(+)-H(+) exchange inhibitor, on ventricular arrhythmias in animal hearts. Eur. J. Pharmacol. 1.996; 317: 309-316.

Yamada, K., Matsui, K., Satoh, K., Kitano, M., y Yamamoto, S. y Ohashi, N. Reduction of myocardial infarct size by SM-20550, a novel Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, in rabbits. Eur. J. Pharmacol. 2.000; 404 :201–212.

Yamashita S., Motomura S., Taria N. Cardiac effects of amiloride in the dog. J. Cardiovasc. Pharmacol. 1.981; 3: 704-715.

Yano K., Maruyama T., Makino N., Matsui H., Yanaga T. Effects of amiloride on the mechanical, electrical and biochemical aspects of ischemia reperfusion injury. Molecular and Cellular Biochemistry. 1.993; 121: 75-83.

Yasutake M., Ibuki C., Hearse D. J., Avkiran M. Na⁺/H⁺ exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. Am. J. Physiol. 1.994; 267 Heart Circ. Physiol. 36: H2430-H2440.

Yoshizumi M., Kitagawa T., Horike K., Ogawa Y., Suzuki Y., Tamaki T., Katoh I. Effect of amiloride on Ischaemia and Reperfusion Injury in Isolated, Perfused Rat Hearts. Scand Cardiovasc J. 1.998; 32: 167-172.

Yun C. H., Tse C. M., Nath S., Levine S. L., Donowitz M. Structure / function studies of mammalian Na-H exchangers: an update. J. Physiol. 1.995; 482. P: 1S-6S.

Zhou X., Ideker R.E., Blitchington T.F., Smith W.M., Knisley S.B. Optical transmembrane potential measurements during defibrillation-strength shocks in perfused rabbit hearts. Circ Res. 1.995; 77: 593-602.

Zhu B.M., Miyamoto S., Kamiya K., Komori S., Hashimoto K. Inhibitory effects of pre-ischemic and post-ischemic treatment with FR 168888, a Na⁺/H⁺ exchange inhibitor, on reperfusion-induced ventricular arrhythmias in anesthetized rat. Jpn J Pharmacol. 2.002; Jan 88(1):93-99.

Zipes D.P. Electrophysiological mechanisms involved in ventricular fibrillation. Circulation. 1.975; 52: 120-30.