



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Medicina

EFFECTO DE FRECUENCIAS CARDIACAS
SUPRAFISIOLÓGICAS EN EL MIOCARDIO SOMETIDO
A ISQUEMIAS DE DISTINTA DURACIÓN.

TESIS DOCTORAL
JOSE LUIS DIEZ GIL
Valencia, 2012



VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA

VNIVERSITAT ID VALÈNCIA  Facultat de Medicina i Odontologia

Departamento de Medicina
Programa Doctorado MEDICINA
Código 260 S

**Efecto de frecuencias cardiacas suprafiológicas en el
miocardio sometido a isquemias de distinta duración**

Memoria presentada por **José Luis Díez Gil** para optar al grado
de Doctor en Medicina y Cirugía por la Universitat de València.
Valencia 2012.

Fdo. José Luis Díez Gil

Dirigida por los Dres.

Juan Cosín Aguilar y Amparo Hernández Martínez.

Tutor: Dr. Juan Sanchís Forés

Fdo Dr. J. Cosín Fdo. Dra. A. Hernández Fdo. Dr. J. Sanchís

Dr. Juan Cosín Aguilar,

Jefe de la Unidad de Investigación Cardiovascular del Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia (hasta 2008).

Dra. Amparo Hernández Martínez,

Facultativo Especialista de la Unidad de Investigación Cardiovascular del Centro de Investigación del Hospital "La Fe" de Valencia.

CERTIFICAN:

Que bajo su dirección, D. JOSÉ LUIS DÍEZ GIL, con grado de Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado el trabajo titulado:

" EFECTO DE FRECUENCIAS CARDIACAS SUPRAFISIOLÓGICAS EN EL MIOCARDIO SOMETIDO A ISQUEMIAS DE DISTINTA DURACIÓN "

para poder optar al Grado de Doctor en Medicina y Cirugía. Y para que conste a efectos legales firman la presente en Valencia a 13 de octubre del año dos mil doce.

Fdo Dr. J. Cosín

Fdo. Dra. A. Hernández

Agradecimientos

A los Dres. Juan Cosín Aguilar y Amparo Hernández Martínez a quienes debo no solo la idea de este trabajo, sino también haberme permitido trabajar en su laboratorio y prestarme su incondicional apoyo en la elaboración de este documento, así como sus ideas para mejorarlo y por iniciarme en el fascinante mundo de la cardiología experimental.

Al Dr. Juan Sanchís Forés por su importante labor de tutorización en la elaboración de la presente Tesis Doctoral.

Al Dr. Manuel Portolés Sanz y su equipo, por su colaboración para realizar las pruebas bioquímicas que se han incluido en este trabajo.

A los Dres. Jose Luis Diago Torrent y Adolfo Rincón de Arellano, Jefes de los Servicios de Cardiología donde he realizado mi actividad asistencial estos años, por su apoyo durante el tiempo que ha durado la realización de esta tesis.

Y, sobre todo, a mi mujer, la Dra. Elena González Biosca, por sus sabios consejos basados en su amplia experiencia investigadora. Su ejemplo en la perseverancia ha sido el motivo principal que ha permitido que esta Tesis se finalizara.

A Elena, Elena jr. y Adrián

A mis padres

Índice de abreviaturas

Capítulo 1. INTRODUCCIÓN.....	1
1. Datos epidemiológicos.....	2
2. Isquemia miocárdica aguda.....	4
2.1. Determinantes del consumo miocárdico de oxígeno.....	6
2.2. Regulación del flujo coronario.....	7
2.3. Efectos sobre la contractilidad.....	9
2.4. Efectos sobre el metabolismo.....	10
2.5. Lesión miocárdica por isquemia-reperusión.....	14
3. Aturdimiento miocárdico.	
3.1. Definición.....	17
3.2. Antecedentes.....	18
3.3. Mecanismos del aturdimiento miocárdico.....	23
3.3.1. Hipótesis oxiradical.....	24
3.3.2. Hipótesis del calcio.....	26
3.4. Evidencias clínicas del aturdimiento miocárdico.....	28
4. Consecuencias funcionales y metabólicas de la taquicardia	32
4.1. Antecedentes.....	33
4.2. Efecto de la taquicardia sobre la circulación coronaria.	34
4.3. Efecto de la taquicardia sobre la función miocárdica....	36
4.4. Efectos metabólicos de la taquicardia.....	38

5. Introducción al estrés oxidativo.	
5.1. Antecedentes.....	39
5.2. Terminología y definiciones.....	41
5.2.1. Radicales libres y especies reactivas del oxígeno (EROs).....	41
5.2.2. Bioquímica de las EROs.....	43
5.2.3. Fuentes de EROs.....	45
5.2.3.1. Fuentes endógenas de EROs.....	46
5.2.3.2. Fuentes exógenas de EROs.....	47
5.3. Dianas de las EROs.	
5.3.1. Lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN).....	48
5.3.2. La mitocondria.....	49
5.4. Mecanismos de defensa de la célula contra el estrés oxidativo.....	50
5.5. Métodos para determinar el estrés oxidativo.	
5.5.1. Cuantificación de radicales.....	52
5.5.2. Cuantificación de marcadores de daño oxidativo.	52
5.5.3. Cuantificación de los sistemas de defensa antioxidante.....	53
5.6. Concepto de estrés reductivo.....	55
6. Modelos animales.	
6.1. Modelos animales de isquemia-reperfusión.	
6.1.1. Isquemia regional.....	56
6.1.1.1. Importancia de la circulación colateral.....	57
6.1.1.2. Influencia de las condiciones experimentales.	58
6.1.2. Isquemia global.....	63

6.2. Modelos animales de insuficiencia cardiaca.....	65
6.2.1. Modelos en animales pequeños.....	66
6.2.2. Modelos en animales grandes.....	71
6.3. Medición de la función contráctil del miocardio en experimentación.....	79
6.3.1. Función contráctil regional: sonomicrometría.	79
6.3.2. Técnicas no invasivas de imagen.....	81
Capítulo 2. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS y OBJETIVOS.....	83
Capítulo 3. METODOLOGÍA.....	86
1. Material.	
1.1. Animales de experimentación. Normativa.....	87
1.2. Área de experimentación.....	88
1.3. Material quirúrgico.....	88
1.4. Ventilación mecánica.....	89
1.5. Catéteres y guías.....	90
1.6. Medida del flujo coronario y aórtico.....	90
1.7. Medidores de función regional miocárdica.....	91
1.8. Registro de señales.....	91
1.9. Sistema de electroestimulación.....	91
1.10. Bombas de infusión continua.....	92
1.11. Fármacos y fluidos.....	92
1.12. Eutanasia del animal.....	92

1.13. Estudios bioquímicos.....	93
2. Preparación experimental.	
2.1. Preparación de los animales de experimentación.....	93
2.2. Criterios de exclusión de animales.....	94
2.3. Anestesia.....	95
2.4. Monitorización ECG periférico.....	96
2.5. Esternotomía media.....	97
2.6. Pericardiotomía.....	98
2.7. Disección y oclusión coronaria.....	98
2.8. Implantación de microcristales piezoeléctricos.....	99
2.9. Implantación de las sondas de medición de flujos.....	100
2.10. Medida de la presión intraventricular.....	100
2.11. Fijación del electrocatéter para sobreestimulación...	101
2.12. Calibración de los diversos registros.....	101
2.13. Estimulación ventricular.....	104
2.14. Análisis bioquímico.....	104
3. Metodología experimental.	
3.1. Series.....	107
3.2. Protocolo experimental.....	108
3.2.1. Serie ficticia o <i>sham</i>	108
3.2.2. Serie con estimulación ventricular y sin isquemia.....	108
3.2.3. Series con estimulación ventricular y con isquemia.....	110
3.2.3.1. Isquemia continua de 10 minutos	110

3.2.3.2. Isquemia continua de 20 minutos	110
3.2.3.3. Isquemias breves y repetidas.....	111
4. Parámetros analizados.....	112
4.1. Parámetros de función global.....	113
4.2. Parámetros de función miocárdica regional.....	113
4.3. Parámetros de estrés oxidativo.....	115
5. Análisis estadístico.....	115
Capítulo 4. RESULTADOS.....	118
1. Resultados de función global y regional en cada serie.	
1.1. Serie <i>sham</i>	119
1.1.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.....	119
1.1.2. Parámetros de función regional.	
1.1.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	120
1.1.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	121
1.1.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y la zona dependiente de la CCx.....	122
1.2. Serie con estimulación ventricular y sin isquemia.	124
1.2.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.....	124
1.2.2. Parámetros de función regional.	
1.2.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	126
1.2.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	127

1.2.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y la zona dependiente de la CCx.....	128
1.3. Serie con isquemia de 10 minutos seguida de estimulación.....	130
1.3.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.....	131
1.3.2. Parámetros de función regional.....	134
1.3.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	134
1.3.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	134
1.3.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx.....	138
1.4. Serie con isquemia de 20 minutos seguida de estimulación.....	140
1.4.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.....	141
1.4.2. Parámetros de función regional.....	143
1.4.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	143
1.4.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	145
1.4.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx.....	147
1.5. Serie con 20 isquemias breves y repetidas.....	149
1.5.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.....	150
1.5.2. Parámetros de función regional.....	153
1.5.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	153
1.5.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	153
1.5.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx.....	157

2. Comparación de los resultados de función global y regional entre las series.....	159
2.1. Parámetros hemodinámicos y de función global..	159
2.2. Parámetros de función regional.....	166
2.2.1. Zona dependiente de la CCx.....	166
2.2.2. Zona dependiente de la CDA.....	169
3. Parámetros de estrés oxidativo en cada una de las series.....	171
3.1. Serie <i>sham</i>	171
3.2. Serie con sobreestimulación y sin isquemia.....	173
3.3. Serie con isquemia 10 minutos.....	175
3.4. Serie con isquemia 20 minutos.....	177
3.5. Serie con 20 isquemias breves y repetidas.....	180
4. Comparación de los resultados de estrés oxidativo entre las series.....	182
4.1. Lipoperoxidación (LPO).....	182
4.2. Glutación.....	184
4.2.1. Actividad glutación total (GSH + GSSG).	184
4.2.2. Glutación reducido (GSH).....	185
4.2.3. Glutación oxidado (GSSG).....	186
4.2.4. Cociente GSH/GSSG.....	187
5. Relación entre función y estrés oxidativo.....	188
5.1. Función global y estrés oxidativo.....	188
5.2. Función regional y estrés oxidativo.....	190

Capítulo 5. DISCUSIÓN.....	191
1. Consideraciones metodológicas.....	192
1.1. El modelo animal.....	192
1.2. Consideraciones sobre la preparación del animal. Bloqueo neuromuscular, analgesia y anestesia.	194
1.3. Justificación del protocolo experimental.....	197
1.4. Elección de la zona isquémica y de la zona control.	200
1.5. Elección de la zona de implante del electrodo de sobreestimulación.....	201
1.6. Función contráctil regional. Sonomicrometría.....	202
1.7. Ocluser coronario.....	205
1.8. Protocolo de isquemias.....	206
1.9. La sobreestimulación a frecuencias suprafisiológicas como modelo de aturdimiento miocárdico.....	207
1.10. Peroxidación lipídica y glutatión como marcadores de estrés oxidativo y de defensa antioxidante.....	210
2. Análisis de los parámetros hemodinámicos y de función ventricular global y regional.....	213
2.1. Efectos de la apertura del tórax y exposición del corazón al aire ambiente. Serie <i>sham</i> ..	213
2.2. Efectos de la isquemia y la reperfusión sobre los parámetros de función miocárdica global y regional.	216
2.2.1. Efectos de una isquemia única.....	216
2.2.1.1.- Efectos sobre los parámetros hemodinámicos y de función global.....	216
2.2.1.2. Efectos sobre los parámetros de función regional.....	217

2.2.2. Efectos de isquemias breves y repetidas.....	220
2.2.2.1.- Efectos sobre los parámetros hemodinámicos y de función global.....	220
2.2.2.2. Efectos sobre los parámetros de función regional.....	222
2.3. Efecto de la frecuencia ventricular suprafisiológica sobre la función global y regional.....	224
2.3.1. Serie con sobreestimulación y sin isquemia.	224
2.3.2. Series con isquemia previa.....	225
2.4. Aturdimiento posttaquicardia. Diferencias según el tipo de isquemia previa.....	227
2.4.1. Serie con sobreestimulación y sin isquemia.	227
2.4.2. Series con isquemia.....	229
3. Análisis de la producción de lipo-peróxidos y del poder reductor del plasma.....	234
3.1. Efecto de la apertura del tórax y de la exposición al aire ambiente. Serie <i>sham</i>	234
3.2. Efecto de la isquemia.....	236
3.3. Efecto de la taquicardia.....	239
3.4. Efecto de la secuencia "isquemia seguida de taquicardia".....	240
4. Relación entre función y estrés oxidativo.....	242
Capítulo 6. CONCLUSIONES.....	244
Bibliografía.....	247

Índice de abreviaturas:

% Δ LTD: Porcentaje de cambio de la longitud telediastólica respecto a la inicial .

% Δ LTS: Porcentaje de cambio de la longitud telesistólica respecto a la inicial.

% Δ F. Ac: Porcentaje de cambio de la fracción de acortamiento respecto a la inicial.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNmt: ADN mitocondrial.

AGCL: Ácidos grasos de cadena larga.

AGPs: Ácidos grasos poliinsaturados.

AMP: Adenosinmonofosfato.

AMPK: Proteína cinasa activada por el AMP.

ATP: Adenosintrifosfato.

CaMKII: Calmodulina kinasa II.

CCx: Coronaria circunfleja.

CDA: Coronaria Descendente Anterior.

COX: Ciclooxygenasa.

CTE: Cadena de transporte de electrones.

dP/dt +: Derivada positiva de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo.

dP/dt -: Derivada negativa de la presión del ventrículo izquierdo respecto al tiempo.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

EROs: Especies reactivas del oxígeno.

F. Ac.: Fracción de acortamiento.

F. Ao.: Flujo aórtico (medido en raíz aórtica).
F. C.: Frecuencia cardiaca.
F. Da.: Flujo en la arteria coronaria descendente anterior.
FEVI: Fracción de Eyección del Ventrículo izquierdo.
F. V.: Fibrilación ventricular.
G. C.: Gasto cardiaco.
GPx: Glutación Peroxidasa.
GSH: Glutación reducido.
GSSG: Glutación oxidado.
GSH/GSSG: Actividad antioxidante dependiente del glutación.
Iecas: Inhibidores del enzima convertidor de la angiotensina.
LOX: Lipooxigenasa.
LPO: Lipoperóxidos.
LTD: Longitud telediastólica.
LTS: Longitud telesistólica.
MDA: Malondialdehído.
NADH: Nicotin Adenina dinucleótido en forma reducida.
NOS: Sintetasa del óxido nítrico.
PSVI: Presión sistólica del ventrículo izquierdo.
PTDVI: Presión telediastólica del ventrículo izquierdo.
PVI: Presión ventricular izquierda.
SEA: Sociedad Española de Arteriosclerosis.
SOD: Superóxido dismutasa.
FNT- α : Factor de Necrosis Tumoral alfa.
Vol. lat.: Volumen latido.

INTRODUCCIÓN

1.- Datos epidemiológicos.

Las dos principales enfermedades del sistema circulatorio son la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular o ictus, que en conjunto producen casi el 60% de toda la mortalidad cardiovascular (Villar y cols., 2007) (Figura 1).

Desde el año 1996, la enfermedad isquémica del corazón es la que ocasiona un mayor número de muertes cardiovasculares en España (31% en total, un 39% en varones y 25% en mujeres) (Figuras 1 y 2). En global, este predominio de la enfermedad isquémica del corazón sobre la cerebrovascular se debe al mayor descenso relativo de la mortalidad cerebrovascular respecto de la mortalidad coronaria, invirtiéndose así el llamado patrón mediterráneo de mortalidad cardiovascular, en el que predominaba la enfermedad cerebrovascular. En los varones, este fenómeno se produjo casi diez años antes, en 1987. Por el contrario, en las mujeres todavía prevalece la enfermedad cerebrovascular sobre la enfermedad coronaria como causa de muerte. De toda la enfermedad isquémica del corazón, la rúbrica infarto agudo de miocardio es la más frecuente con un 61% (62% en los varones y 58% en las mujeres).

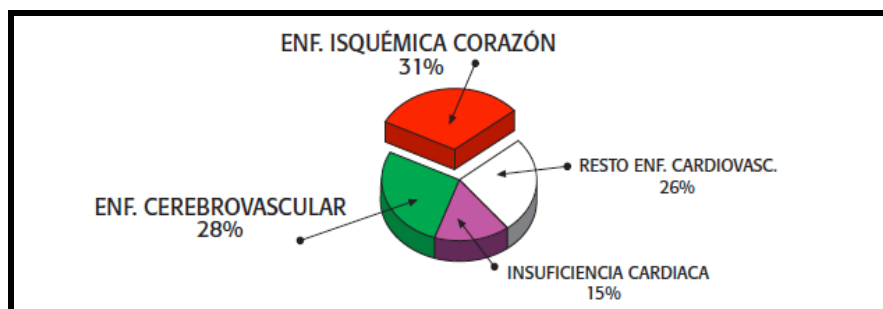


Figura 1. Mortalidad proporcional por las distintas enfermedades del sistema circulatorio en ambos sexos. España, Informe SEA 2007.

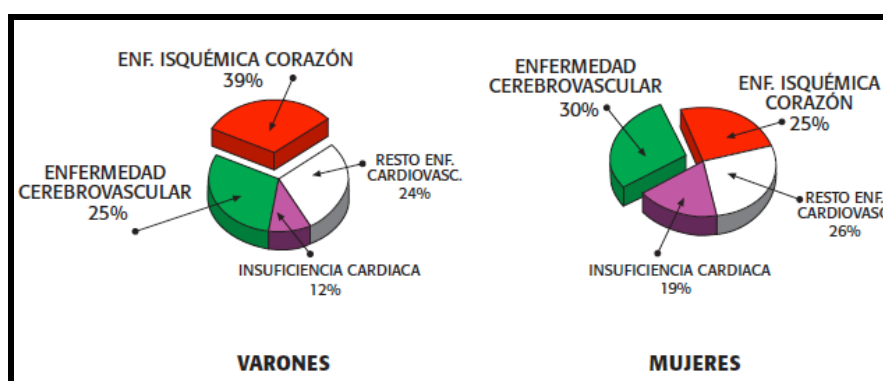


Figura 2. Mortalidad proporcional por las distintas enfermedades del sistema circulatorio en varones y mujeres. España, Informe SEA 2007.

Además, la enfermedad isquémica del corazón y la enfermedad cerebrovascular constituyen la tercera y cuarta causas, respectivamente, de pérdida de años de vida ajustados por discapacidad, que es un indicador útil que mide las pérdidas de salud que representan las consecuencias mortales y no mortales de las enfermedades.

El tercer síndrome importante como causa de muerte cardiovascular es la insuficiencia cardiaca, que ocasiona el 15% de

la mortalidad cardiovascular total (12% en varones y 19% en mujeres) (Figuras 1 y 2). Sin embargo, la mortalidad registrada por insuficiencia cardiaca puede estar subestimada por cuanto es la vía final común de muchas enfermedades que afectan al corazón siendo estas las que quedan reflejadas como causa de la muerte. Como ejemplo, cuando la insuficiencia cardiaca es debida a una cardiopatía isquémica, el proceso de codificación de la causa de defunción es atribuida con frecuencia a esta enfermedad en lugar de a la insuficiencia cardiaca (Villar y cols., 2007).

Por tanto la enfermedad cardiaca isquémica y la insuficiencia cardiaca son dos enfermedades con un impacto grande en nuestra sociedad y el estudio experimental de aspectos de dichas enfermedades aún mantiene gran interés.

2.- Isquemia miocárdica aguda.

La isquemia miocárdica aguda se define, sencillamente, como una reducción del aporte de oxígeno arterial brusco, insuficiente para responder a las demandas metabólicas del tejido cardiaco (Jennings, 1970). Dependiendo de la duración e intensidad de la isquemia, las consecuencias sobre el miocardio, y por tanto, sobre el individuo, son muy distintas (Figura 3).

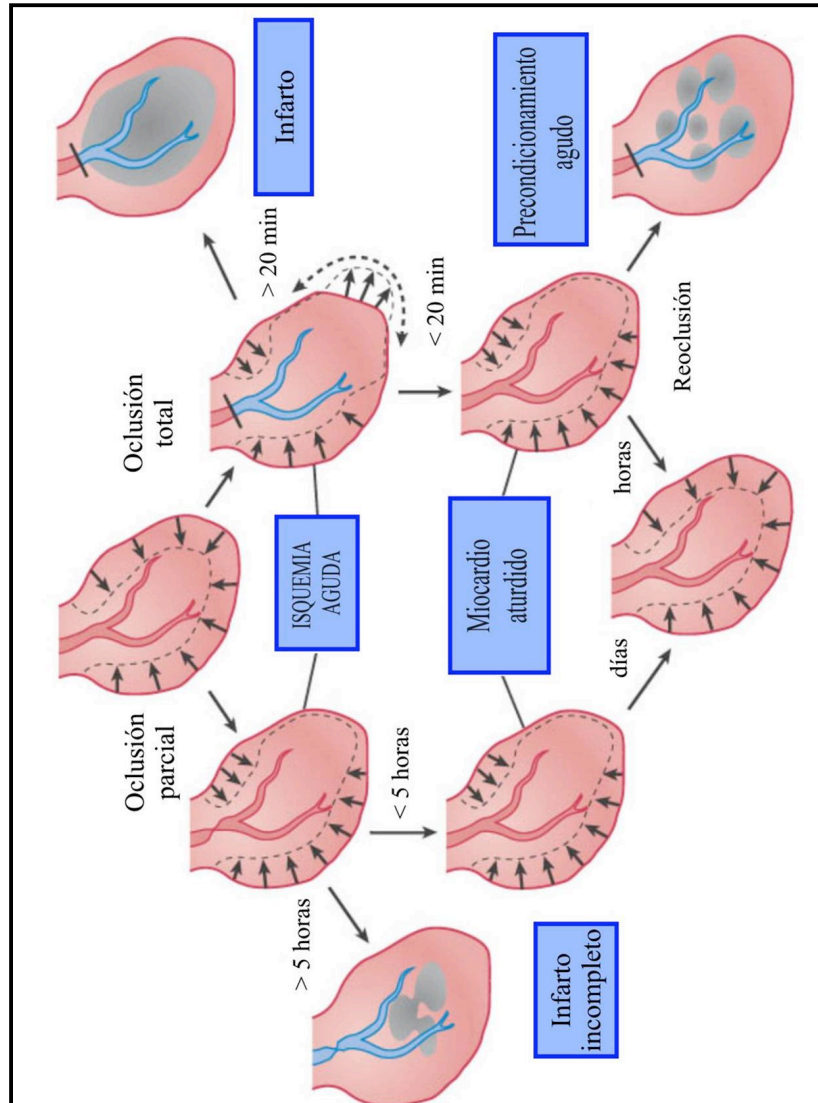


Figura 3.- Consecuencias de la isquemia aguda sobre la contractilidad ventricular regional (modificado de Canty, 2007).

2.1.- Determinantes del consumo miocárdico de oxígeno.

A diferencia de lo que ocurre en otros órganos, la extracción miocárdica de oxígeno es casi máxima en reposo (en promedio, casi el 75% del contenido arterial de oxígeno) (Feigl, 1983). Ello hace que el aumento del consumo miocárdico de oxígeno se deba obtener fundamentalmente por incrementos proporcionales en el flujo coronario.

Los determinantes principales del consumo miocárdico de oxígeno son la frecuencia cardiaca, la presión sistólica (o poscarga o estrés de la pared miocárdica) y la contractilidad intrínseca ventricular (Canty, 2008).

La frecuencia cardiaca elevada tiene influencia sobre el flujo coronario porque se reduce el tiempo diastólico disponible para la perfusión miocárdica. Estudios en perros han demostrado que, en reposo, el flujo coronario puede autorregularse con presiones arteriales medias tan bajas como 40 mmHg (presiones diastólicas de 30 mmHg) (Canty, 1988). Sin embargo, durante una taquicardia, el límite inferior de la presión de autorregulación aumenta debido al incremento de las necesidades de flujo y a la reducción del tiempo de perfusión (Canty y cols., 1990).

La contractilidad miocárdica y el estrés de la pared son difíciles de medir. Diversos autores han demostrado que el consumo de oxígeno por minuto en el corazón es proporcional a un índice de tensión-tiempo por minuto, que corresponde a la presión sistólica media multiplicada por la duración de la sístole y por la frecuencia cardiaca. Por estos motivos, en la práctica clínica habitual se utiliza

el denominado doble producto, resultado de la multiplicación entre la frecuencia cardíaca y la presión sistólica. La medición del doble producto es útil para valorar de una forma objetiva los resultados de los distintos tratamientos sobre el umbral de isquemia (Sarnoff, 1958; Katz, 1960; Braunwald y Kloner, 1982).

La reserva coronaria también se reduce por incrementos en los otros determinantes del consumo miocárdico de oxígeno (presión sistólica y contractilidad). Esto explica que pueda haber isquemia subendocárdica en presencia de coronarias normales (Hoffman 1987) como puede ser el caso de la hipertrofia ventricular izquierda secundaria a estenosis aórtica o hipertensión.

2.2.- Regulación del flujo coronario.

El flujo coronario depende de cuatro variables: la presión de perfusión, el diámetro y tono de las arterias coronarias (resistencia), la frecuencia cardíaca y el flujo por colaterales. Además, existe una autoregulación del flujo coronario mediada por factores metabólicos, dependientes del endotelio, mecánicos, musculares y neurohormonales (Moreu y Macaya, 2007).

Como ya se ha mencionado, el flujo coronario regional permanece constante aunque la presión arterial coronaria se reduzca hasta un límite amplio (límite de autoregulación) mientras los determinantes del consumo miocárdico de oxígeno se mantengan constantes (Canty, 1988). Cuando la presión coronaria cae por debajo del límite de autoregulación, el flujo coronario se hace dependiente de la presión debido a que la vasodilatación de la

microcirculación es máxima. Por tanto, el flujo coronario en el corazón vasodilatado al máximo es presión-dependiente.

La resistencia al flujo coronario depende de tres componentes (Klocke, 1976):

- a) Presencia o no de estrechamientos en las arterias epicárdicas: cuando este estrechamiento es superior al 50%, comienza a contribuir a la resistencia coronaria total y, cuando supera el 90%, puede reducirse el flujo coronario en reposo.
- b) Resistencia de la microcirculación dependiente de las arteriolas. Este componente se extiende por todo el miocardio incluyendo un rango amplio de tamaños de pequeños vasos (20 a 200 μm de diámetro) y se modifica en respuesta a fuerzas físicas (presión intraluminal y estrés de cizallamiento) y a las necesidades metabólicas del tejido cardíaco. Sin embargo, este componente contribuye poco (un 20%) a la resistencia vascular coronaria total (Chilian y cols., 1986).
- c) La resistencia por compresión varía a lo largo del ciclo cardíaco y se relaciona con la contracción cardíaca y la presión sistólica que se desarrolla dentro del ventrículo izquierdo. También en aquellos estados patológicos en que aumenta la presión diastólica se impide la perfusión miocárdica, por medio de la compresión pasiva de la microcirculación (Hoffman y Spaan, 1990).

El flujo coronario es máximo en diástole. En diástole, cuando se cierra la válvula aórtica los senos de Valsalva funcionan como reservorios y permiten la perfusión del miocardio. Con el aumento de la frecuencia cardiaca se reduce el tiempo de llenado diastólico. En caso de que la reserva coronaria esté al límite, una taquicardia puede producir isquemia en el subendocardio (Canty, 2008).

Cuando hay una oclusión total o subtotal de una arteria coronaria, el flujo puede llegar al miocardio por vasos colaterales. En el humano, las colaterales existen en los corazones como canales no funcionales de 20 a 200 μm . Cuando se produce una oclusión coronaria hay una caída en la presión distal a la oclusión que da lugar a la apertura de dichas colaterales (Schaper y cols. 1988). Hay una gran variabilidad entre especies en el número y función de vasos colaterales. Esto hace que la extrapolación de resultados experimentales de modelos animales al humano pueda tener limitaciones.

2.3.- Efectos sobre la contractilidad.

Aunque el médico francés Pierre Chirac ya observó los efectos de la ligadura de las arterias coronarias en un perro en 1698, no hubo demasiado interés en los experimentos sobre isquemia miocárdica hasta finales del siglo XIX. En 1893, W.T. Porter, un fisiólogo americano, publicó que la oclusión de una arteria coronaria no siempre era fatal, tal como se creía hasta entonces y además, mediante un manómetro de Gad, demostró que la ligadura de la arteria descendente anterior producía un descenso gradual y

continuo de la altura de las curvas de presión ventricular (Leibowitz, 1970). Posteriormente, Orias (1932) y otros autores, hace 80 años, confirmaron estos hallazgos. Tennant y Wiggers, en 1935, describieron como el acortamiento sistólico del miocardio isquémico desaparecía tras un minuto de oclusión coronaria, y era sustituido por una distensión pasiva, que retornaba a la normalidad tras restaurar el flujo sanguíneo. Desde entonces numerosos investigadores, incluido nuestro grupo, han observado que, tras la interrupción del flujo coronario, la región isquémica pierde casi inmediatamente su función contráctil, apareciendo en su lugar una protusión o abombamiento sistólico (Prinzmetal y cols., 1949; Tyberg y cols., 1970; Theroux y cols., 1974; Pallarés, 1996).

Una oclusión coronaria produce, como hemos visto, una reducción de la contractilidad miocárdica regional en pocos latidos, que acaba en discinesia del segmento isquémico en el primer minuto. Conforme la contractilidad regional cesa, se produce una disminución de la contractilidad global del V. I. (reflejada en una reducción de la $dp/dt +$), un aumento progresivo de la presión telediastólica del ventrículo izquierdo (PTDVI) y una caída de la presión sistólica. La magnitud de los cambios hemodinámicos varía con la severidad y con la cantidad de miocardio sometido a isquemia (Canty, 2008).

2.4.- Efectos sobre el metabolismo.

La función contráctil del corazón depende primordialmente del suministro de ATP por parte de las mitocondrias. Diversas vías

bioenergéticas interactúan contribuyendo al metabolismo energético mitocondrial como la oxidación del piruvato, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos, la betaoxidación mitocondrial de los ácidos grasos y la vía final común de la fosforilación oxidativa que genera el 80-90% del ATP celular. Los ácidos grasos son el principal sustrato energético para la producción de ATP en el músculo cardíaco a partir de la fosforilación oxidativa. El aporte de ATP a partir de otras fuentes (p. ej., del metabolismo glucolítico) es limitado en el tejido cardíaco normal (Marín-García y Goldentahl, 2002).

La ausencia de oxígeno durante la isquemia provoca la alteración de la cadena respiratoria y, por tanto, se reduce la síntesis de ATP. La capacidad de generar energía por los miocitos (ATP y fosfato de creatina) se reduce hasta el extremo, agotándose las reservas energéticas en poco tiempo (Reimer y Jennings, 1981). Esto ocurre porque durante el metabolismo anaerobio se obtienen un número muy inferior de moléculas de ATP por cada molécula de glucosa, en comparación a las obtenidas en condiciones aerobias. La contracción cesa pronto por la falta de energía (ATP) y por el desplazamiento de los iones de calcio de las miofibrillas por los radicales de hidrógeno generados en la acidosis.

La privación del suministro de oxígeno durante los síndromes agudos coronarios causa una disminución del metabolismo oxidativo de la glucosa y ácidos grasos, y un estímulo significativo de glucólisis (Lopaschuck, 2003). El grado en que estos cambios metabólicos ocurren es dependiente de la severidad del

episodio isquémico. Durante la isquemia severa, la glucólisis puede convertirse en la fuente primaria de ATP. Sin embargo, el piruvato producido por la glucólisis es incapaz de entrar en la vía oxidativa y por consiguiente es convertido a lactato. Este desequilibrio entre la glucólisis y la oxidación de glucosa también induce la producción de protones deletéreos, y es una causa principal de la acidosis intracelular que ocurre durante la isquemia severa. Una consecuencia de esto es que disminuye de eficacia cardíaca ya que el ATP es redirigido a reestablecer la homeostasis iónica en vez de a la función contráctil (Liu y cols., 1996).

La vuelta a la normalidad de la función contráctil después de una isquemia aguda miocárdica requiere que el corazón acelere la producción de energía rápidamente. Sin embargo, esta recuperación también depende del sustrato de energía usado por el corazón. Durante un episodio isquémico, las concentraciones circulantes de ácidos grasos libres aumentan conforme son movilizados los depósitos de triglicéridos del tejido adiposo. La oxidación de los ácidos grasos de cadena larga (AGCL) se recupera rápidamente en cuanto el corazón es expuesto a una concentración elevada en plasma de ácidos grasos. Como resultado de lo anterior, la oxidación de glucosa no se recupera porque los metabolitos de la β oxidación de ácidos grasos inhiben el complejo piruvato-deshidrogenasa, vía el ciclo de Randle (proceso metabólico por el cual la glucosa y los ácidos grasos compiten por sustratos) (Lopaschuk, 1994).

La recuperación rápida de la oxidación de los AGCL también es realizada por la activación de un cinasa llamada proteína-cinasa

activada por el AMP (AMPK). La activación de la AMPK produce la fosforilación de la acetilCoA carboxilasa, una disminución en la concentración del malonil-CoA y un aumento importante de la oxidación de los ácidos grasos (Kudo y cols., 1995). Como consecuencia, la oxidación de glucosa se inhibe aún más. La activación de la AMPK también causa una aceleración de la glucólisis y una estimulación de la captación de glucosa de forma independiente de la insulina (Russell y cols., 1999). Por lo tanto, la activación de la AMPK causa un desacople más pronunciado entre la glucólisis y la oxidación de glucosa (Sambandam y Lopaschuck, 2003). Hasta que el flujo coronario vuelva a la normalidad, el lactato y los protones siguen acumulándose en el cardiomiocito, contribuyendo a una eficacia cardíaca peor durante la reperfusión.

Durante y tras la isquemia puede haber un aumento importante de la concentración intracelular de Na^+ debido a que intercambiador de Na^+/H^+ facilita la salida de los protones intracelulares acumulados y la entrada de Na^+ (Kleber, 1983). La bomba de Na^+/k^+ ATPasa responde al incremento del Na^+ cambiándolo por Ca^{2+} lo cual puede llevar al daño del miocardiocito o a su muerte por sobrecarga de este ión (Grinwald, 1982). De forma irónica, aunque los protones que se acumulan durante el insulto isquémico son dañinos, su rápida eliminación es más perjudicial para el corazón. A este fenómeno se le ha denominado la paradoja del pH (Karmazyn y Moffat, 1993).

Otros factores involucrados en la cascada de la isquemia son los oxirradicales y la endotelina I. Los primeros, metabolitos

altamente reactivos al oxígeno, cuando se acumulan pueden contribuir a la lesión inducida por la reperfusión y la aparición de arritmias (Hearse, 1991). La concentración plasmática de endotelina I aumenta durante los episodios de isquemia, y se sabe que es un potente vasoconstrictor coronario y que aumenta la concentración de calcio citosólico, con lo que contribuye a la muerte celular (Yanasigawa y cols., 1988).

2.5.- Lesión miocárdica por isquemia-reperfusión.

La lesión miocárdica por reperfusión se describió por primera vez en 1960 por Jennings y cols. en su descripción de los hallazgos histológicos del miocardio canino reperfundido. En este trabajo observaron abombamientos celulares, contractura de las miofibrillas, disrupción del sarcolema y la aparición de partículas de fosfato calcico intramitocondrial. El daño al corazón durante la reperfusión del miocardio produce cuatro tipos de alteraciones: la primera es el aturdimiento miocárdico (Braunwald, 1982). El segundo tipo de alteración, el fenómeno de *no-reflow* o de detención del flujo, que se definió originalmente como “la incapacidad de reperfundir una región previamente isquémica” (Kloner, 1993). Este fenómeno hace referencia al incremento de la impedancia del flujo sanguíneo a nivel microvascular cuando se abre la arteria responsable del infarto (Ito, 2006). La tercera alteración son las arritmias por reperfusión, potencialmente dañinas, pero para las que existe tratamiento eficaz (Manning y Hearse, 1984). El último tipo es el daño letal por reperfusión. El concepto de daño letal por

reperfusión como un mediador independiente de la muerte del miocardiocito es un aspecto debatido; algunos investigadores han sugerido que la reperfusión únicamente exacerba la lesión celular que se produjo durante el periodo isquémico (Kloner, 1993).

Por tanto, la lesión por reperfusión se define como el daño miocárdico causado por la restauración del flujo coronario tras un episodio isquémico. Este daño puede culminar con la muerte de los miocardiocitos que eran viables inmediatamente antes de la reperfusión (Piper y cols., 1998). Esta forma de lesión miocárdica, que por si misma puede aumentar el tamaño de un infarto, puede explicar en parte por qué, a pesar de una reperfusión aparentemente óptima, la tasa de muerte en un infarto agudo de miocardio alcanza el 10% y la incidencia de insuficiencia cardíaca tras el infarto el 25%.

El daño por reperfusión ha sido motivo de múltiples investigaciones, habiéndose involucrado diferentes hipótesis entre las que destaca el aumento brusco del aflujo de oxígeno y de calcio (Téllez y cols., 1996). A dichas hipótesis se les ha denominado “paradojas” pues resulta contradictorio que siendo el calcio y el oxígeno esenciales para la contracción del músculo cardíaco y la respiración celular respectivamente, sean dañinos para la célula durante la reperfusión.

- La paradoja del oxígeno.

Se ha establecido a partir de estudios experimentales que la reperfusión del miocardio isquémico desencadena estrés oxidativo,

el cual, por si mismo, puede causar lesión miocárdica (Zweier, 1988). El estrés oxidativo es parte de la paradoja del oxígeno. El estrés oxidativo será objeto de una exposición detallada más adelante.

- La paradoja del calcio.

Cuando se produce la reperfusión miocárdica ocurre un incremento brusco del Ca^{2+} intracelular secundario al daño de la membrana del sarcolema y a la disfunción del retículo sarcoplásmico inducido por el estrés oxidativo. Estas dos formas de lesión sobrecargan a los mecanismos normales de homeostasis del Ca^{2+} en el miocardiocito; a este fenómeno se le denomina paradoja del calcio (Piper, 1998).

- La paradoja del pH.

La restauración rápida del pH fisiológico durante la reperfusión miocárdica que sigue al lavado del lactato acumulado durante la isquemia, y la activación del intercambiador de sodio-hidrógeno y del cotransportador de sodio-bicarbonato contribuyen al daño por reperfusión. A este fenómeno se le denomina paradoja del pH (Lemaster, 1996). Mediante este mecanismo aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} ya que al activarse estos transportadores aumenta el sodio intracelular lo que a su vez estimula al intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ introduciéndose calcio en la célula para extraer el sodio.

- *Inflamación.*

Tras un periodo de isquemia miocárdica, son liberadas sustancias quimiotácticas que atraen a los neutrófilos desencadenándose fenómenos de inflamación a nivel local. Los neutrófilos producen obstrucciones capilares y liberación de enzimas de degradación y especies reactivas del oxígeno (Vinten-Johansen, 2004). Algunos estudios han observado un aumento rápido y sostenido de la producción de interleucina-6 y de su receptor tras un periodo breve de isquemia (Chandrashekhar y cols., 1999). Esta respuesta inflamatoria condiciona un incremento de la permeabilidad capilar, favorece la adhesión plaquetaria y la infiltración de más leucocitos hacia el miocardio, contribuyendo así al daño por reperfusión.

3.- Aturdimiento miocárdico.

3.1.- Definición.

En 1982, Braunwald y Kloner describieron el miocardio aturdido como “la disfunción prolongada post-isquémica del tejido viable rescatado por la reperfusión”. Se requiere, por tanto, un episodio de isquemia transitoria que puede ser debida a una oclusión coronaria, como la que ocurre en el espasmo coronario o en la rotura de una placa coronaria con formación de un trombo, o a una isquemia inducida por un aumento de la demanda miocárdica de oxígeno (como por ejemplo en el ejercicio o por una taquiarritmia ya sea supraventricular o ventricular) en el contexto de estenosis coronarias parciales. Tras la isquemia, persisten durante un tiempo

variable las alteraciones en la contractilidad miocárdica segmentaria a pesar de que la irrigación de esa zona se haya normalizado.

Pero el aturdimiento no es solo un fenómeno regional. Si el corazón sufre una isquemia global, como la que puede ocurrir en cirugía cardíaca durante la circulación extracorpórea, entonces el corazón entero puede presentar una disfunción contráctil que puede persistir tras la restauración de la circulación coronaria fisiológica.

El concepto de aturdimiento conlleva además el de recuperación de la contractilidad. Tras el cese de la isquemia, ya sea por relajación del espasmo, lisis del trombo, cese del ejercicio o de la taquicardia o restauración del flujo tras el *by-pass* cardiopulmonar, el miocardio post-isquémico, pero viable, se recupera, aunque pueden requerirse de horas a días para restablecer la función contráctil normal (Heyndrickx y cols., 1975; Bolli y cols., 1988a). Es este retorno lento de la función contráctil a la normalidad a pesar de un flujo coronario restablecido lo que se ha denominado aturdimiento (Braunwald y Kloner, 1982). El tiempo requerido para la recuperación de la función depende de diversos factores que incluyen la duración y severidad de la isquemia y el adecuado retorno del flujo coronario (Kloner y cols., 1983).

3.2.- Antecedentes.

El hecho de que un tejido lesionado de forma reversible por un episodio de isquemia dejara de contraerse y se mantuviera así un tiempo después de restablecido el flujo sanguíneo (es decir, se aturdiera) se describió por primera vez a mediados de la década de

los 70 por Heyndrickx y cols. (1975, 1978). Estos autores midieron en un modelo animal canino la longitud y grosor regional del miocardio sometido a isquemia por oclusiones coronarias de duración variable pero insuficiente para producir muerte celular (5 y 15 minutos), seguidas de reperfusión. Con una oclusión coronaria de 5 minutos la función regional se mantuvo deprimida a las 2 horas de la reperfusión pero se había recuperado a las 6 horas. Cuando la duración de la isquemia fue de 15 minutos, la función contráctil permaneció reducida más de 6 horas tras la restauración del flujo coronario (Figura 4). Por tanto encontraron una discordancia entre flujo coronario y función. Cuando el flujo era normal o casi normal y la isquemia ya se había resuelto, el miocardio todavía no se contraía con normalidad.

En un estudio posterior en perros anestesiados (Kloner y cols., 1983), analizaron el tiempo que tardaba en normalizarse la función contráctil regional del miocardio tras oclusiones de duración progresiva de la arteria descendente anterior. Se midió la contractilidad de forma periódica durante tres horas tras el inicio de la reperfusión. El grado de recuperación de la función sistólica fue dependiente de la duración de la oclusión. Así, con una oclusión de sólo 1 minuto, las alteraciones de la contractilidad se recuperaron rápidamente y fueron normales a los 30 minutos. Con una oclusión de 5 minutos, la función sistólica se recuperó solo 2/3 a los 30 minutos y continuó deprimida a los 60 minutos. En las series con 15 minutos y 3 horas de oclusión, tras una hora de reperfusión persistía un abombamiento paradójico sistólico (Figura 5). Charlat y cols.

(1989), también en perros, observaron que tras 15 minutos de oclusión coronaria se necesitaban 48 horas de reperfusión para conseguir la recuperación completa de la función sistólica.

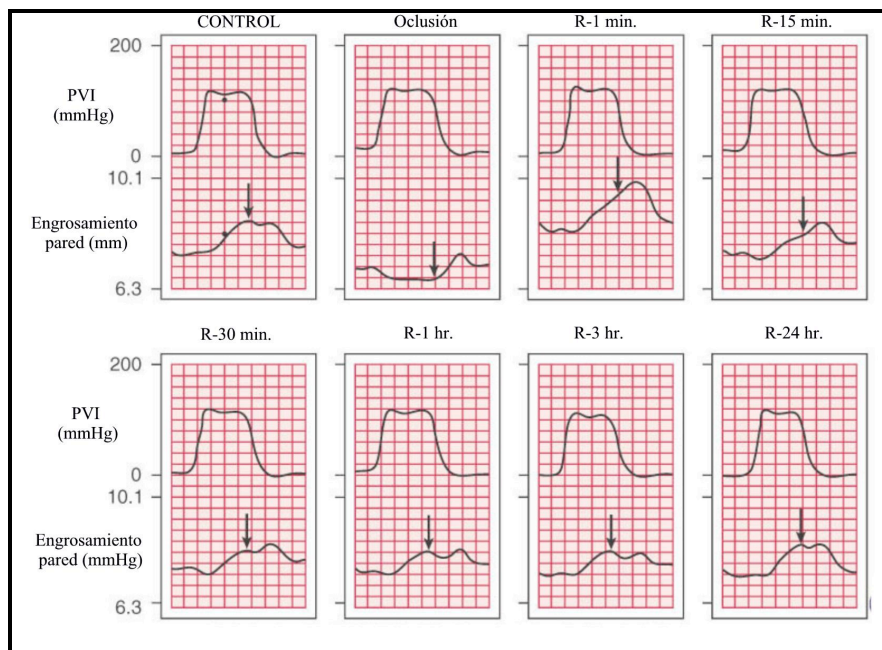


Figura 4.- Aturdimiento miocárdico tras una oclusión coronaria completa y breve. El engrosamiento de pared, medido por cristales ultrasónicos es discinético con adelgazamiento sistólico durante la oclusión. Tras un breve periodo de recuperación inmediato al cese de la oclusión (R-1 min), el engrosamiento se mantiene reducido a los 30 minutos, 1 y 3 horas tras la reperfusión (R). La función es normal a las 24 horas (modificado de Heyndrickx y cols., 1978).

Por lo tanto, se ha demostrado que el tiempo de recuperación funcional de una zona del miocardio sometida a isquemia es directamente proporcional a la duración de la oclusión. Pero también la repetición de episodios isquémicos, aún siendo muy breves, puede tener un efecto acumulativo sobre la intensidad del aturdimiento

miocárdico, siendo Geft y cols. (1982) los primeros en describirlo. Sin embargo, existen diferencias entre los diferentes grupos investigadores que han utilizado modelos de isquemia repetida, en cuanto a la observación o no de ese efecto acumulativo, dependiendo éste fundamentalmente del período de reperfusión entre cada proceso isquémico. Así, en 1985, Nicklas y cols., utilizando un modelo canino, observaron como tras 16 oclusiones sobre la arteria descendente anterior repetidas, de 5 minutos de duración, y con 10 minutos de reperfusión entre ellas, y dejando una hora de recuperación una vez finalizado el protocolo isquémico, se producía un deterioro progresivo de la función sistólica regional de un 20% tras la primera oclusión, de un 82% tras la octava y de un 91% tras la última oclusión, presentando un 104% de afectación tras una hora de recuperación. Zhao y cols (1992), utilizando también un modelo canino en el que realizaron 12 oclusiones sobre la arteria descendente anterior, con el mismo tiempo de isquemia y de reperfusión que los anteriores autores y con 90 min. de recuperación, describieron resultados similares. Por el contrario, Lange y cols. (1984), utilizando episodios de isquemia más prolongados encontraron que tres episodios de isquemia de 15 minutos de duración cada uno separados por intervalos de 30 minutos causaban aturdimiento en la reperfusión pero no hallaron un efecto acumulativo. Los mismos hallazgos obtuvieron Weiner y cols. (1976) tras tres episodios de isquemia de 20 minutos separados por intervalos de 45 minutos de reperfusión.

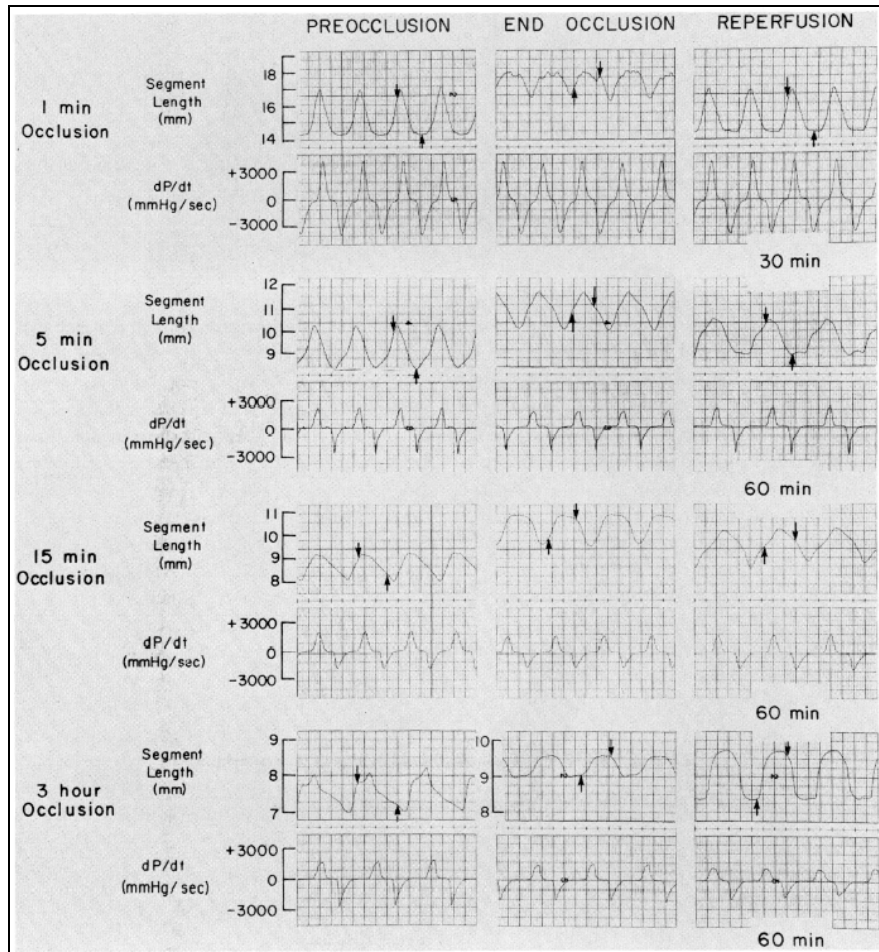


Figura 5.- Registros originales de los trazados de longitud segmentaria y de dP/dt para oclusiones de 1, 5, 15 y 180 minutos. Las flechas indican las longitudes telediastólicas y telesistólicas respectivamente. A los 30 minutos tras la oclusión de 1 minuto la recuperación es completa; a los 60 minutos tras la oclusión de 5 minutos el acortamiento sistólico segmentario está todavía reducido aunque ligeramente; 60 minutos tras la oclusión de 15 minutos el segmento sometido a isquemia todavía es discinético pero mucho menos que durante la oclusión; a los 60 minutos tras la oclusión de 3 horas la discinesia es mayor que tras el cese de la oclusión. Tomado de Kloner y cols. (1983).

Por último, se ha estudiado la influencia del tórax abierto sobre el aturdimiento miocárdico en experimentación animal, hallándose resultados similares en animales con tórax cerrado,

aunque en estos los cambios eran menos marcados (Triana y cols., 1987).

3.3.- Mecanismos del aturdimiento miocárdico.

En términos generales, las anomalías observadas en el fenómeno del aturdimiento miocárdico se rigen por las alteraciones que se producen durante la isquemia y los cambios celulares y extracelulares inducidos por la reperfusión.

Como ya ha sido explicado, la oclusión de una coronaria origina el cese súbito de la perfusión regional lo que conduce rápidamente al cese del metabolismo aeróbico, la depleción de la creatina-fosfato y el comienzo de la glucólisis anaerobia. Lo anterior lleva a la acumulación de lactato y catabolitos y a una reducción progresiva del ATP. Si la isquemia continúa, se desarrolla acidosis tisular y se produce un flujo de salida de potasio al espacio extracelular. Si no acontece la reperfusión, los niveles de ATP siguen disminuyendo por debajo de los requeridos para mantener la función de la membrana celular lo que desencadena el comienzo de la muerte del miocito (Jennings, 1990a). Para que no se produzca la necrosis del miocárdico isquémico es condición necesaria que se restablezca el flujo sanguíneo con la reintroducción de oxígeno y nutrientes. En esta situación, la reperfusión es un proceso beneficioso. Sin embargo, Parks y cols. (1983) demostraron, al principio de la década de los 80, que la reintroducción de oxígeno a un tejido isquémico producía un daño adicional mediado, en parte, por las especies reactivas del oxígeno (EROs). La importancia del

daño por reoxigenación (o reperfusión) depende del tiempo de la isquemia previa de tal manera que, si este tiempo ha sido suficientemente prolongado como para producir necrosis, la lesión por reperfusión tendrá poca relevancia.

3.3.1.- Hipótesis oxiradical.

Se denominan radicales libres a todas aquellas moléculas que tienen un electrón desapareado en su orbital más externo; esta circunstancia les confiere una capacidad de reacción extraordinariamente elevada, por lo que son capaces de actuar en los sistemas biológicos con gran avidez, produciendo cambios en la conformación química o en la estructura de los elementos celulares que los hace incompatibles con la vida (Crystal y Ramón, 1992).

Los resultados de una serie de experimentos de Bolli y cols. (1988b, 1989) demostraron claramente que del 50 al 70% del aturdimiento se debe a la irrupción de radicales libres derivados del O_2 , liberados durante los primeros minutos de la reperfusión. Estos radicales son de vida corta e incluyen el anión superóxido (O_2^-) y el radical oxidrilo o hidroxilo (OH^-). Esto significa que la mayor parte del aturdimiento es una complicación de la reperfusión y, por tanto, es una forma de lesión por reperfusión. El OH^- se forma a partir del anión superóxido mediante reacciones catalizadas por el hierro (reacciones de Haber-Weiss y de Fenton) y reacciona con la fenilalanina para formar derivados hidroxilados. Debido a que estos derivados están presentes en el miocardio aturdido y pueden

detectarse en el flujo coronario efluente, se pudo establecer claramente que el radical -OH se libera durante la reperfusión (Sun y cols., 1993).

Más evidencia experimental de que los radicales libres producen aturdimiento proviene de la demostración de que gran parte del mismo puede prevenirse mediante el tratamiento de los animales con infusión intravenosa de dos enzimas que eliminan radicales libres derivados del O_2 : el enzima superóxido dismutasa (SOD) y la catalasa (Myers y cols., 1985; Przyklenk y Kloner, 1986; Jeroudi y cols., 1990). Sin embargo, estudios en humanos con terapia antioxidante no han conseguido alcanzar los objetivos clínicos deseados. Flaherty y cols. (1994) examinaron el efecto del enzima SOD recombinante humana sobre pacientes que recibieron terapia de reperfusión en la fase aguda del infarto de miocardio. La administración de SOD no mejoró ni el pronóstico de estos pacientes, ni la función regional o global comparada con placebo. Existen distintas razones que podrían explicar por qué la administración de SOD no demostró beneficio. La primera es que un infarto es una agresión al miocardio demasiado severa como para esperar un beneficio de los eliminadores de radicales libres de oxígeno: una zona infartada del miocardio incluye tanto miocitos no viables, y por tanto sin capacidad contráctil, como viables, por lo que no es un modelo puro de aturdimiento miocárdico. La segunda, el enzima SOD no es capaz de atravesar la membrana celular y para demostrar un beneficio haría falta un eliminador de radicales de O_2 más potente, que pudiera cruzar dicha membrana. La tercera es que

el SOD pudo no haberse administrado con la suficiente prontitud. En otros ensayos (HOPE, 2000) se estudió el efecto de otros antioxidantes, como la vitamina E, en pacientes con enfermedad coronaria o factores de riesgo de enfermedad coronaria, siendo los resultados igual de desesperanzadores.

Un análisis más extenso de los mecanismos de estrés oxidativo en la isquemia-reperfusión miocárdica se describe más adelante en esta introducción.

3.3.2.- Hipótesis del calcio.

Esta hipótesis postula que el aturdimiento miocárdico tras uno o varios episodios de isquemia /reperfusión es el resultado de la alteración de la homeostasis celular del calcio. Se han involucrado 3 mecanismos: la sobrecarga de calcio, una reducción de la respuesta de los miofilamentos al calcio por mecanismos relacionados con proteasas y un desacoplamiento de la excitación-contracción debida a una disfunción del retículo sarcoplásmico (Bolli y Marban, 1999).

Los trabajos de la década de los 80 sugirieron que el daño por reperfusión, al menos en su forma irreversible, se relacionaba con la sobrecarga de calcio (Grinwald, 1982). Kusuoka y cols. (1987) determinaron en corazones aislados que la reperfusión con soluciones bajas en calcio atenuaba el aturdimiento lo cual sugirió que la sobrecarga por calcio estaba ligada al aturdimiento. Consistente con este hallazgo, una sobrecarga transitoria de calcio, en ausencia de isquemia, provocaba una secuela funcional duradera idéntica a la observada en el aturdimiento miocárdico (Kitakaze y

cols., 1988). El mecanismo de la sobrecarga de calcio está ligado a la acidosis que se produce durante la isquemia y a la activación de la bomba de Na^+/H^+ tras la reperfusión para extraer de la célula los hidrogeniones acumulados durante la isquemia, con la consiguiente entrada de sodio. Esto produce una activación del intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ introduciéndose calcio en la célula para extraer el sodio. Esta hipótesis se apoya en el hallazgo de que el aturdimiento mejora durante la reperfusión si se perfunde el corazón con una solución con un contenido alto de sodio, lo cual aumentaría el gradiente transmembrana de sodio temporalmente e impediría la entrada de calcio (Kusuoka y cols., 1993). Otros trabajos han permitido medir directamente la cantidad de calcio intracelular comprobándose que este aumenta incluso tras periodos de isquemia tan cortos como 10-15 minutos (Marban y cols., 1990).

Por otro lado, existen diversos trabajos que sugieren que la sobrecarga de calcio influye en la activación de unas proteasas llamadas calpaínas que escindirían proteínas cuando los niveles de calcio estuvieran elevados (Zatz y Starling, 2005). Se ha implicado a la calpaína-1 en la patogénesis del aturdimiento miocárdico por medio de la degradación de proteínas miofibrilares. Sin embargo sus proteínas diana siguen siendo objeto de estudio habiéndose propuesto la titina, la desmina, la alfa-actinina y las troponinas c e I (Barta y cols., 2005). En este sentido la proteólisis de la troponina I se postuló como parte del mecanismo del fallo molecular del aparato contráctil responsable del aturdimiento (McDonough, 1999; Gao y cols., 1997).

El posible papel de la disfunción del retículo sarcoplásmico en el aturdimiento miocárdico limitando la disponibilidad de calcio parece menos probable ya que existe amplia evidencia de que la disponibilidad de calcio no es el factor limitante en el aturdimiento miocárdico, al menos *in vitro* (Kusuoka y Marban, 1992).

Un trabajo más reciente ha relacionado el edema celular e intersticial que ocurre durante la isquemia/reperfusión con la imposibilidad de las cabezas de miosina de engancharse, o hacerlo de forma incorrecta, al filamento de actina. Conforme el edema se resuelve, la función contráctil volvería a la normalidad (Bragadeesh y cols., 2008).

3.4.- Evidencias clínicas del aturdimiento miocárdico.

Hay varias situaciones clínicas en las que puede ocurrir el fenómeno del aturdimiento miocárdico (Tabla 1). La situación clínica que más se acerca a las descripciones experimentales originales del aturdimiento miocárdico es la oclusión coronaria controlada que se realiza durante una angioplastia. Otras situaciones incluyen la angina inestable, la isquemia secundaria por aumento de las demandas del miocardio en presencia de estenosis coronaria, tras reperfusión en el infarto agudo de miocardio o tras cirugía cardíaca con circulación extracorpórea.

Situación clínica	Comentario
1. Tras ACTP	Problema diastólico más que sistólico. Observada mediante ventriculografía con contraste y radionúclidos.
2. Angina inestable	Observada mediante ecocardiografía.
3. Angina/isquemia inducida por el ejercicio/estrés	Observada con ecocardiografía y la combinación de eco y estudio nuclear.
4. Tras la reperfusión en el IAM	Retorno de la función lento (días-meses)
5. Tras <i>by-pass</i> cardio-pulmonar	Retorno de la función lenta (unas 48 h.)
6. Tras cardioversión en las taquiarritmias auriculares	Probablemente represente una miopatía auricular inducida por taquicardia más que aturdimiento verdadero (el causado por isquemia/reperfusión)

Tabla 1.- Situaciones clínicas en las que puede ocurrir aturdimiento miocárdico

Los primeros estudios que investigaron los efectos de la angioplastia sobre la función miocárdica se basaron en oclusiones coronarias de duración inferior a 60 segundos, demasiado cortas para inducir alteraciones en la función sistólica regional. Sin embargo, sí se observaron alteraciones, relativamente duraderas (de hasta 12 minutos), en la función diastólica del ventrículo izquierdo tras el desinflado del balón (Wijns y cols., 1986; Carlson y cols., 1987).

Más reciente, Sheiban y cols. (1995) determinaron los efectos de un inflado más largo sobre la función cardíaca en pacientes divididos en dos grupos: uno recibió tratamiento con nitrato y el otro con calcioantagonistas. Inflaron el balón durante 5 minutos y observaron, en el grupo tratado con nitratos, que la mayoría de pacientes sufrieron una reducción de la función en los

segmentos miocárdicos implicados que se mantenía a las 24 horas, llegando a la normalización a las 36 horas. Sin embargo, en los pacientes tratados con antagonistas del calcio, la mayoría había recuperado la contractilidad a las 24 horas del episodio isquémico. Estos hallazgos apoyaron la evidencia experimental en modelos animales de la existencia del aturdimiento miocárdico y su posible relación con la homeostasis del calcio.

También se obtuvieron evidencias de miocardio aturdido en pacientes con angina inestable (Nixon, 1982; Jeroudi, 1994) y en pacientes con isquemia inducida por pruebas de estrés (Robertson, 1983; Kloner, 1991). Las alteraciones de la contractilidad observadas en estos estudios persistieron tras el cese de la angina, del ejercicio y tras la normalización de las alteraciones electrocardiográficas, por lo que no fueron atribuibles a isquemia persistente y sí a aturdimiento. Ambrosio y cols. (1996) confirmaron y ampliaron estos hallazgos al hacer notar que las alteraciones persistentes de la contractilidad de la pared miocárdica se observaban cuando el flujo coronario y la perfusión miocárdica se había recuperado completamente, lo que reforzó el concepto de que episodios relativamente breves de isquemia y reperfusión pueden inducir aturdimiento miocárdico en el ser humano. Recientemente, otras pruebas de estrés, como el estrés con dobutamina y dipiridamol, han demostrado que producen aturdimiento en pacientes con cardiopatía isquémica crónica estable (Tsoukas y cols., 1997; Lee y cols., 2000, Barnes , 2002).

El aturdimiento miocárdico se produce también tras la reperfusión en el seno del infarto agudo de miocardio. Sin embargo, este escenario incluye tanto células miocárdicas aturcidas como muertas o dañadas irreversiblemente. A pesar de estos factores, una serie de estudios que examinaron la contractilidad regional del ventrículo izquierdo en pacientes que habían recibido reperfusión con agentes trombolíticos o angioplastia mostraron un retraso en la recuperación de la función que requirió en cualquier caso de 3 días a 6 meses (Patel y cols., 1988; Kloner y cols., 1989; Bolli, 1998; Kloner y cols., 1998).

La cirugía cardiaca que precisa de *by-pass* cardiopulmonar es un escenario clínico en que el aturdimiento miocárdico puede suponer un problema importante (Kloner y cols., 1994). Los primeros estudios de Gray y cols. (1979) revelaron que los pacientes a quienes se realizaba una cirugía con cardioplejia cristaloides presentaban una reducción de la fracción de eyección del ventrículo izquierdo y del volumen-latido durante el primer día del posoperatorio. En estos pacientes, la función se recuperó en 48 horas; sin embargo, el índice de trabajo cardiaco persistió reducido. Las curvas de Starling permanecieron también deprimidas 48 horas después de la cirugía. Breisblatt y cols. (1990) describieron una recuperación prolongada de la función ventricular tras la cirugía de *bypass* coronario en la que se realizaba cardioplejia intermitente con sangre para preservar el miocardio. Aunque se creía que este tipo de cardioplejia protegía mejor el miocardio, el 96% de los pacientes mostraron reducciones postoperatorias de las fracciones de eyección

izquierdas y derechas. La fracción de eyección izquierda mostró un pico de reducción a los 262 minutos tras la cirugía y necesitó de 24 a 48 horas para recuperarse. Este fenómeno ocurrió de forma independiente de la precarga, poscarga y del tipo de cardioplejia administrada. De hecho, el aturdimiento tras una cirugía cardiaca que precise de circulación extracorpórea es un hecho clínico habitual y los pacientes, con frecuencia, necesitan inotrópicos tras su salida de bomba durante horas e incluso días hasta que el aturdimiento se resuelve.

El aturdimiento auricular es una depresión transitoria de la función mecánica auricular y de la orejuela que acontece tras la cardioversión a ritmo sinusal de una fibrilación o un flutter auricular. Es un fenómeno bien conocido que se manifiesta por una reducción paradójica de las velocidades de los flujos sanguíneos intraauriculares y de la orejuela tras la desfibrilación (Khan, 2002 y 2003). Se ha publicado que el aturdimiento auricular es más acusado en pacientes con fibrilación auricular y cardiopatía isquémica que en pacientes con la misma arritmia y cardiopatía hipertensiva o en la fibrilación auricular aislada (Mattioli y cols., 1996).

4.- Consecuencias funcionales y metabólicas de la taquicardia.

La taquicardia es un mecanismo fisiológico de adaptación del gasto cardiaco a las necesidades del organismo. Su regulación es compleja y depende de estímulos neurológicos, neurohormonales y metabólicos. Las consecuencias hemodinámicas del aumento de la frecuencia cardiaca son inmediatas: en pocos latidos el gasto

cardíaco aumenta. Bajo condiciones fisiológicas, los mecanismos de adaptación son capaces de aumentar o mantener la contractilidad miocárdica, aumentando el gasto cardíaco en paralelo con la frecuencia cardíaca. Pero, si ésta es demasiado rápida, el gasto cardíaco se puede reducir por acortamiento excesivo de la fase de llenado ventricular, recuperándose el gasto al reducirse o normalizarse la frecuencia cardíaca.

Por otro lado, una frecuencia cardíaca alta, mantenida el tiempo suficiente, puede producir disfunción ventricular izquierda, fenotípicamente similar a la de la miocardiopatía dilatada, la cual es parcial o completamente reversible después de un tiempo tras la normalización de la frecuencia cardíaca. Éste es un hecho bien conocido que se ha denominado con el término taquimiocardiopatía o miocardiopatía inducida por taquicardia (Fenelon y cols., 1996) y que se ha descrito tanto en la clínica humana como en modelos animales. Sin embargo, se ha estudiado mucho menos el efecto que episodios más o menos breves (agudos) de taquicardia tienen sobre la función y estructura miocárdica.

4.1.- Antecedentes.

A principios del siglo XX ya se conocía que taquiarritmias crónicas o incesantes podían tener como consecuencia una disfunción ventricular. En 1913, Gossage y Braxton Hicks describieron un caso de fibrilación auricular en un hombre joven que desarrolló posteriormente una dilatación ventricular e hipertrofia, lo que les sugirió que la dilatación ventricular y la hipertrofia “muy

bien podrían ser consecuencia y no la causa de la fibrilación auricular”.

Trabajos posteriores en las décadas de 1930 y 1940, documentaron casos de resolución completa de insuficiencia cardiaca congestiva tras cardioversión de fibrilación auricular a ritmo sinusal (Brill y cols., 1937; Phillips y Levine, 1949). Desde entonces, se han publicado numerosas descripciones de fallo cardiaco congestivo asociado con taquicardia auricular incesante y descripciones de miocardiopatía reversible asociada con el control del ritmo y la frecuencia de diversas taquiarritmias como la fibrilación auricular con respuestas ventriculares elevadas, la taquicardia auricular, las taquicardias recíprocas por vía accesoria y la taquicardia por reentrada nodal (Shimbane y cols., 1997).

4.2.- Efecto de la taquicardia sobre la circulación coronaria.

En condiciones normales, la taquicardia incrementa las demandas miocárdicas de oxígeno, lo que produce dilatación de los vasos de resistencia, reducción de la resistencia vascular periférica del miocardio, aumento proporcional en el flujo coronario y, como consecuencia, dilatación de las grandes arterias epicárdicas coronarias. Como ya se ha explicado en otro apartado de esta introducción, cuando la microcirculación está dilatada al máximo, el flujo coronario se hace dependiente de la presión arterial y de los determinantes de la resistencia al flujo extravasculares (como la presión telediastólica ventricular) (Hoffman, 1978). Cuando la frecuencia cardiaca sigue aumentando durante la taquicardia en un

corazón con la microcirculación dilatada al máximo, se reduce de forma intensa la perfusión del subendocardio mientras la perfusión epicárdica apenas experimenta cambios, haciendo más vulnerable el endocardio a la isquemia (Canty, 2007).

Pero además, la frecuencia cardíaca elevada tiene influencia sobre el flujo coronario porque se reduce el tiempo diastólico disponible para la perfusión miocárdica. Si a esto unimos que la reserva coronaria también se puede reducir por incrementos en los otros determinantes del consumo miocárdico de oxígeno (presión sistólica y contractilidad) todo ello explica que pueda haber isquemia en presencia de coronarias normales (Hoffman, 1987).

Asimismo, el tiempo en que un corazón está sometido a una taquicardia influye de forma determinante en su perfusión. Se ha demostrado en modelos caninos y porcinos de taquimiocardiopatía, que una taquicardia supraventricular mantenida durante 3-4 semanas reduce el flujo coronario subendocárdico y subepicárdico de forma significativa, con una reducción de la relación flujo subendocárdico-flujo subepicárdico, lo cual demuestra un traslado del flujo coronario transmural desde el subendocardio al subepicardio. (Spinale y cols., 1992).

Así mismo, se ha demostrado que una taquicardia inducida y mantenida el tiempo suficiente causa un remodelado de los capilares miocárdicos que se asocia a una reducción del flujo sanguíneo miocárdico, a daño en el miocardiocito y a disfunción ventricular izquierda (Spinale y cols., 1992).

4.3.- Efecto de la taquicardia sobre la función miocárdica.

Tanto la taquicardia incesante en el ser humano como la estimulación rápida en modelos animales experimentales produce disfunción contráctil y miocardiopatía dilatada. Se han descrito alteraciones estructurales y funcionales como la distorsión de los elementos contráctiles (Komamura y cols., 1993), reducción de la reserva de flujo coronario (Shannon y cols., 1993), alteraciones de la disponibilidad de calcio por el retículo sarcoplásmico (O'Rourke y cols., 1999), aumento de las señales proapoptóticas (Heinke y cols., 2001), desbalances metabólicos y desplazamiento en el uso de sustratos metabólicos (Nikolaidis LA y cols., 2001).

En modelos animales, la estimulación rápida auricular o ventricular produce disfunción biventricular sistólica y diastólica cuya severidad está en relación directa con la frecuencia y duración de la estimulación (Damiano y cols., 1987; Moe y cols., 1988). Spinale y cols. (1990) estudiaron en cerdos los efectos de una estimulación auricular rápida (al doble de la frecuencia sinusal inicial) sobre la función y hemodinámica ventriculares; hallaron que la taquicardia no modificaba de forma inmediata ni la fracción de eyección ni la presión sistólica pico del ventrículo izquierdo (VI) aunque sí se aumentó la PtDVI. Sin embargo, tras 7 días de taquicardia supraventricular, se detectaba una reducción significativa en la fracción de eyección tanto del VI como del VD.

El fallo cardiaco inducido por taquicardia se caracteriza por presiones ventriculares de llenado elevadas (Howard y cols., 1991; Shannon y cols., 1991) y depresión severa de la función sistólica

tanto del ventrículo izquierdo (hasta un 55% de reducción) como del derecho (Ohno y cols., 1994; Morgan y cols., 1989). El gasto cardiaco se reduce y la resistencia vascular periférica se eleva (Tanaka y cols., 1992). Esta marcada disfunción ventricular sistólica se ha demostrado que resulta de la pérdida intrínseca de la contractilidad miocárdica evaluada por índices en el corazón entero o en miocitos aislados (Shannon y cols., 1991; Tanaka y cols., 1992; Moe y cols., 1992; Komamura y cols., 1992).

Sin embargo, el efecto que la taquicardia de corta duración tiene sobre la función del miocardio se ha estudiado menos. Aunque en el trabajo de Spinale y cols (1990) no se encontraron efectos significativos de la taquicardia sobre la contractilidad miocárdica inmediatos, Hernández y cols. (2008) publicaron recientemente reducciones en los parámetros de función ventricular con sobreestimulaciones de corta duración (10, 20 y 40 minutos) aunque este efecto dependió del lugar desde donde se realizó dicha estimulación. Si la estimulación se realizaba en aurícula derecha, los parámetros de función ventricular no se modificaron. Pero, si la estimulación era ventricular se alteraban tanto los parámetros globales como regionales de función ventricular. Y esta alteración fue, a su vez, dependiente del tiempo que duró la estimulación, encontrándose diferencias solo cuando la estimulación duraba 40 minutos.

4.4.- Efectos metabólicos de la taquicardia.

Coleman y cols. (1971) demostraron que los depósitos energéticos y enzimáticos se reducían significativamente en perros tras una taquicardia crónica, cambios que eran similares a los que se detectaban tras una isquemia miocárdica aguda. Por otro lado, Tripp y cols. (1986) demostraron que la taquicardia aguda en perros no reducía significativamente los depósitos energéticos miocárdicos en comparación con los controles. Una posible explicación de la reducción de los sustratos energéticos con la taquicardia crónica pero no con la aguda podría ser el desarrollo de isquemia por reducción del flujo coronario subendocárdico que se produce con más intensidad en el modelo crónico (Spinale y cols., 1989). Este mismo grupo publicó un año después una reducción significativa de la actividad de la creatincinasa tras siete días de sobreestimulación auricular a frecuencia el doble de la sinusal en cerdos (Spinale y cols., 1990). Posteriormente, Marín-García y cols. (2001), demostraron una reducción de la actividad de los enzimas respiratorios mitocondriales en un modelo canino de taquimiocardiopatía, y no lo atribuyeron a una reducción del número de mitocondrias o a necrosis, si no a disfunción mitocondrial que relacionaron con fenómenos de estrés oxidativo.

Finalmente, en los modelos animales de taquimiocardiopatía se ha descrito que existe una intensa activación neurohormonal con elevación en plasma del péptido natriurético atrial, epinefrina, norepinefrina y de la actividad del sistema renina y aldosterona, al

igual que ocurre en otras formas de fallo cardíaco avanzado (Moe y cols., 1989; Cosín-Aguilar y cols., 2009).

5.- Introducción al estrés oxidativo.

5.1.- Antecedentes.

Carl Wilhem Scheele (1742-1786) farmacéutico y químico sueco (aunque de origen alemán), se atribuyó el descubrimiento del oxígeno, en su libro *Chemische Abhandlung von der Luft und dem Feuer* (Tratado químico del aire y del fuego) publicado en 1777. Sin embargo, tradicionalmente este descubrimiento había sido atribuido al químico inglés Joseph Priestly (1733-1804), quien lo descubrió de manera independiente a Scheele en 1772. Pero el primero en publicar un trabajo sobre este gas y darle nombre, fue el químico francés Lavoisier (1743-1794). Utilizó para ello dos raíces griegas *ὄξύς* (*oxýs*) (ácido, literalmente "punzante", por el sabor de los ácidos) y *-γενής* (*-genēs*) ("generador, que engendra"), porque creyó que el oxígeno era un constituyente indispensable de los ácidos. Desde entonces, ha habido una necesidad de controlar y conocer la interacción de este gas con los organismos. En 1775, Priestly describió la toxicidad de la molécula de oxígeno sobre diferentes organismos, lo que llevó, dos siglos después, a promover su uso como terapia contra ciertas infecciones bacterianas (Brummelkamp y cols., 1963; Halliwell y Gutteridge, 1999) y en terapia hiperbárica y radioterapia (von Sonntag, 1987).

El oxígeno elemento (O) existe en el aire como una molécula diatómica (O₂), la cual en sentido estricto debería ser llamada dioxígeno. El O₂ apareció en cantidades significativas en la tierra

hace unos 2500 millones de años, habiéndose sugerido que se debió a las cianobacterias al adquirir éstas la capacidad de escindir la molécula de agua y liberar oxígeno (Harman, 1956). El incremento de la concentración de O₂ en la atmósfera obligó a los microorganismos anaerobios a restringirse a medios donde el oxígeno no pudiera penetrar, mientras que otros evolucionaron desarrollando defensas antioxidantes que les permitiera sobrevivir en condiciones aeróbicas. Esta evolución hacia organismos aerobios produjo una serie de transformaciones metabólicas que permitieron la utilización del O₂ para obtener energía por medio de la cadena de transporte de electrones. Por lo tanto, se hizo necesario el desarrollo de defensas antioxidantes durante la evolución de los organismos aerobios (Kohen y Nyska, 2002).

El estrés oxidativo es consecuencia de la exposición de la materia viva a los radicales libres y especies reactivas dependientes del oxígeno (EROs), generadas como subproductos de su metabolismo aerobio y cuya producción aumenta ante cualquier lesión tisular. La sobreexposición a los radicales libres produce una ruptura del equilibrio que debe existir entre los factores prooxidantes y los mecanismos de defensa antioxidante, encargados de eliminar dichas especies químicas reactivas. Todo ello acarrea alteraciones severas de la relación entre estructura y función en cualquier órgano, sistema o grupo celular especializado del organismo. Por lo tanto, se reconoce al estrés oxidativo como un mecanismo general de daño celular implicado en la etiopatogenia de numerosas enfermedades (Ames y cols., 1993).

5.2.- Terminología y definiciones.

5.2.1.- Radicales libres y especies reactivas del oxígeno (EROs).

Desde el punto de vista químico un radical libre es toda especie química, átomo, molécula o parte de esta, cargada o no, que en su estructura presenta uno o varios e^- desapareados. Los radicales libres son muy inestables y tienden a recuperar la estabilidad perdida lo que pueden lograr de dos formas: bien cediendo el e^- desapareado (agente reductor), o bien captando un e^- (agente oxidante). Así, cuando un átomo, por ejemplo de oxígeno, acepta electrones, hace que otra sustancia los pierda (y por tanto se oxide) (Hrbac y Kohen, 2000). En biología, el proceso de oxidación se acompaña siempre de un proceso de reducción en el cual suele haber una pérdida de oxígeno, mientras que en los procesos de oxidación hay una ganancia de oxígeno. Tales reacciones, denominadas redox, son la base de numerosas vías del metabolismo de los seres vivos.

Los radicales libres son conocidos en química desde principios del siglo XX, aunque solo a partir de la segunda mitad de ese siglo se les atribuyó un papel deletéreo para el medio celular y en el proceso de envejecimiento (Denham, 1956; Gilbert, 1981). Son muy reactivos y tienen una vida media muy corta por lo que actúan cerca del sitio donde se forman ya que no tienen mucho tiempo para difundir. En este proceso, el átomo atacado pierde o gana electrones, pudiéndose convertir a su vez en otro radical libre (Basaga, 1989).

El oxígeno molecular (O_2), también es considerado un radical libre ya que contiene dos electrones desapareados en dos

órbitas diferentes, y por tanto es un biradical, aunque su reactividad es muy baja en comparación con la de otras especies reactivas dependientes del oxígeno (Reiter y cols., 1998).

El término EROs incluye tanto a los radicales libres relacionados con el oxígeno como a otras especies no radicales que siendo precursores y derivados de estos, participan en reacciones que causan aumento de los agentes prooxidantes (Beckman y Koppenol, 1996). Así, las EROs se puede clasificar en dos grupos de compuestos: radicales y no radicales.

El grupo radical, a menudo llamado radicales libres (término incorrecto ya que todo radical es siempre libre), contiene compuestos como el radical óxido nítrico (o monóxido de nitrógeno) (NO), el ión superóxido (O_2^-), radical hidróxilo (OH^\cdot) y los radicales peroxilo (ROO^\cdot) y alcoxilo (RO^\cdot). Estas especies son radicales porque contienen al menos un electrón desapareado en las capas alrededor del núcleo atómico y son capaces de existir con independencia (Halliwell y Gutteridge, 1999). La existencia de un electrón desapareado hace que sean inestables y tiendan a la estabilidad, bien donando o aceptando otro electrón.

El grupo de compuestos no radicales incluye un amplio número de sustancias, algunas de las cuales son extremadamente reactivas. Entre estos compuestos están el ácido hipocloroso (HClO), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), los peróxidos orgánicos, los aldehídos y el ozono (O_3).

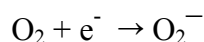
Un avance crucial en el campo de la interacción del oxígeno con el organismo humano fue el descubrimiento en 1969 de la

enzima superóxido dismutasa (SOD) (McCord y Fridovich). Este descubrimiento permitió la descripción de la teoría de la toxicidad por radicales superóxido (Halliwell y Gutteridge, 1999), la cual fue foco de mucha investigación en envejecimiento, desarrollo de organismos, enfermedades y señales celulares.

Los derivados oxidantes del oxígeno pueden causar daño a lípidos, ADN, proteínas y a los sistemas de defensa antioxidante. El organismo debe confrontar y controlar tanto la presencia de oxidantes como de anti-oxidantes de forma continua. Sabemos que el equilibrio de estos dos sistemas es vital para la célula. Un desequilibrio hacia un incremento de la capacidad oxidante sobre la anti-oxidante se define como estrés oxidativo y puede dar lugar a daño por oxidación.

5.2.2.- Bioquímica de las EROs.

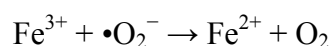
Los radicales libres pueden formarse en una molécula mediante la ganancia de un electrón, por ejemplo en la reducción del oxígeno molecular (O_2) a anión superóxido (O_2^-).



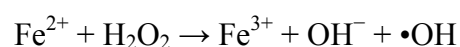
El superóxido producido durante la primera reacción es una ERO de vida muy corta ($\sim 2-4 \mu\text{seg.}$) y de difusión fácil. En el medio celular, O_2^- puede producir peroxidación lipídica, debilitando la membrana celular. La reducción completa del O_2 resulta en la formación de superóxido, peróxido de hidrógeno (de vida

relativamente más larga y estable) y otros productos como el oxígeno triplete ($^3\text{O}_2$), el oxígeno singlete ($^1\text{O}_2$), el radical hidroxilo (OH^\cdot) y el radical hidrógeno (H^\cdot).

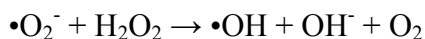
El peróxido de hidrógeno es un agente oxidante no especialmente reactivo. Puede difundir a través de las membranas celulares y alcanzar estructuras celulares alejadas de donde se originó. Pero su importancia radica en que es una fuente de radicales de hidrógeno. En ausencia de catalizadores metálicos, el superóxido y el peróxido de hidrógeno son eliminados con facilidad y son virtualmente inofensivos. Por el contrario, el radical hidroxilo es extremadamente reactivo, reaccionando con la mayoría de biomoléculas a una velocidad tan alta que la velocidad de reacción depende casi exclusivamente de la tasa de difusión a través del medio (Misra, 2009). Es decir, tan pronto como los reactivos se encuentran, reaccionan, por lo que el OH^\cdot es la forma más dañina de EROs. Se sabe que los OH^\cdot se producen por la reacción de Haber-Weiss (Haber y Weiss, 1932). En esta reacción, el primer paso del ciclo catalítico se produce por la reducción del catión férrico a catión ferroso:



El segundo paso es una reacción de Fenton,



La reacción neta es:



Fenton (1894) describió la interacción entre el ión Fe^{2+} y el H_2O_2 . Cuarenta años después, la reacción de Fenton sirvió para explicar la producción de radicales hidroxilo y su poder oxidante. Más tarde se ha reconocido que esta reacción ($\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{Fe}^{3+} + \text{OH}^\bullet + \text{OH}^-$) explica gran parte del daño oxidativo que se produce en los medios biológicos (Sawyer y Valentine, 1981). El hierro y el cobre, dos de los metales de transición más abundantes en los tejidos, poseen electrones desapareados que pueden convertir oxidantes relativamente estables en potentes oxiradicales (Halliwell y Gutteridge, 1999).

5.2.3.- Fuentes de EROs (figura 6).

El oxígeno es utilizado por los organismos aerobios como aceptor final de electrones durante el proceso de respiración mitocondrial. En este proceso se genera energía en forma de ATP y es inevitable la formación de subproductos a partir del oxígeno (EROs). Por lo tanto, las células están expuestas a una gran variedad de EROs provenientes tanto de fuentes exógenas como endógenas (Kohen and Gati, 2000).

5.2.3.1.- Fuentes endógenas de EROs.

La principal fuente de radicales libres en las células eucariotas es la mitocondria. Se producen principalmente durante la fosforilación oxidativa, que es un proceso metabólico que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir ATP. Consta de una cadena de reacciones acopladas catalizadas enzimáticamente por una serie de 5 complejos situados en la membrana interna mitocondrial (Yu, 1994).

En la fosforilación oxidativa, los electrones son transferidos desde el nicotin adenina dinucleótido reducido (NADH) al oxígeno molecular a través de la cadena de transporte de electrones (CTE) que está formada por los complejos enzimáticos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato-ubiquinona oxidoreductasa), III (ubiquinol-citocromo oxidoreductasa) y IV (citocromo *c* oxidasa). La consecuencia de esta transferencia de electrones es la creación de un gradiente electromecánico a través de la membrana interna mitocondrial. El complejo V (ATP sintetasa) sintetiza ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico. Este ATP es intercambiado por el ADP del citosol por la adenina nucleótido translocasa.

El oxígeno, que en los organismos aerobios es el aceptor final de este flujo de electrones, puede generar $\bullet\text{O}_2^-$ al recibir un único e^- , en la transferencia que ocurre en el cuarto paso de la respiración mitocondrial (Nohl y Hegner, 1978). Las enzimas dependientes del NADH son otra fuente de radicales libres en la mitocondria.

En el miocardiocito, las reacciones anteriores se aceleran bien cuando existe una tensión de oxígeno por encima de lo normal o bien cuando se lesiona la mitocondria; estas reacciones son la principal fuente de EROs durante la isquemia y la reperfusión (McCord, 1987).

Otras fuentes endógenas de EROs en el miocardiocito son la β -oxidación de ácidos grasos, la sintetasa del óxido nítrico (NOS), la NADPH oxidasa, el metabolismo de la enzima citocromo P450, las vías de la lipooxigenasa (LOX) y de la ciclooxigenasa (COX) y la autooxidación de diversas sustancias, particularmente catecolaminas (Bindoli, 1988; Kevin, 2005).

5.2.3.2.- Fuentes exógenas de EROs.

Las fuentes exógenas de EROs incluyen los contaminantes medioambientales (humos de combustión de vehículos, tabaco, industriales, etc), gases deletéreos como el ozono, altas concentraciones de oxígeno (cámaras hiperbáricas), radiaciones ionizantes (rayos γ , rayos X) y no ionizantes (rayos ultravioleta), fármacos (adriamicina, nitroglicerina, ciertos anestésicos), tóxicos (herbicidas y pesticidas), bacterias, virus y toxinas (Kohen y Gati, 2000; Shadyro y cols., 2002).

Aunque la exposición del organismo a las EROs de fuentes exógenas es muy alta, la exposición a fuentes endógenas es mucho más importante ya que se trata de un proceso continuo a lo largo de la vida celular y del organismo (Farré y Casado, 2001).

5.3.- Dianas de las EROs.

5.3.1.- Lípidos, proteínas y ácido desoxirribonucleico (ADN).

Entre las dianas biológicas más vulnerables al daño oxidativo están ciertas enzimas, membranas lipídicas y el ADN. Todas las membranas celulares son especialmente vulnerables por su alta concentración de ácidos grasos poliinsaturados (AGPs). El daño a los lípidos suele producir peroxidación, es decir degradación oxidativa de los lípidos, que puede desencadenar una reacción en cadena en la membrana celular y peroxidación de todos los lípidos insaturados de la misma (Meral y cols., 2000).

Las proteínas también son constituyentes de las membranas y pueden ser diana de las EROs sufriendo peroxidación, daño en aminoácidos, cambios en su estructura terciaria, degradación y fragmentación. Las consecuencias son pérdida de actividad enzimática, alteración de la función y estructura celular (Levine y cols., 2001).

Aunque el ADN es una molécula estable, las EROs pueden interactuar con él y causarle daño: modificando bases, causando roturas simples o dobles de la doble hélice, pérdida de purinas, y otras bases. El ADN es más sensible a unas EROs que a otras; particularmente peligrosas son las inducidas por radiaciones ionizantes.

5.3.2.- La mitocondria.

Las proteínas mitocondriales, lípidos y el ADN mitocondrial (ADNmt) pueden llegar a ser no funcionales por el efecto de la oxidación. Los enzimas o complejos enzimáticos más afectados incluyen la aconitasa, cetoglutarato deshidrogenasa, piruvato deshidrogenasa y los complejos I (NADH deshidrogenasa), II (succinato-ubiquinona oxidorreductasa) y III (ubiquinol-citocromo oxidorreductasa) de la CTE (Rocha y Victor, 2007). La inactivación oxidativa de la ADNmt polimerasa enlentece la replicación del ADNmt y por tanto conduce a una inactivación de la fosforilación oxidativa, reducción del aporte de ATP y atenuación de los procesos dependientes de energía de la célula (Graziewicz, 2002).

La cardiolipina, un componente bioenergético importante de la mitocondria, es una diana precoz de las EROs tanto por su alto contenido en ácidos grasos insaturados como por su proximidad a la CTE. La oxidación de la cardiolipina impide la actividad del complejo I de la CTE e induce la liberación de citocromo c (Paradies, 2004).

Por tanto la alteración por la EROs de ADNmt, lípidos y proteínas mitocondriales puede alterar la función mitocondrial y tener un impacto fisiopatológico.

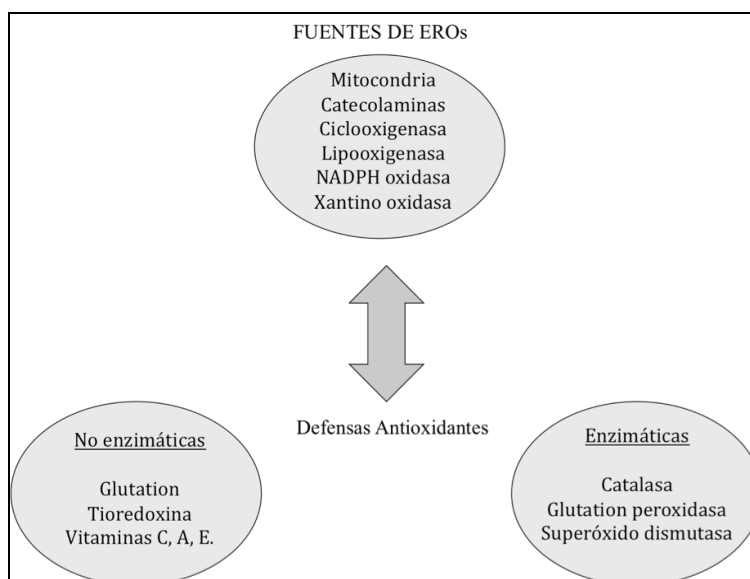


Figura 6.- Fuentes de Especies reactivas de Oxígeno (EROs) y defensas antioxidantes. Un exceso de EROs se producen durante la isquemia/reperfusión, pudiendo llegar a un desequilibrio con las defensas antioxidantes, lesionando la célula. Modificado de Misra y cols. (2009).

5.4.- Mecanismos de defensa de la célula contra el estrés oxidativo.

La exposición continua a los oxidantes ha hecho que la célula y el organismo desarrollen mecanismos de defensa. De entre ellos, uno de los más importante es el de los antioxidantes (figura 6). Este sistema se constituye por dos grupos principales: las enzimas antioxidantes y los antioxidantes de bajo peso molecular (o neutralizadores). Entre las primeras destacan la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa y la glutatión peroxidasa (GPx). Entre los segundos, el glutatión, un tripéptido (ácido glutámico-cisteína-glicina) que contiene un grupo tiol en su forma reducida (GSH). En efecto, el glutatión reduce cualquier enlace disulfuro formado al

actuar como un donante de electrones. En el proceso, el glutatión se convierte en su forma oxidada disulfuro de glutatión (GSSG). El glutatión se encuentra casi exclusivamente en su forma reducida, ya que la glutatión reductasa, es constitutivamente activa y cataliza la reducción de glutatión oxidado a reducido. De hecho, la proporción de glutatión reducido respecto al glutatión oxidado se utiliza como una medida de la toxicidad celular (Gul y cols., 2000; Gallogly y Mieyal, 2007).

Son varios los sistemas enzimáticos que han aprovechado el enorme potencial reductor del glutatión:

- actividad glutatión peroxidasa: esta familia de enzimas cataliza la oxidación de glutatión reducido (GSH) a oxidado (GSSG) a expensas de ROOH^- . Pueden reducir tanto H_2O_2 como peróxidos orgánicos libres y peróxidos de ácidos grasos.
- La glutatión reductasa, que proporciona GSH para la actividad glutatión peroxidasa.
- La glucosa 6-P deshidrogenasa, que proporciona NADPH para la actividad glutatión reductasa.

Bajo condiciones fisiológicas, el nivel de EROs está controlado por la SOD, la catalasa y la GPx, además de por antioxidantes como el ácido ascórbico, tocoferol o carotenoides y flavonoides. Sin embargo, durante la reperusión que sigue a un periodo de isquemia, puede que la SOD, catalasa y GPx sean incapaces de compensar la producción excesiva del radical superóxido y de H_2O_2 (Winckler, 1987). El exceso de H_2O_2 puede

causar degradación de los anillos *hem* de la hemoglobina, liberando Fe, el cual es capaz de estimular la producción de OH y la lipoperoxidación en los eritrocitos (Wells, 1990).

5.5.- Métodos para determinar el estrés oxidativo.

Los métodos para determinación del estrés oxidativo se pueden clasificar en 3 grupos: la cuantificación de radicales, la cuantificación de marcadores del daño oxidativo y la cuantificación de los sistemas de defensa antioxidante.

5.5.1.- Cuantificación de radicales.

Pueden ser técnicas directas o indirectas. Las únicas técnicas para la detección directa de radicales son la resonancia del espín de los electrones, que permite la detección de radicales relativamente estables, y el método de atrapamiento del espín con el cual, un radical altamente reactivo como el OH[·], reacciona con una molécula de atrapamiento para producir un radical estable que puede ser cuantificado (Mason, 1996). Como métodos indirectos se utilizan los marcadores inmuno-histoquímicos.

5.5.2.- Cuantificación de marcadores de daño oxidativo.

Se basan en la cuantificación de los productos finales de la interacción entre EROs con macromoléculas biológicas como el ADN, proteínas, lípidos y los antioxidantes de bajo peso molecular. La aparición de estos productos demuestra la existencia previa de EROs. Entre las técnicas más utilizadas se encuentran la

cuantificación de la peroxidación lipídica. La lipoperoxidación es un proceso complejo consistente en 3 etapas, iniciación, propagación y terminación (Halliwell y Gutteridge, 1999). Para cada estadio se dispone de diversos métodos para cuantificar el proceso y su progreso. Por ejemplo, debido a que la lipoperoxidación produce pérdida de substratos, como cadenas de ácidos grasos insaturados, la medida del contenido de lípidos antes y después de la exposición puede indicar peroxidación. Otro método es la medición de la formación de peróxido durante el proceso. Entre los numerosos métodos desarrollados con este propósito, algunos desvelan la formación total de peróxido mientras que otros determinan peróxidos específicos caracterizándose por la formación de dienos conjugados que pueden ser medidos fácilmente mediante métodos espectroscópicos (Kohen and Nyska, 2002). En el proceso final del proceso de peroxidación los peróxidos se descomponen a aldehídos como el malondialdehído (MDA), el cual puede ser detectado por ácido tiobarbitúrico dando un color rosa característico. Los productos finales de los aldehídos se les denomina especies reactivas del ácido tiobarbitúrico y su uso es amplio en la valoración del estado de peroxidación (Gutteridge y Tickner, 1978).

5.5.3.- Cuantificación de los sistemas de defensa antioxidante.

Son muchos los métodos que existen para evaluar la actividad y composición de las enzimas antioxidantes, las cuales, junto a los antioxidantes de bajo peso molecular, constituyen los dos sistemas principales de defensa antioxidante. Algunas técnicas

utilizan la espectroscopia o la actividad en gel y otras utilizan técnicas inmunocitoquímicas.

La evaluación de las enzimas antioxidantes pueden indicar una exposición de la célula al estrés oxidativo pero estas enzimas están bajo regulación y se puede detectar un aumento de su actividad en vez de una reducción. Las EROs pueden, por un lado, servir como estimulantes para la inducción de enzimas antioxidantes y por otro lado dañarlas.

La determinación de los productos de los antioxidantes de bajo peso molecular puede servir como un indicador mejor de interacción con EROs. La determinación del cociente entre oxidantes y reductores (como por ejemplo GSH/GSSG) se convierte así en un indicador de daño oxidativo y es uno de los procedimientos más ampliamente utilizado para cuantificar la actividad antioxidante total (Prior y Cao, 1999). La determinación de la actividad total de los antioxidantes de bajo peso molecular en vez de antioxidantes concretos es importante porque los antioxidantes de bajo peso molecular funcionan de forma integral (Berry y Kohen, 1999).

Diversos métodos permiten medir la actividad total de los antioxidantes de bajo peso molecular, tanto directos como indirectos. Los métodos indirectos son aquellos que miden factores secuenciales de la capacidad redox tales como productos de oxidación formados o concentraciones de parejas de compuestos en estado reducido-oxidado, como la medición de las parejas GSH/GSSG (Akerboom y Sies, 1981), ácido ascórbico/ascorbato o NADH/NAD⁺. Estos métodos asumen que existe un tampón o

amortiguador redox en forma de una pareja que es sensible a los cambios redox del medio es decir que reflejan cambios en el poder reductor de la muestra medida lo que correlaciona con todos los antioxidantes de bajo peso molecular. Los métodos directos pueden ser de dos tipos, químicos y eléctricos, y utilizan una sonda externa para medir la capacidad reductora u oxidante de un sistema.

5.6.- Concepto de estrés reductivo.

El equilibrio redox es esencial para muchos procesos biológicos. De la misma forma que el estrés oxidativo, el cual consume sustancias reductoras (p. ej. reduce el cociente GSH/GSSG), se ha implicado en numerosas enfermedades cardiacas, podría ocurrir que un desequilibrio inverso provocara un estrés reductivo (p.e. un incremento del cociente GSH/GSSG), el cual tendría efectos deletéreos similares. El fenómeno del estrés reductivo ha sido demostrado en eucariotas inferiores (Simons, 1995; Trotter y Grant, 2002). Recientemente se ha publicado que un tipo específico de miocardiopatía por agregación de proteínas podría estar mediada por el estrés reductivo (Rajasekaran, 2007).

6.- Modelos animales.

6.1.- Modelos animales de isquemia-reperfusión.

6.1.1.- Isquemia regional.

En los modelos animales de isquemia regional se han utilizado animales pequeños como la rata y el conejo pero la instrumentación *in-situ* del miocardio está limitada por el tamaño del corazón y de los vasos coronarios. Otro problema adicional de la utilización de animales pequeños es que la reperfusión no siempre se consigue cuando se libera la coronaria ocluída. Además la cuantificación del flujo coronario es difícil y muchas veces hay que recurrir a la objetivación visual de desaparición de la cianosis para verificar que ha existido reperfusión (Seyle y cols., 1960). Otra limitación es que en roedores, el miocardio sufre necrosis precozmente, siendo casi completa tras menos de 30 minutos de isquemia (Schaper y cols., 1988).

Por tanto no sorprenderá que hayan sido animales grandes los más utilizados en el estudio de los fenómenos de la isquemia miocárdica regional. Se han utilizado perros, primates, herbívoros grandes como la oveja, sin embargo, debido a diversas razones como la presión social en contra de la utilización de perros o primates en experimentación animal y el coste del mantenimiento y manejo de otras especies, ha hecho que el cerdo se haya convertido en el animal más utilizado en nuestros días (Tumbleson, 1986). Además, el corazón porcino tiene una similitud anatómica con el humano que lo

hace preferible al de otros animales. En el presente estudio ha sido el modelo porcino el elegido por lo que en esta introducción nos centraremos en el mismo, haciendo comparaciones con otros modelos.

6.1.1.1.- importancia de la circulación colateral.

Cuando se ocluye una arteria coronaria el desarrollo de un infarto depende no solo del tiempo de isquemia si no de la presencia o no de circulación colateral. El grupo de Schaper demostró que existen diferencias importantes en el grado de colaterización entre especies. Así, los perros tienen una red de colaterales bien desarrollada, que incluso varía bastante entre individuos, mientras que el flujo por colaterales en cerdos y primates es muy bajo (< 5% del flujo transmural). En roedores se ha visto que la circulación colateral en la rata es escasa y en el conejo existen diferencias importantes intraespecie. Por el contrario, el cerdo de guinea tiene una red de colaterales muy extensa de tal manera que a pesar de una oclusión completa coronaria, no se consigue producir necrosis transmural. Los gatos también tienen una buena red de colaterales aunque no suficiente para prevenir un infarto (Schaper, 1988). Otro aspecto importante es que un modelo animal apropiado debe reflejar la distribución espacial de la necrosis en humanos, con inicio de la misma en el subendocardio. Esto ocurre en perros, primates y cerdos pero no en pequeños roedores (Fujiwara y cols., 1989; Guo y cols., 1998). Todas estas diferencias tienen implicaciones prácticas debido a que, aunque los cerdos y los primates difieren de los perros en la

extensión de sus colaterales, ambos modelos pueden representar grupos diferentes de pacientes con enfermedad coronaria en estadios evolutivos distintos ya que muchos pacientes apenas presentan circulación colateral en fases precoces de la enfermedad coronaria y por otro lado, en pacientes con cardiopatía isquémica crónica de larga evolución se pueden desarrollar colaterales y el perro pudiera ser un modelo más apropiado.

6.1.1.2.- Influencia de las condiciones experimentales.

La mayoría de estudios sobre isquemia miocárdica realizados en el laboratorio se llevan a cabo sobre animales anestesiados, ya sea con el tórax abierto o cerrado. La utilización de animales conscientes instrumentalizados de forma crónica no se ha extendido por que, aunque evita la influencia de los anestésicos y del trauma de la apertura del tórax, requieren de una cirugía más elaborada bajo condiciones estériles, del implante de dispositivos de medida más sofisticados y caros, de un cuidado y mantenimiento veterinario de los animales complejo y de más coste. Además, las preparaciones con el tórax abierto tienen la ventaja de que la función regional y el metabolismo pueden ser estudiados con más detalle.

Anestesia, gases sanguíneos y temperatura.

Aunque los estudios con animales conscientes, sin el efecto de fármacos (como los anestésicos) que afecten a la función ventricular, son preferibles, su complejidad y coste los relegaron a favor de estudios en animales anestesiados, más sencillos de

controlar. Ahora bien, hay que tener en cuenta que en los experimentos que utilizan animales anestesiados se ha demostrado que la anestesia influye sobre la función ventricular. Así, para un mismo protocolo experimental, la disfunción contráctil posisquemia es mayor en perros anestesiados con pentobarbital que en perros despiertos, a lo que contribuiría no solo el efecto farmacológico si no también un mayor estrés oxidativo (Triana y cols., 1991). Sin embargo, no se han encontrado grandes diferencias entre modelos con animales anestesiados según el estudio fuera con el tórax abierto o cerrado (Conradie y cols., 1999; Larsen y cols., 2008).

El tipo de anestésico utilizado también influye en los resultados del experimento. En estudios sobre modelos caninos en los que se comparó anestésicos volátiles (halotano e isoflurano) con fentanilo y morfina/ α -cloralosa/uretano, la anestesia volátil resultó en una mejor recuperación de la función contráctil tras 15 minutos de oclusión coronaria (White y cols., 1994; Kanaya y Fujita, 1994). Sin embargo, con concentraciones crecientes de anestésicos volátiles, la frecuencia cardíaca y la presión arterial se reducen de forma dosis-dependiente. Este efecto cardio-depresor es reversible y se ha relacionado con la alteración del acoplamiento excitación-contracción, sobre todo por afectación de la función del retículo sarcoplásmico (Hanley y cols., 2004).

También la selección del anestésico es crucial en experimentos donde el tamaño del infarto es una variable de estudio. Se ha demostrado que los anestésicos volátiles tienen propiedades cardioprotectoras y reducen el tamaño del infarto de una forma

dosis-dependiente en conejos (Cope y cols., 1997) y en perros (Kehl y cols., 2002). Además, estudios realizados en cerdos sugieren que el uso de opiáceos en procedimientos experimentales con el tórax abierto también podrían tener efecto sobre el acondicionamiento (Schulz y cols., 2001).

La acidosis produce depresión de la contractilidad miocárdica (Williamson y cols., 1976) por lo que los gases sanguíneos arteriales y el pH deben ser monitorizados durante un experimento agudo, es decir, con el animal anestesiado, y se deben corregir ajustando los parámetros de ventilación, mediante infusión de bicarbonato, etc. Otra variable importante en los estudios sobre contractilidad miocárdica es la temperatura, por lo que debe controlarse no solo la temperatura corporal del animal si no también la del quirófano donde se realiza el experimento, particularmente en el caso de estudios a tórax abierto (Triana y cols., 1991). En cerdos, el control de la temperatura corporal es un punto importante dada su predisposición a la hipertermia maligna, alteración que se hereda en estos animales de forma autosómica recesiva (Rosenberg y cols., 2007). Dentro del rango normotérmico de 35-39 °C en cerdos, una diferencia de un grado puede alterar el tamaño de un infarto en cerca del 20% (Duncker y cols., 1996). Como los animales con el tórax abierto son más susceptibles a las variaciones de temperatura que los animales con tórax cerrado, se recomienda la utilización de sistemas de calentamiento integrados en la mesa de operaciones.

Instrumentación quirúrgica.

El primer determinante de la instrumentación quirúrgica del modelo animal es la hipótesis principal que se quiera contrastar. Los modelos de tórax abierto permiten un acceso óptimo a las arterias coronarias y por tanto son especialmente útiles en estudios sobre isquemia regional. Sin embargo, si se quiere estudiar la función cardiovascular en condiciones fisiológicas y con un mejor control del sistema nervioso autónomo, los modelos en animales conscientes son preferibles (Vatner y Braunwald, 1975).

En la mayoría de estudios experimentales sobre isquemia regional, la isquemia se realiza, por tanto, en animales anestesiados (ya sea con tórax abierto o cerrado). Las preparaciones con el tórax abierto tienen la ventaja de que la función regional y el metabolismo pueden ser estudiados con más detalle. En estos experimentos la isquemia se consigue mediante la oclusión completa o parcial de la arteria coronaria. En los modelos con tórax cerrado se suele utilizar un balón intracoronario que precisa de radioscopia para su correcta ubicación. En los modelos con tórax abierto se suelen utilizar pinzas, oclusores hidráulicos, u otros dispositivos mecánicos (Hosko y cols. 1977). Estos métodos tienen la desventaja de que el control del flujo coronario es difícil y requiere de la monitorización continua con sondas Doppler o mediante el uso de microesferas. Existen métodos más complejos que permiten controlar las variaciones significativas del flujo producidas por cambios en la presión de perfusión o desplazamiento de los oclusores como los sistemas de circulación extracorpórea (Liedtke y cols., 1988).

Por tanto se precisa de una instrumentación coronaria cuidadosa para medir y manipular el flujo coronario. Este puede medirse mediante sondas electromagnéticas o ultrasónicas implantadas alrededor de la arteria de tal manera que se pueda registrar el flujo fásico coronario. También se pueden utilizar guías intracoronarias con transductores Doppler. Así mismo técnicas de imagen combinadas con el uso de contrastes permiten la medición no invasiva del flujo coronario mediante técnicas de dilución, como las utilizadas en ecocardiografía de contraste con microburbujas (Wei y cols., 1998), densitometría de contraste (rayos X) (Haude y cols., 2000), tomografía computarizada y resonancia magnética con gadolinio como agente de contraste (Carlsson y cols., 2010).

La manipulación y oclusión coronaria en el cerdo tiene unas particularidades. En esta especie, la oclusión completa proximal de la arteria descendente anterior suele producir fibrilación ventricular (Hill y Gettes, 1980) y un infarto extenso del ventrículo izquierdo con disfunción ventricular severa. Técnicas especiales como la perfusión de la arteria coronaria mediante un sistema de circulación extracorpórea permiten la perfusión controlada de un flujo residual determinado, con lo cual se pueden estudiar zonas de miocardio extensas sometidas a isquemia (Schulz, 1995). Sin embargo, con la isquemia por bajo flujo el desarrollo de necrosis no es tan homogéneo como cuando la oclusión es completa por lo que en estudios sobre necrosis, el tamaño de la misma debe ser relativa al área en riesgo o isquémica.

6.1.2.- Isquemia global.

La isquemia miocárdica es generalmente de naturaleza regional por estenosis u oclusión de una arteria coronaria. Sin embargo en ocasiones se puede producir una isquemia global del miocardio como durante una operación de corazón con circulación extracorpórea o durante una situación que produzca hipotensión severa. La mayoría de modelos animales de isquemia regional han utilizado animales grandes como el perro y el cerdo. Sin embargo, los modelos de isquemia global han utilizado animales más pequeños instrumentalizados según la preparación de Langendorff. Originalmente, Langendorff utilizó su modelo para estudiar la función contráctil pero antes del cambio de siglo (1899) publicó la relación entre el flujo fásico coronario y la contracción del corazón. El modelo de Langendorff ha sido modificado con el tiempo para permitir estudios bajo diferentes condiciones de perfusión. Un punto crítico de este modelo es el tiempo que pasa entre la extracción del órgano del animal y su fijación al sistema de perfusión ya que el ATP y el fosfato de creatina disminuyen a los pocos segundos tras el explante. Tras la conexión al sistema de perfusión hay que esperar unos 15-30 minutos hasta que los valores iniciales se alcancen. Todo ello puede influir en los parámetros de aturdimiento o preconditionamiento que se pretenda estudiar. Además, en comparación a los modelos in vivo, los valores de la presión de perfusión en los corazones aislados son menores. Otro problema es el tipo de fluido a utilizar para la perfusión; con soluciones salinas no se pueden utilizar presiones de perfusión elevadas ya que en el

corazón aislado la resistencia microvascular es baja y se producirían presiones elevadas a nivel capilar que, junto a presiones osmóticas bajas de la solución, predispone al desarrollo de edema tisular. El uso de sangre entera podría evitar este problema pero conlleva otros problemas como la hipercoagulación, hemolisis, formación de burbujas, etc., reduciéndose el tiempo durante el cual la preparación es estable. Muchos investigadores han añadido sustancias al medio de perfusión con el objeto de aumentar la presión osmótica o aumentar la presión tisular, mediante la inmersión del órgano en un baño lleno del medio de perfusión. El edema intersticial es una limitación porque contribuye a una perfusión poco uniforme cuando la isquemia cesa y se entra en la fase de reperfusión. Además, la compresión microvascular no se produce por el edema intersticial si no también por la aparición de hipercontracturas (Humphrey y cols., 1981). Este efecto se puede compensar parcialmente inflando un balón dentro de la cavidad del ventrículo izquierdo (Ganote y Humphrey, 1985).

A pesar de estas limitaciones, el modelo de corazón aislado es útil para estudiar los efectos de la isquemia aguda o de la hipoxia. Se pueden conseguir grados diferentes de isquemia deteniendo completa o parcialmente la perfusión mientras que la hipoxia se puede estudiar reduciendo o eliminando el oxígeno del fluido de perfusión (De Leiris y cols., 1984).

6.2.- Modelos animales de insuficiencia cardiaca.

La insuficiencia cardiaca es consecuencia de múltiples alteraciones y adaptaciones fisiopatológicas que conducen a hipertrofia del ventrículo izquierdo, a disfunción y dilatación del mismo, a un aumento de la resistencia vascular sistémica y a una activación del sistema neuroendocrino (Packer, 1992). Sin embargo, el papel de los diversos mecanismos responsables de la progresión del fallo cardiaco es difícil de establecer en humanos, ya sea porque es difícil detectarlo en sus fases iniciales o por la interferencia con fármacos administrados en fases más avanzadas. La comprensión del remodelado y disfunción del ventrículo izquierdo es fundamental para describir la historia natural de la enfermedad así como la eficacia y oportunidad de los tratamientos. En este contexto es importante recordar que la muerte en fases precoces de la insuficiencia cardiaca se produce generalmente por arritmias y en fases más avanzadas por fallo de bomba. Debido a estas dificultades, los modelos animales de insuficiencia cardiaca son fundamentales para describir la naturaleza compleja de esta enfermedad, habiéndose desarrollado diferentes modelos en especies distintas (Hongo y cols., 1997).

Han sido diversos los modelos que se han diseñado para reproducir la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca (Vanoli y cols., 2004). Algunos, como los traumatismos o administración de tóxicos como la adriamicina, interfieren con los factores neurohormonales que se activan durante el fallo cardiaco. Otros modelos han sido más reproducibles como el incremento de la

resistencia periférica, la sobreestimulación ventricular rápida, la creación de un cortocircuito arteriovenoso, producción de un bloqueo aurículo ventricular, o la aplicación de descargas repetidas e intramiocárdicas de corriente continua. Sin embargo, pocos de estos modelos han generado datos que puedan ser convertidos en aplicaciones para el ser humano.

6.2.1.- Modelos en animales pequeños.

Los modelos animales de insuficiencia cardiaca se desarrollaron originalmente en ratas y ratones debido a sus ventajas potenciales sobre otros animales más grandes como su mantenimiento y alojamiento más fáciles y baratos. Esto permitía poder utilizar un número mayor de animales lo que aumentaba la potencia estadística de un experimento. Sin embargo, su tamaño pequeño dificultaba su instrumentación y toma de mediciones de parámetros intracavitarios o intramiocárdicos. Los avances tecnológicos actuales en técnicas de imagen, han permitido, sin embargo, mejorar estos aspectos por lo que siguen siendo en la actualidad útiles en la investigación de la insuficiencia cardiaca. Los modelos más frecuentes en animales pequeños se muestran en la tabla 2.

Especies	Modelos	Estímulo causante del fallo cardiaco
Rata	Ligadura coronaria	Infarto de miocardio
	Embolización coronaria	Infarto de miocardio
	Constricción de la aorta ascendente o de la arteria pulmonar	Sobrecarga de presión
	Hipertensión sensible a la sal	Sobrecarga crónica de presión
	Doxorubicina, alcohol	Miocardiopatía tóxica
Ratón	<i>Shunt</i> arterio-venoso	Sobrecarga de volumen
	Ligadura coronaria	Infarto de miocardio
	Constricción aorta ascendente	Sobrecarga de presión
	Alteración genética	Miocardiopatía dilatada

Tabla 2.- Modelos de insuficiencia cardiaca en animales pequeños más usados

Modelos de lesión miocárdica/isquemia/infarto.

Los infartos de miocardio en ratas se causaban originariamente mediante la inyección subcutánea de isoproterenol, lo que producía una necrosis difusa del miocardio (Zbinden y Bagdon, 1963). Posteriormente, otros investigadores utilizaron la electrocauterización aplicada a la superficie epicárdica para inducir infarto localizados (Adler y cols., 1976). Pfeffer y cols., en 1979, publicaron sus primeros trabajos de su modelo de infarto y fallo cardiaco en ratas basado en la ligadura de una arteria coronaria. Este modelo se convirtió en el más utilizado en las décadas que siguieron. Como ejemplo de la importancia de este modelo y su traslación a la práctica clínica, el grupo de Pfeffer observó y publicó en 1985 que la administración del inhibidor de la enzima convertidora de la angiotensina captopril reducía la dilatación del ventriculo izquierdo,

mejoraba la función sistólica y aumentaba la supervivencia de ratas a las que se les había producido un infarto de miocardio de tamaño moderado o grande.

El modelo en rata también sirvió para establecer los potenciales efectos beneficiosos de los antagonistas del receptor tipo 1 de la angiotensina II sobre la función y la estructura miocárdica tras un infarto (Smits y cols., 1992). Sin embargo, la experiencia con los antagonistas del receptor de la endotelina ilustra que los resultados positivos en este modelo no necesariamente se van a reproducir en los ensayos clínicos. Este es el caso del bosentan, fármaco que mostró su eficacia en aumentar la supervivencia y reducir la dilatación ventricular tras un infarto en ratas, pero no en humanos (Sakai y cols., 1996; Packer M y cols., 2005).

Recientemente, Pleger y cols. (2007) utilizaron el modelo de infarto en ratas para analizar la utilidad de una proteína reguladora del calcio (S100A1) cuya reducción se cree que juega un papel en la insuficiencia cardiaca. Utilizaron un vector vírico portador de un gen que codificaba la proteína S100A1 y se administraba a ratas tras provocarles un infarto de miocardio, aumentando la síntesis S100A1. Ello se traducía en una mejoría de la función ventricular y una reducción de la dilatación del ventrículo izquierdo en las ratas a las que se les administraba.

También los ratones han sido ampliamente utilizados. Ofrecen posibilidades parecidas al modelo en ratas pero es más barato. Sin embargo su manipulación quirúrgica es más exigente. El modelo murino de ligadura de una arteria coronaria se describió

hace más de 30 años (Zolotareva y Kogan, 1978) mientras que Michael y cols. (1995) fueron los primeros en establecer un modelo en ratón de isquemia-reperusión. En sus estudios, establecieron que la anatomía coronaria izquierda del ratón era muy variable. Posteriormente se realizaron estudios sobre remodelado ventricular postinfarto de miocardio mediante ligadura permanente de una coronaria (Patten y cols., 1998).

Una de las ventajas del uso de ratones en lugar de ratas ha sido la posibilidad de disponer con más facilidad de animales transgénicos o con bloqueo de uno o varios de sus genes (individuos *knockout* o KO). Esto ha permitido estudiar mejor la patogénesis de la insuficiencia cardíaca. Como ejemplo, Zhang y cols. (2003) sobreexpresaron la isoforma citoplasmática de la calmodulina quinasa II (CaMKII) en corazones de ratones transgénicos y observaron el desarrollo de hipertrofia progresiva del ventrículo izquierdo, dilatación ventricular y fallo cardíaco, lo cual apoyaba la hipótesis de que la CaMKII contribuye a la progresión del fallo cardíaco.

Modelos de sobrecarga de presión

Existen diversos métodos quirúrgicos para producir una sobrecarga de presión en ratas, siendo la constricción (*banding*) de la aorta ascendente uno de los más usados (Weinberg E y cols., 1994). Tienen como ventaja que reproducen el desarrollo progresivo de hipertrofia ventricular y de fallo cardíaco por sobrecarga de presión. También en ratones se ha desarrollado este modelo siendo una característica diferencia con el modelo en ratas el rápido desarrollo

de hipertrofia que induce lo cual permite un seguimiento más corto (Rockman y cols., 1991).

Modelos genéticos

Se han desarrollado modelos genéticos de hipertensión y de insuficiencia cardiaca tanto en ratas como en ratones. En uno de esos modelos, el de la rata Dahl sensible a la sal (Dahl, 1961), se desarrollaba hipertensión e insuficiencia cardiaca de forma gradual en ratas sometidas a una dieta rica en sal. Lewis Dahl, partiendo de observaciones en poblaciones humanas con dietas diferentes, sugirió que la hipertensión estaba determinada no solo por factores ambientales como la dieta si no también por factores genéticos. Utilizando ratas hipotetizó que si la sensibilidad a la sal era un rasgo genético, sería posible desarrollar dos estirpes de ratas: una sensible y otra resistente a la sal. Otro modelo utilizado con frecuencia es el de ratas predispuestas al desarrollo de insuficiencia cardiaca hipertensiva de McCune y cols. (1995). Estos modelos de sobrecarga de presión e insuficiencia cardiaca ofrecen diversas ventajas. Por un lado reproducen el inicio gradual de la hipertensión y el desarrollo de hipertrofia ventricular izquierda en fases precoces y de fallo cardiaco en fases más avanzadas. Por otro lado no necesitan de manipulación quirúrgica. Sin embargo, el coste del mantenimiento de los animales durante largo tiempo (6 a 12 meses) es una limitación.

En ratones, los modelos genéticos desarrollados reproducen la miocardiopatía dilatada gracias a la disponibilidad de individuos

transgénicos o KO que tienen implicada alguna proteína en la patogénesis de la insuficiencia cardíaca (Ross, 2002). Por ejemplo, Arber y cols. (1997) desarrollaron un modelo de miocardiopatía dilatada en el que la delección homocigótica del gen que codifica la proteína muscular LIM producía una desorganización de las miofibrillas, hipertrofia ventricular izquierda, dilatación, disfunción sistólica y fallo cardíaco. Otro modelo de miocardiopatía dilatada es el de los ratones con sobreexpresión de factor de necrosis tumoral alfa (FNT- α). El FNT- α es una citoquina circulante que se sospechó durante tiempo que tenía un papel en el desarrollo de fallo cardíaco. Los ratones que sobreexpresan esta proteína desarrollan hipertrofia ventricular izquierda, dilatación, depresión severa de la función sistólica, y muerte prematura (Kubota y cols., 1997). El bloqueo en estos ratones con un antagonista del FNT- α mejora los indicadores de función cardíaca. Ello llevó a un ensayo clínico de este bloqueante que sin embargo no demostró beneficio en humanos (Mann y cols., 2004). Este ejemplo ilustra las dificultades para extrapolar los hallazgos en animales pequeños, como los roedores, al ser humano.

6.2.2.- Modelos en animales grandes.

Los modelos basados en animales pequeños, particularmente el ratón, han permitido avanzar en la comprensión de las bases moleculares y celulares de la insuficiencia cardíaca. Sin embargo, estos animales muestran grandes diferencias con el humano en características cardíacas como la frecuencia cardíaca, el consumo de

oxígeno, la proporción de receptores adrenérgicos y en la respuesta a la pérdida de proteínas reguladoras (Haghighi y cols., 2003). Es más, la expresión de las proteínas contráctiles difiere entre las dos especies las cuales expresan diferentes isoformas de la miosina. Por tanto los modelos animales grandes, más cercanos al humano, son esenciales para que los descubrimientos realizados en el modelo murino, puedan ser convertidos en un ensayo clínico en humanos.

Modelos de isquemia / infarto de miocardio

Históricamente el modelo canino fue el primero. En sus comienzos los estudios se centraron en el efecto de la isquemia sobre la contractilidad regional y los efectos de isquemia prolongada sobre la muerte de los miocitos. Los trabajos de Reimer y Jennings (1979) mostraron que tras una oclusión coronaria brusca se produce un frente de onda de mortandad celular que se mueve a través de la pared miocárdica desde el subendocardio al subepicardio. El miocardio salvado por la reperfusión se ubica primeramente en el subepicardio y en el miocardio medio y presenta las características del miocardio aturdido. Como ya se ha descrito en el apartado sobre aturdimiento miocárdico isquémico de esta introducción, el modelo canino se utilizó también ampliamente para estudiarlo (Heyndrickx y cols., 1975 y 1978; Kloner y cols., 1983; Charlat y cols., 1989). Sin embargo, la presencia de una circulación colateral extensa en el miocardio canino suponía una limitación de este modelo (White y cols., 1986).

La repetición de microembolizaciones sobre el árbol coronario izquierdo es otro modelo para crear una miocardiopatía isquémica en perros. En este modelo, los perros son sometidos a embolizaciones arteriales coronarias múltiples que se llevan a cabo de forma seriada durante un periodo de unas 10 semanas. Al final, el objetivo es conseguir una FEVI < del 35%. Tras esto, se produce una dilatación progresiva del VI, activación del sistema neurohormonal y fallo cardiaco (Sabbah y cols., 1991). Diversos autores han utilizado este modelo para evaluar el efecto de fármacos como los betabloqueantes, iecas o digoxina (Sabbah y cols., 1994). Este modelo de microembolizaciones tiene la limitación de que reproduce la situación clínica de la enfermedad multivaso o de múltiples infartos pero no la de isquemia o necrosis dependiente de un único vaso, situación por otro lado más habitual. Además es un modelo complejo, que requiere de sucesivas intervenciones quirúrgicas.

Las limitaciones en la anatomía coronaria canina dependientes sobre todo de su extensa red de colaterales, hizo que se buscaran otros modelos más cercanos a la anatomía del hombre. Tanto el cerdo como la oveja tiene una distribución coronaria más homogénea que el perro y con apenas colaterales lo cual permite unos estudios de isquemia más reproducibles y extrapolables al humano. En el caso del modelo porcino, las colaterales son escasas y se localizan en el miocardio medio y en el subendocardio, a diferencia del modelo canino donde las colaterales se extienden por epicardio (Weaver y cols., 1986). Aunque muchos de los estudios en

cerdos han utilizado el pinzamiento o constricción coronaria como forma de producir isquemia (White y cols., 1986), se prefiere la oclusión completa al estrechamiento progresivo de una coronaria para reproducir el fenotipo del corazón en insuficiencia cardiaca. De esta forma no solo se deprime la función ventricular si no que a su vez se consigue la activación del sistema neurohormonal (Mukherjee y cols., 2003). Estudios más recientes han examinado el impacto del trasplante de *stem cells* porcinas sobre la contractilidad del miocardio hallándose que eran capaces de mejorar la función contráctil y bioenergética tanto de la zona infartada como de la zona lesionada periinfarto (Zeng y cols., 2007). Así mismo se han realizado estudios en cerdos utilizando factores de crecimiento arteriogénicos y angiogénicos liberados en miocardio infartado demostrándose el restablecimiento de una red estable de colaterales y mejoría de la contractilidad (Lu y cols., 2007).

Una limitación descrita del modelo porcino es su predisposición hacia la arritmogénesis por lo que se han descrito diversos métodos para minimizar ese riesgo tales como una protección meticulosa de la vía aérea y un manejo cuidadoso de la ventilación mecánica, suplementos de electrolitos durante el experimento e incluso la administración de fármacos antiarrítmicos (Mukherjee y cols., 2003).

Por otro lado, los modelos ovinos han contribuido a la comprensión de los efectos de la necrosis regional. Ocluyendo de forma selectiva la arteria descendente posterior y la segunda y terceras marginales, ramas de la arteria circunfleja, se ha

reproducido un infarto posterior en ovejas. Con este modelo y mediante ultrasonomicrometría, implantando los cristales alrededor del anillo mitral y músculos papilares, se ha demostrado la incompetencia de la válvula mitral y su contribución al remodelado ventricular postinfarto (Gorman J y cols., 1998). Utilizando técnicas similares, Jackson y cols. (2002) demostraron, en un modelo ovino, que el miocardio hipocontráctil pero bien perfundido de la zona limítrofe a la región infartada se va extendiendo hasta incluir miocardio contiguo normal, contribuyendo a la dilatación progresiva (remodelado) que sufre el ventrículo izquierdo tras un infarto.

También el modelo ovino tiene limitaciones, relacionadas en parte con su anatomía, que los hace de acceso difícil a las técnicas de imagen como la ecocardiografía debido a su contorno torácico. Además es una especie con predisposición a las zoonosis (Gorman y cols., 1998; Jackson y cols., 2002).

Modelos de sobrecarga

En modelos experimentales en animales grandes una forma de crear una situación de sobrecarga de volumen es mediante la rotura o distorsión del aparato subvalvular mitral, creando una regurgitación hemodinámicamente significativa (Carabello y cols., 1989; Spinale y cols., 1993). Hace dos décadas y media, Kleaveland y cols. (1988) diseñaron un modelo canino de regurgitación mitral con tórax cerrado y animal anestesiado, mediante la disrupción, vía arterial, del aparato subvalvular. Este modelo sirvió de base a estudios posteriores, en los cuales se conseguía una dilatación

ventricular izquierda y activación neurohormonal que reproducía el fenotipo de la insuficiencia cardiaca por sobrecarga de volumen y que sirvió, entre otros hallazgos, para demostrar la interacción entre el bloqueo beta-adrenérgico y la liberación de angiotensina en el intersticio del miocardio (Tsutsui y cols., 1994; Young y cols., 1996; Tallaj y cols., 2003).

En cuanto a los modelos de sobrecarga de presión en animales grandes, uno de los trabajos clave fue el de Weber y cols. publicado en 1987 y realizado sobre primates a los que se causaba hipertensión mediante una perinefritis experimental. Estos autores reprodujeron los cambios que sufre el miocardio y la matriz extracelular en la hipertrofia ventricular izquierda secundaria en humanos y la relacionaron con la disfunción diastólica. Otros estudios que han intentado reproducir el fenotipo de la insuficiencia cardiaca por sobrecarga de presión han utilizado perros mediante la constricción de las arterias renales (Nguyen y cols., 1993) y la creación de una estenosis aórtica (Alyono y cols., 1986).

Modelos de miocardiopatía dilatada.

El modelo animal mejor caracterizado y reproducido de miocardiopatía dilatada es el de taquimiocardiopatía (Whipple y cols., 1962; Moe y cols., 1988; Tanaka y cols., 1992). Numerosos estudios han utilizado la sobreestimulación rápida, ya sea auricular o ventricular, en perros, cerdos y ovejas para desarrollar modelos de miocardiopatía dilatada, en los que no solo se reproduce los cambios estructurales de esta entidad si no también las alteraciones en el

sistema neurohormonal. Así, como ejemplo, el péptido natriurético auricular fue identificado en un modelo de taquimiocardiopatía experimental, lo que contribuyó a su establecimiento como marcador diagnóstico en la insuficiencia cardiaca (Moe y cols., 1989). También se ha demostrado, mediante sobreestimulación rápida, deterioro en la función de miocardiocitos aislados con reducción de la densidad de receptores beta (Calderone y cols., 1991).

El modelo de taquimiocardiopatía también ha servido para evaluar nuevas estrategias terapéuticas como el uso de la inhibición del enzima convertidor de la angiotensina y de los bloqueadores del receptor de la angiotensina II (Spinale y cols., 1997; Cohn y cols., 2001) o técnicas quirúrgicas de remodelado ventricular (McCarthy y cols., 2001).

Sin embargo, los modelos de insuficiencia cardiaca basados en la sobreestimulación rápida no llegan a reproducir todo el espectro del fenotipo del corazón insuficiente. Es decir, aunque en el modelo por taquicardia se produce dilatación ventricular y disfunción contráctil semejante a lo que ocurre en la miocardiopatía dilatada, estos cambios estructurales no son iguales que los que ocurren cuando son otras etiologías las causantes del fallo cardiaco. Este es el caso de la miocardiopatía isquémica o por sobrecarga de volumen. Además, la función ventricular acaba recuperándose en el modelo de taquimiocardiopatía, fenómeno característico de este modelo.

En un intento de desarrollar modelos que reflejen de forma más real el proceso fisiopatológico de la insuficiencia cardiaca en

humanos, Shen y cols. (1999) desarrollaron un modelo en cerdos no anestesiados que incluía la obstrucción secuencial de la arteria circunfleja con un oclisor hidráulico previamente implantado, de modo que se le causaba al miocardio dos zonas de necrosis: la primera, más pequeña, causada por la oclusión de la arteria primera marginal, rama de la circunfleja; la segunda, 48 horas después, era más extensa y englobaba a la zona anterior, por oclusión de la arteria circunfleja proximal. De 1 a 5 días después se iniciaba la sobreestimulación ventricular desde ventrículo derecho a una frecuencia de 220 latidos por minuto, manteniéndola durante 7 días. La sobreestimulación se repetía otras dos veces, dejando periodos de 3 días de descanso entre ellas. Los autores eligieron el protocolo de sobreestimulaciones intermitentes porque si prolongaban más de una semana la taquicardia, se producía una depresión muy severa de la función ventricular y una alta mortandad entre los animales. Con este modelo consiguieron que tras 21 días del último ciclo de sobreestimulación, el corazón seguía manteniendo el fenotipo de miocardiopatía dilatada, y no recuperaba las dimensiones y contractilidad como sí lo hacía la serie control a la que solo se sobreestimulaba. De esta forma se reproducía mejor el corazón insuficiente de la miocardiopatía isquémica que con los modelos en animales grandes de necrosis regional, que son capaces de alterar la función ventricular pero de forma ligera o moderada.

6.3.- Medición de la función contractil del miocardio en experimentación.

6.3.1.- Función contráctil regional: sonomicrometría.

Desde que el miógrafo de cápsula óptica fue utilizado hace casi 80 años por Tennant y Wiggers (1935) para describir el abombamiento sistólico que se producía en una región miocárdica del ventrículo izquierdo al ocluir la coronaria que lo irrigaba, otras técnicas como la cinematografía de alta velocidad (Prinzmetal y cols., 1949), los arcos medidores de tensión epicárdicos (Pashkow y cols., 1977), la ecocardiografía con transductor fijo externo (Kerber y cols., 1976), los medidores de longitud de mercurio (Wyatt y cols., 1976), la angiografía (Rigaud y cols., 1979) y la ecocardiografía bidimensional (Andrés, 2001) se han utilizado con éxito para cuantificar las variaciones en la contractilidad de los ventrículos durante la isquemia.

Sin embargo, el patrón oro para medir las dimensiones miocárdicas con una resolución temporal y espacial razonable es la sonomicrometría, lo que requiere el implante quirúrgico de dos transductores ultrasónicos (Theroux y cols., 1974; Heusch y cols., 2011).

La sonomicrometría es una técnica que permite medir la distancia entre dos cristales piezoeléctricos, uno emisor y otro receptor y se basa en la velocidad de las señales acústicas a través del medio en el que se transmiten de tal manera que el tiempo que le lleva al ultrasonido desde el cristal emisor al receptor es traducido en

distancia. Esta técnica fue utilizada inicialmente para medir las dimensiones ventriculares por Rushmer y cols. (1956) y posteriormente desarrollada por Bugge-Asperheim y cols. (1969) y Thérooux y cols. (1974) y utilizada ampliamente con posterioridad, incluido nuestro grupo (Heyndrickx y cols., 1975; Ning y cols., 1990; Pallarés y cols., 1997; Hernández y cols., 2008).

Con este método el grosor de la pared miocárdica se mide mediante un transductor implantado en el miocardio, cercano a la superficie del endocardio y otro implantado en el subepicardio. Para medir la longitud de un segmento miocárdico, se implantan dos transductores encarados paralelos a la orientación de las fibras miocárdicas, y ubicados a mayor o menor profundidad en el miocardio lo que permite conocer la excursión de las fibras a nivel subendocárdico, mesomiocárdico o subepicárdico. Además, se pueden implantar transductores en lugares opuestos de la cavidad ventricular de tal manera que se pueden medir las dimensiones ventriculares externas o internas durante el ciclo cardiaco (Theroux y cols. 1974; Sasayama y cols., 1976).

Utilizando el Doppler, se puede evitar el trauma que supone implantar dos electrodos intramiocárdicos ya que basta un transductor epicárdico para medir el desplazamiento de la pared ventricular. Sin embargo, aunque con esta técnica se puede calcular el movimiento de la pared de forma indirecta mediante la integración de la velocidad, no mide el grosor de la pared en términos absolutos (Zhu y cols., 1986).

La función contráctil regional se suele expresar como el engrosamiento sistólico de la pared o como el acortamiento sistólico de un segmento de miocardio. El cálculo de estos parámetros requiere conocer exactamente el inicio y final de los intervalos sistólico y diastólico lo cual se calcula a partir la derivada de la señal de presión del ventrículo izquierdo, del electrocardiograma o del flujo aórtico (Sasayama y cols., 1976). Tanto el grosor como la longitud del segmento miocárdico se calculan como la excursión durante la sístole dividido por el grosor o la longitud del segmento al final de la diástole. Este método no solo es aplicable a animales con tórax abierto, si no también a animales intervenidos y despiertos a los que se les externaliza los cables.

6.3.2.- Técnicas no invasivas de imagen.

Actualmente, el avance en las técnicas de imagen ha permitido que se pueda medir de una forma no invasiva tanto la función contráctil regional como la perfusión del miocardio con una resolución temporo-espacial suficiente y en animales con tórax cerrado. La ecocardiografía se viene utilizando durante mucho tiempo para visualizar y medir las dimensiones ventriculares y su movimiento, pero sigue siendo operador dependiente y requiere una ventana ultrasónica suficiente lo cual no siempre es fácil de conseguir. El Doppler tisular cuantifica la velocidad del movimiento miocárdico regional y tiene una sensibilidad mejor para detectar disfunción miocárdica, como se ha demostrado en cerdos (Derumeaux y cols., 1998). También en cerdos se ha utilizado la

ecocardiografía de contraste con inyección de microburbujas lo que permite aumentar la definición del borde subendocárdico (Mor-Avi y cols., 2001). La reaparición de microburbujas y su destrucción controlada mediante pulsos de ultrasonidos de alta energía permite medir el flujo sanguíneo miocárdico e incluso áreas sin flujo tras episodios de isquemia-reperfusión (Wei y cols., 1998; Kaul, 2006).

La resonancia nuclear magnética se ha utilizado para la cuantificación del edema intersticial en miocardio porcino sometido a isquemia/reperfusión (García-Dorado y cols., 1993). También se ha utilizado el realce tardío con gadolinio en perros y cerdos para estudios de viabilidad postinfarto (Fieno y cols., 2000; Carlsson y cols., 2010). También la tomografía de emisión de positrones, la única técnica no invasiva que permite medir la perfusión miocárdica real, expresada como flujo por masa de tejido, ha sido utilizada aunque en centros muy especializados (Nekolla y cols., 2009).

**JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y
OBJETIVOS**

Un episodio de isquemia miocárdica aguda puede desencadenar insuficiencia cardiaca, siendo el aturdimiento miocárdico uno de los mecanismos implicados.

Además, durante o tras un episodio de isquemia miocárdica aguda pueden generarse taquiarritmias que pueden empeorar el cuadro clínico del fallo cardiaco.

La identificación de los mecanismos de respuesta miocárdica a diferentes tipos de isquemia seguidas de una taquicardia puede ayudar a comprender su papel en el desarrollo de la disfunción ventricular.

Por lo tanto, el desarrollo de un modelo animal que permita estudiar el posible efecto aditivo de la isquemia miocárdica aguda y de frecuencias ventriculares elevadas sobre la función del ventrículo izquierdo estaría justificado.

La hipótesis que ha motivado el presente trabajo ha sido:

“El efecto que sobre la función del ventrículo izquierdo produce una frecuencia cardiaca suprafisiológica tras un episodio de isquemia miocárdica depende de la duración y/o repetición de dicha isquemia”

El objetivo principal de la presente tesis es el estudio de las alteraciones de la función ventricular izquierda en un modelo animal de sobreestimulación ventricular precedida por diferentes protocolos de isquemia-reperfusión.

Para comprobar la hipótesis de trabajo nos hemos marcado los siguientes objetivos específicos:

- 1) Comprobar si una sobreestimulación ventricular de dos horas de duración, a una frecuencia un 60% superior a la inicial, es capaz de producir alteraciones en la función del ventrículo izquierdo una vez cese la taquicardia.
- 2) Estudiar los efectos que sobre la función ventricular izquierda tienen 3 modelos de isquemia/reperfusión seguidos de una sobreestimulación ventricular durante dos horas a una frecuencia un 60% superior a la inicial.
- 3) Estudiar las variaciones de la concentración de lipoperóxidos y de la actividad antioxidante del plasma en cada uno de estos modelos de isquemia y taquicardia.
- 4) Analizar la correlación entre las alteraciones funcionales y el estrés oxidativo en cada uno de estos modelos.
- 5) Determinar qué modelo de los estudiados es más apropiado como modelo experimental en el estudio de la insuficiencia cardiaca aguda.

METODOLOGÍA

1. Material.

1.1. Animales de experimentación. Normativa.

Se han utilizado un total de 24 cerdos jóvenes de ambos sexos (7 machos y 17 hembras), con un peso medio de 24,5 kg. (DE 3,3), procedentes de una granja de crianza de animales para experimentación y que han sido estabulados en la Unidad de Veterinaria del Centro de Investigación del Hospital La Fe de Valencia. La explotación, transporte, experimentación y sacrificio de los animales se realizó de acuerdo a la legislación vigente según la Ley 32/2007 de 7 de noviembre (BOE nº 268, de 8 de noviembre, p. 45914) que desarrolla el Real Decreto 1201/2005 de 10 de octubre, sobre “Protección de los animales utilizados para experimentación y otros fines científicos” (BOE nº 252, de 21 de octubre, p. 34367), que a su vez traspone y desarrolla la Directiva 86/609/CEE. Además el presente estudio cumple el Decreto 13/2007 de 26 de enero del Consell de la Generalitat Valenciana (DOCV nº 5439, de 30 de enero de 2007, p. 5185) que regula la normativa nacional y europea en el ámbito de la Comunidad Valenciana.

Los procedimientos quirúrgicos y la manipulación de animales fueron realizados por investigadores en posesión del título de ámbito europeo de formación en experimentación animal.

El protocolo de experimentación ha sido aprobado por el Comité de Ensayos con Animales de Experimentación del Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe de Valencia.

1.2. Área de experimentación.

Todos los experimentos se realizaron en un quirófano destinado a la cirugía experimental en animales, ubicado en el Centro de Investigación del Hospital Universitario La Fe (figura 7).



Figura 7: Vista general del área de experimentación.

1.3. Material quirúrgico.

El instrumental quirúrgico empleado fue el siguiente:

- Mesa de quirófano.
- Bisturí eléctrico KYRTO 280 para corte y cauterización.
- Bisturís de un solo uso.
- Pinzas de disección modelo corriente rectas 1x2 dientes y sin dientes.
- Pinzas Hemostáticas Crile-Slim y Pean-Slim.
- Pinzas hemostáticas Halsted y Hartmann.

- Tijeras para cirugía general y vascular Metzembraun-Slim.
- Pinzas de campo Backhaus.
- Separador autoestático para esternón Finochietto.
- Clamp vascular atraumático “Bull-Dog”.
- Aspirador Red-O-Pack VIGON.
- Jeringas desechables de 5 y 10 cc.
- Aguja de punción trocar (calibre 1,6 mm).
- Llaves de tres vías.
- Porta-agujas Mayo-Hegar .
- Costótomo.
- Manta eléctrica para mantenimiento de temperatura.

1.4. Ventilación mecánica.

- Laringoscopio: mango porta-pilas (diámetro 30 mm, longitud 14 cm) y espátula # 4-130 mm.
- Tubo endotraqueal Rüsck con balón de calibre 5,5-6 (D-I).
- Respirador Volumétrico TEMEL, adaptado para utilización en anestesia, con rotámeros paralelos que permiten ajustar la mezcla gaseosa de oxígeno y protóxido de nitrógeno durante el experimento (figura 8).
- Vaporizador (ABBOT) de Sevorane[®] conectado al respirador.

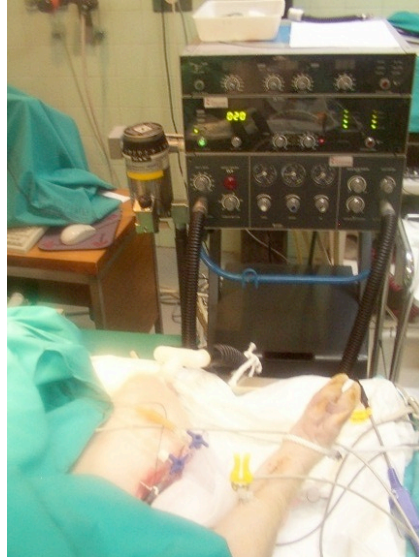


Figura 8.- Respirador volumétrico TEMEL.

1.5. Catéteres y guías.

- Catéteres de vena G 14 L 50 cm. 1,5-2 mm Vygon.
- Catéter transductor de presión MICRO-TIP MILLAR.
- Catéteres de Presión Pigtail 7F (varias marcas).
- Guías de 0,34”.
- Electrocatéter bipolar 4-6F para estimulación cardíaca.
- Cámaras de presión Tanspac IV.

1.6. Medida del flujo coronario y aórtico.

- Medidor de Flujo para investigación animal Modelo T206 Serie T206X-93-0480, Transonic Systems Inc. USA con Doble canal 16 lbs., 90-130 volts., 50-60 Hz.

- Sondas de medición de flujo. Transonic Flowprobe 2S con reflector en L de 1,5-2 mm para arterias coronarias y Transonic Flowprobe 16SB de 16 mm para raíz aórtica.

1.7. Medidores de función regional miocárdica.

- Microcristales piezoeléctricos Sonometrics.
- Medidor ultrasónico de movimiento Sonometrics Corporation Digital Ultrasonic Measurement System TRX Serie 6.
- Ordenador personal conectado al medidor Sonometrics.
- Conexiones con sistema de registro BIOPAC.

1.8. Registro de señales.

- Sistema de registro digitalización y almacenamiento en memoria electrónica de señales BIOPAC Systemc Inc. Con canales para registro de ECG, presiones, flujo sanguíneo y sonomicrometría.
- Monitor-Desfibrilador Cardio-AidTM100 (Artema) con monitorización de ECG continua y palas internas y externas para desfibrilación eléctrica.
- Pulsioxímetro conectado a Monitor-desfibrilador.

1.9. Sistema de electroestimulación.

- Arrhythmia Investigation System Type 4279 DEVICES, Hertfordshire, UK.

1.10. Bombas de infusión continua.

- Bomba de infusión continua Braun Percusor Melsungen A.G.

1.11. Fármacos y fluidos.

- Mantenimiento de una vía periférica.
 - Suero fisiológico.
- Mantenimiento de presión venosa central estable.
 - Dextrano de peso molecular medio.
- Lavado de catéteres y muestras cardíacas.
 - Suero fisiológico.
 - Heparina sódica.
- Fármacos para anestesia y analgesia.
 - Midazolán (Hidrocloruro de midazolam).
 - Ketolar[®] (Hidrocloruro de Ketamina).
 - Tiopental.
 - Cloruro mórfico.
 - Norcurón[®] (Bromuro de Vecuronio).
 - Protóxido de Nitrógeno.
 - Oxígeno.
 - Sevorane[®] (sevoflurano).

1.12. Eutanasia del animal.

- La eutanasia se realizó con el animal bajo anestesia general y analgesia, mediante estimulación a alta frecuencia (150 x 5

estímulos por minuto) con DEVICES, Arrhythmia Investigation System Type.

1.13. Estudios bioquímicos.

- Lipid Hydroperoxide Assay kit. Cayman Chemicals.
- Glutathione Assay Kit. Cayman Chemicals.
- Un espectrofotómetro
- Una pipeta ajustable
- Fuente de agua destilada.
- Cloroformo y metanol.
- Un lector de placa con un filtro de 500, 405, 340 nm

2. Preparación experimental.

2.1. Preparación de los animales de experimentación.

Los cerdos procedieron de un centro suministrador de animales de laboratorio registrado en la Consellería de Agricultura, Pesca y Alimentación de la Generalidad Valenciana. Dichos animales cumplieron las condiciones que sobre protección de los animales de experimentación están establecidas por la Administración y que han sido nombradas en el punto 1.1 de este capítulo.

A su llegada al estabulario del Centro de Investigación fueron valorados por personal Veterinario especializado. Esta valoración consistió en exploración clínica, registro de la documentación sanitaria y cuarentena de al menos una semana de

duración. El cuidado y todo el procedimiento experimental lo realizó personal competente acreditado por la misma Consellería.

Antes de la realización del protocolo experimental los animales fueron sometidos a un ayuno de alimentos sólidos de 12 horas.

2.2. Criterios de exclusión de animales.

- Enfermedades descubiertas a su llegada o durante su estancia al estabulario.
- No finalizar o cumplir el protocolo experimental por alguna de las siguientes razones:
 - Muerte del animal por asistolia.
 - Necesidad de cardioversión eléctrica por fibrilación ventricular (FV).
 - Bradicardia extrema.
 - Necesidad de apoyo inotrópico intravenoso para mantener la contractilidad miocárdica.
 - Hipertermia maligna. Los criterios diagnósticos de hipertermia maligna utilizados fueron: temperatura rectal \geq a 41°C, taquicardia excesiva y contractura en extensión de miembros inferiores (Buzello y cols., 1985).
 - Shock hipovolémico como consecuencia de la intervención.

2.3. Anestesia.

Tras canalizar, con una cánula intravascular (Vasocan Braunüle[®]) de 0,8 mm de diámetro, la vena lateral de la oreja derecha del animal, se indujo la anestesia mediante la administración en forma de bolo IV de midazolán (0,6 mg/kg de peso), ketolar (10 mg/kg de peso) y tiopental sódico (30 mg/kg de peso). Una vez inducida la anestesia, con el animal sedado y relajado en apnea, se procedió a intubación orotraqueal y conexión inmediata a ventilación mecánica.

La ventilación se mantuvo durante todo el experimento con una mezcla de 60% de oxígeno y 40% de protóxido de nitrógeno, en forma mecánica controlada, con un volumen-minuto de 4,5-6 litros; presión de insuflación de 30-40 mmHg y con una frecuencia de 16-20 respiraciones por minuto. Como anestésico gaseoso se administró Sevorane[®] al 2,5% con vaporizador conectado al respirador. Se realizó pulsoximetría continua y controles gasométricos periódicos para vigilancia de parámetros ventilatorios.

Se procedió a la disección de la vena yugular externa izquierda como vía de acceso intravenosa para la obtención de muestras sanguíneas y la administración de fármacos y fluidos (figura 9), teniendo la precaución de desechar la primera muestra para evitar la dilución. Se administró en bolo IV cloruro morfíco (20 mg) y Norcuron[®] (0,08 mg/kg). Durante todo el experimento se mantuvo la relajación muscular y la analgesia mediante la administración continua en bomba de perfusión de Norcurón[®] (0,08

mg/kg) y cloruro mórfico (20 mg) en dilución con suero fisiológico (hasta alcanzar 50cc) a una velocidad de 6 ml/hr.



Figura 9.- Detalle de la cánula y juego de llaves en vena yugular externa para administración de medicación y toma de muestras.

2.4. Monitorización ECG periférico.

El día de realización del experimento y una vez anestesiado el animal y colocado en decúbito supino, para el registro de derivaciones estándar del electrocardiograma se fijó un electrodo-aguja a cada una de sus extremidades mediante punción en tejido celular subcutáneo (figura 9). Esto permitió obtener un registro electrocardiográfico continuo en el sistema BIOPAC y en el monitor-desfibrilador

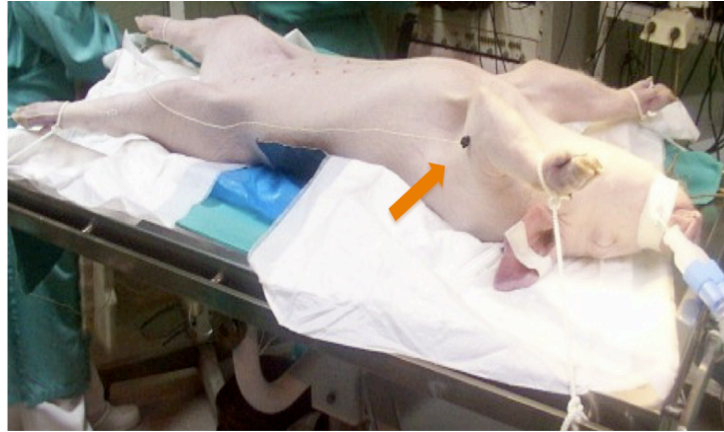


Figura 10.- Monitorización ECG mediante electrodos de aguja.

2.5. Esternotomía media.

En condiciones de asepsia se realizó una esternotomía media mediante incisión de piel, tejido celular subcutáneo y plano muscular con bisturí eléctrico (figura 11) cortando longitudinalmente el esternón con el costótomo hasta alcanzar el pericardio. En todo momento se realizó hemostasia mediante electrocoagulación.

Durante todo el experimento el tórax permanece abierto, con el separador Finochietto, procurando que la temperatura se mantenga constante (37-38° C) mediante el uso de lámparas de calor y manta eléctrica colocada debajo del animal, y manteniendo la superficie epicárdica húmeda mediante lavados periódicos con suero fisiológico estéril calentado a 37 °C.

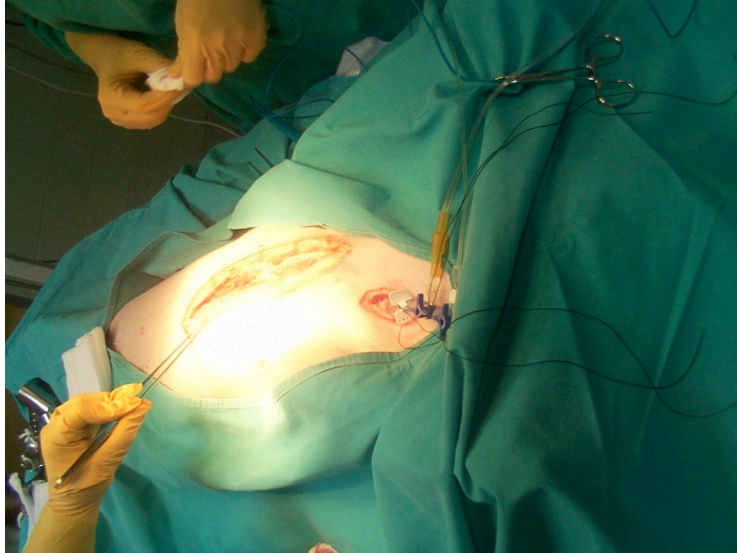


Figura 11.- Incisión previa a la esternotomía.

2.6. Pericardiotomía.

Tras abrir el esternón, se realizó pericardiotomía estéril dejando expuesto el epicardio para la disección de la arteria coronaria descendente anterior y la implantación de dispositivos de medida.

2.7. Disección y oclusión coronaria.

Tras la disección de la arteria coronaria descendente anterior (CDA) en su tercio proximal y en su tercio medio, se procedió a la colocación de un medidor de flujo (Transonic Systems) en la zona proximal y una referencia mediante un lazo atraumático para la posterior realización de oclusiones coronarias en el segmento medio. Las oclusiones se realizaron mediante pinza (clamp) vascular,

ayudándonos para su colocación del lazo que previamente se había pasado alrededor de la arteria.

2.8. Implantación de microcristales piezoeléctricos.

Situación de los microcristales

Se implantaron, en todos los casos, dos pares de microcristales, siguiendo el eje longitudinal del corazón situándose en:

a) Zona isquémica: territorio irrigado por la CDA. Los cristales se implantaron en una zona del miocardio dependiente de la arteria a ocluir (descendente anterior), y que se corresponde con el ápex del ventrículo izquierdo.

b) Zona no isquémica: territorio irrigado por la arteria circunfleja (CCx), se corresponde con la base del ventrículo izquierdo.

Los microcristales fueron implantados para poder medir el acortamiento longitudinal regional, encarados, paralelos a la orientación de las fibras miocárdicas y a la misma profundidad en el miocardio que en todos los animales fue el 1/3 subendocárdico (figura 12).

Técnica de implantación

Aunque a simple vista se diferencian bien las dos zonas, antes de implantar los microcristales se confirmaban mediante una

breve interrupción del flujo por oclusión de la arteria y visualización del área de cianosis y discinesia.

Para su implante se realizaba en primer lugar, y utilizando una aguja de calibre adecuado (1,6 mm), una pequeña punción epicárdica en las zonas preseleccionadas para su colocación. A continuación y ayudándonos del soporte plástico que llevan los cristales, se introducían éstos.

La adecuada colocación de los microcristales se comprobaba mediante la correcta morfología de las señales ultrasónicas. La separación entre ambos cristales fue de 1,5 cm. Tras el sacrificio del animal se verificaba la localización de los microcristales mediante visualización directa.

2.9. Implantación de las sondas de medición de flujos (figura 12).

Tras disección de la raíz aórtica, y separación cuidadosa de la arteria pulmonar, se implantó la sonda de flujo aórtico abrazando la arteria justo por encima de los ostia coronarios.

Igualmente, mediante disección y separación muy cuidadosa del epicardio, se implantó la correspondiente sonda para medir el flujo en la arteria descendente anterior, eligiendo una zona proximal al lugar donde se iba a realizar la ligadura de la misma.

2.10. Medida de la presión intraventricular.

Para la medición de la presión ventricular izquierda durante el acto quirúrgico se procedió, mediante punción, a la colocación de

un microcatéter en cámara ventricular a través de su pared. Se eligió para su inserción el ápex del ventrículo izquierdo (figura 12).

2.11. Fijación del electrocatéter para sobreestimulación.

Se fijó un electrocatéter bipolar mediante sutura en una zona de la pared libre del ventrículo izquierdo equidistante a las zonas de implante de los pares de cristales piezoeléctricos de la base y punta del ventrículo izquierdo (figura 12).

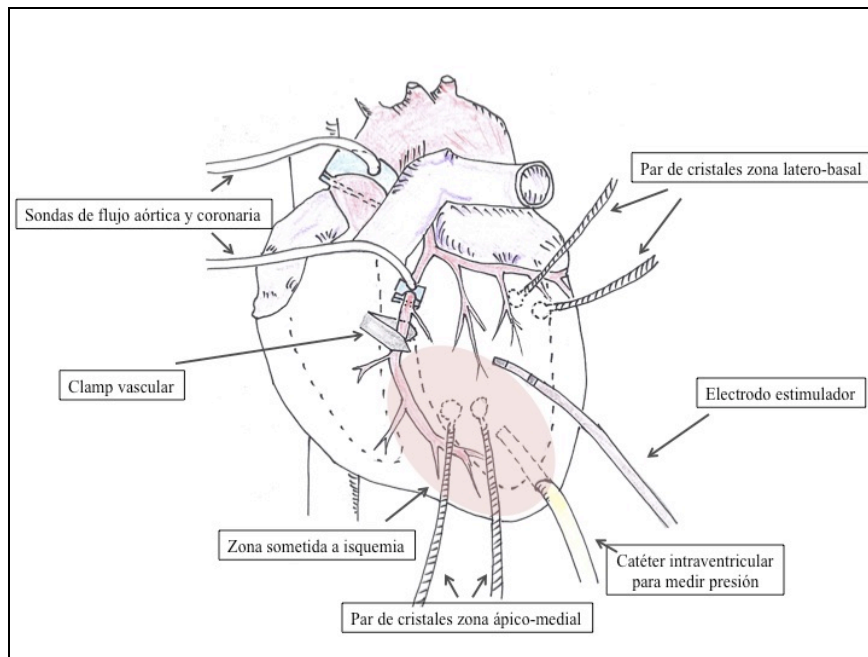


Figura 12.- esquema del modo como quedan implantados todos los dispositivos de medida y el electrodo de electroestimulación.

2.12. Calibración de los diversos registros.

Antes de iniciar cada experimento, se realizan calibraciones de los diversos registros con las escalas que siguen a continuación.

a) Registros electrocardiográficos:

$$1\text{mV} = 1\text{ cm}$$

b) Transductores de Presión:

Con la cámara de presión conectada a un esfigmomanómetro de mercurio, en primer lugar se calibran los ceros respecto a la presión atmosférica y a continuación se calibra a una presión dada de 100 mm Hg; se dan los valores correspondientes en el sistema de registro; posteriormente se ajusta el módulo de presión utilizado para la medida de cavidades izquierdas.

c) Módulo para cálculo de derivadas:

Con el sistema BIOPAC se obtienen las derivadas calculadas a partir de los registros de presión obtenidos.

d) Medidor de flujo coronario y aórtico:

Tanto el medidor de flujo como las sondas de flujo vienen calibrados por el fabricante para uso en experimentos agudos. En cada experimento el test de calibración se realiza de la siguiente forma, de acuerdo a las instrucciones del fabricante:

- Se pulsa el botón “*calibrate zero*”. Cuando la señal está presente y es estable (se requieren unos 10 segundos), aparece una lectura (CZ) en la

ventana que es igual al cero de la amplitud del flujo.

- A continuación se pulsa el botón de calibración de escala (“*calibrate scale*”). Cuando la señal es estable y tras unos segundos se calcula el factor de lectura promedio (CS).
- Entonces el ordenador solicita al operador que introduzca el factor de escala (SF) en ml/min que aparece en la pantalla pudiéndose así calcular el factor de conversión (CF) que convierte las lecturas de la sonda en flujo en ml/min. La fórmula que utiliza la máquina es:

$$CF = SF / (CS - CZ)$$

- Por último, las mediciones pueden así ser convertidas a flujo real mediante la ecuación:

$$\text{Flujo real (ml/min)} = CF (\text{flujo medido} - CZ)$$

El volumen latido se calculó dividiendo el gasto cardiaco por la frecuencia cardiaca.

e) Medidor ultrasónico de movimiento:

El sistema Sonometrics no requiere calibración; para el registro y digitalización en BIOPAC se seleccionó cada par de cristales para cada canal, con los cristales desconectados se obtuvo el valor del cero y con una plantilla se asignó el valor de 16 mm, dando así la escala para el sistema de

registro BIOPAC. En el registro de las curvas se medirá en mm la altura de los puntos de interés de las mismas.

Se fue meticuloso en conseguir una correcta morfología de las curvas de contractilidad con la dirección de los cristales siguiendo la dirección de las fibras y, de no ser así, se modificó la posición de los cristales tantas veces como fue necesario, hasta conseguirlas.

2.13. Estimulación ventricular.

Se fijó un electrocatéter bipolar mediante sutura en una zona de la pared libre del ventrículo izquierdo equidistante a las zonas de implante de los pares de cristales piezoeléctricos de la base y punta del ventrículo izquierdo (figura 12).

Los parámetros de estimulación utilizados fueron:

- Anchura del estímulo 2 mseg.
- Intensidad: al menos doble del umbral.
- Frecuencia: 60% por encima de la frecuencia basal.

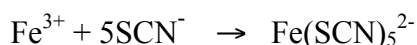
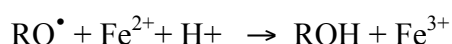
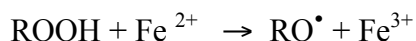
2.14. Análisis bioquímico.

Se obtuvieron muestras de sangre venosa a partir de la vía situada en la vena yugular externa.

Las muestras de sangre se recogieron en 2 tubos de 3 ml con EDTA en cada fase de recogida de muestras; de forma inmediata fueron centrifugadas y el plasma obtenido almacenado en alícuotas que se congelaron a -80°C para su posterior procesamiento y análisis.

a) Determinación de la concentración de peróxidos lipídicos:

La determinación de la concentración en plasma de LPO se realizó utilizando un *kit* comercial (“*Lipid Hydroperoxide (LPO) Assay Kit*”) de la compañía Cayman Chemicals (nº de catálogo 705003). Este método se basa en la medición de hidroperóxidos lipídicos utilizando reacciones redox con iones ferrosos (Mihaljevic y cols., 1996)



$$\lambda_{\text{max}}: 500 \text{ nm}$$

$$\epsilon: 16,667 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

Como este método está basado en la medición de iones férricos durante la reacción descrita, la presencia de iones férricos en la muestra es una fuente potencial de error. Así mismo, muchas muestras biológicas contienen hidróxido de hidrógeno que puede reaccionar con los iones ferrosos y producir una sobreestimación de la presencia de LPOs. Estos problemas se solucionan fácilmente realizando la prueba con cloroformo (incluido en el *kit*).

El ensayo se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante (www.caymanchem.com/pdfs/705003.pdf).

b) Determinación de la actividad antioxidante: actividad glutatión.

El estudio de la actividad glutatión total, la reducida (GSH) y la oxidada (GSSG) se realizó utilizando un *kit* comercial (*Glutathione Assay Kit. Cayman Chemicals*, nº de catálogo 703002).

Brevemente, este kit utiliza un método enzimático utilizando la glutatión reductasa para cuantificar el GSH (Griffith, 1980; Baker y cols., 1990)

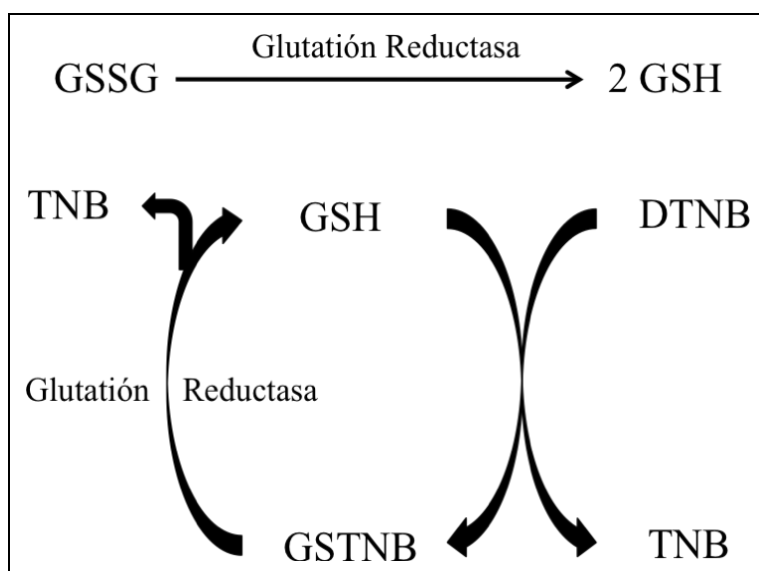


Figura 13.- Método de la glutatión reductasa para cuantificar el glutatión reducido (GSH). Modificado de Baker y cols. *Anal. Biochem.* 1990; 190:360-365.

El grupo sulfidrilo del GSH reacciona con DTNB (5,5'-ditiobis-2-(ácido nitrobenzoico), o reactivo de Ellman) y produce un ácido 5-tio-2-nitrobenzoico (TNB) de color amarillo. La mezcla GSTNB (GSH + TNB) producida es reducida por la glutatión reductasa reciclándose el GSH y produciendo más TNB. La tasa de

producción de TNB es directamente proporcional a su reacción de reciclamiento, la cual es a su vez directamente proporcional a la concentración de GSH en la muestra.

El GSH se oxida fácilmente al dímero GSSG el cual se produce durante la reducción de hidroperóxidos por la glutatión peroxidada. GSSG se reduce a GSH por la glutatión reductasa. Debido a que la glutatión reductasa se utiliza en este *kit*, tanto GSH como GSSG pueden medirse por lo que el ensayo refleja el glutatión total. La metodología del ensayo viene especificada en las instrucciones del *kit* (www.caymanchem.com/pdfs/703002.pdf).

3. Metodología experimental.

3.1. Series.

El estudio ha incluido cinco series.

- Serie *sham*: estos animales se prepararon e instrumentalizaron pero no se les causó isquemia ni se sometieron a sobreestimulación. El tamaño muestral de esta serie se estimó en 4 cerdos válidos.
- Serie sin isquemia pero con taquicardia producida mediante sobreestimulación ventricular. se calculó un tamaño muestral para esta serie de 5 cerdos válidos.
- Series con isquemia, por oclusión completa de la CDA, seguida de sobreestimulación ventricular (tamaño muestral de 5 animales válidos en cada serie):

- Serie con una isquemia continua de 10 minutos de duración.
- Serie con una isquemia continua de 20 minutos de duración.
- Serie con 20 isquemias breves (de dos minutos de duración) separada cada isquemia por 3 minutos de reperfusión.

3.2. Protocolo experimental.

En todas las series se realizó una extracción de una muestra de sangre antes de abrir el tórax, con el animal ya anestesiado.

3.2.1. *Serie ficticia o sham.*

Se realizó la preparación experimental pero sin causar isquemia ni estimular el corazón. Se realizaron medidas de función regional, presiones y flujos cada 30 minutos durante 4 horas. Se extrajeron muestras de sangre antes de abrir el tórax (basal) y luego cada hora.

3.2.2. *Serie con estimulación ventricular y sin isquemia.*

Tras realizar la preparación experimental, se tomaron medidas iniciales de función regional, presiones y flujos y a continuación se estimuló con el electrocatéter el corazón a una frecuencia el 60% superior a la frecuencia cardiaca basal, definida como la frecuencia cardiaca una vez terminada la preparación experimental y estabilizado el animal. El tiempo de estimulación fue

de 120 minutos, realizándose los registros de función regional, presiones y flujos a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Tras el cese de la estimulación, se registraron medidas de función regional, presiones y flujos a los 5, 30 y 60 minutos del cese de la taquicardia. Las extracciones de sangre en esta serie se llevan a cabo antes de abrir el tórax, antes de estimular, a los 60 minutos de la estimulación y a los 5 y 60 minutos del cese de la taquicardia (figura 14).

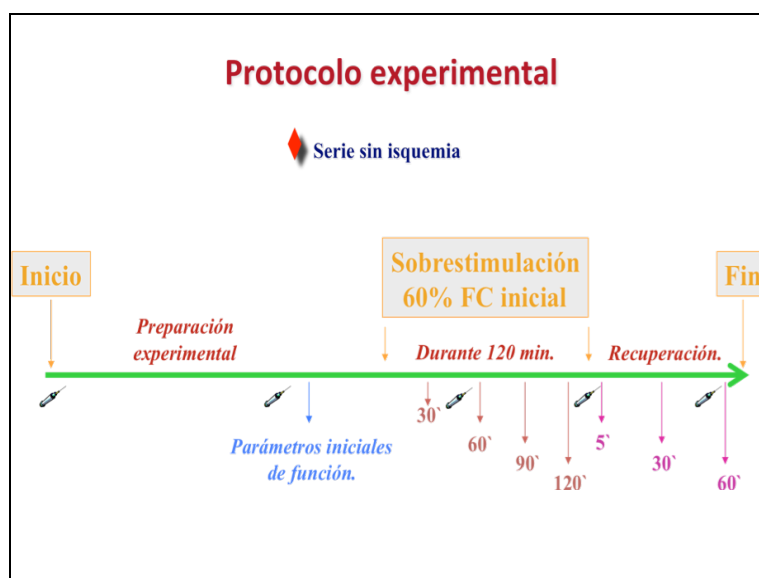


Figura 14.- Protocolo experimental en la serie sin isquemia. Cronograma de mediciones de función global y regional (flechas azules, marrones, y fucsia) y extracción de muestras de sangre (jeringuillas).

3.2.3. *Series con estimulación ventricular y con isquemia:*

3.2.3.1. Isquemia continua de 10 minutos.

Tras realizar la preparación experimental y registrar los parámetros iniciales de función regional, presiones y flujos, se provocó la isquemia por oclusión total con un clamp vascular atraumático en el segmento medio de la CDA. El lazo previamente pasado por debajo de la arteria sirvió de ayuda para el correcto pinzamiento que se mantuvo durante 10 minutos. Se tomaron medidas de función regional, presiones y flujos al minuto 9 de isquemia. Tras liberar la arteria, se registraron las medidas correspondientes y se inició la electroestimulación durante 2 horas, realizándose los registros de función regional, presiones y flujos a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Tras el cese de la estimulación se tomaron medidas de función regional, presiones y flujos a los 5, 30 y 60 minutos. Las extracciones de sangre en esta serie se llevaron a cabo antes de abrir el tórax, en la reperfusión (antes de iniciar la estimulación), a los 60 minutos de la estimulación y a los 5 y 60 minutos del cese de la taquicardia (figura 15).

3.2.3.2. Isquemia continua de 20 minutos.

Tras realizar la preparación experimental y registrar los parámetros iniciales de función regional, presiones y flujos, se realizó la isquemia en la CDA de la forma descrita en la serie anterior, pero durante 20 minutos. Se tomaron medidas de función regional, presiones y flujos al minuto 19 de isquemia. Tras liberar el

oclusor, se registraron los parámetros y se inició la estimulación ventricular con el electrocatéter durante 2 horas, realizándose los registros de función regional, presiones y flujos a los 30, 60, 90 y 120 minutos. Tras el cese de la estimulación se tomaron medidas de función regional, presiones y flujos a los 5, 30 y 60 minutos. Las extracciones de sangre en esta serie se llevaron a cabo antes de abrir el tórax, en la reperfusión (antes de iniciar la estimulación), a los 60 minutos de la estimulación y a los 5 y 60 minutos del cese de la taquicardia (figura 15).

3.2.3.3. Isquemias breves y repetidas.

Tras realizar la preparación experimental y registrar los parámetros iniciales de función regional, presiones y flujos, se llevaron a cabo 20 isquemias completas, de 2 minutos de duración cada una, separadas por periodos de reperfusión de 3 minutos. Se tomaron medidas de función regional, presiones y flujos durante la isquemia número 20. Al finalizar las isquemias se registraron las medidas correspondientes a la última reperfusión y se inició la estimulación ventricular con electrocatéter durante 2 horas con mediciones igual que en la serie anterior. Tras el cese de la estimulación se tomaron medidas a los 5, 30 y a los 60 minutos. Las extracciones de sangre en esta serie se realizaron antes de abrir el tórax, en la reperfusión tras la última isquemia (antes de iniciar la estimulación), a los 60 minutos de la estimulación y a los 5 y 60 minutos del cese de la taquicardia (figura 15).

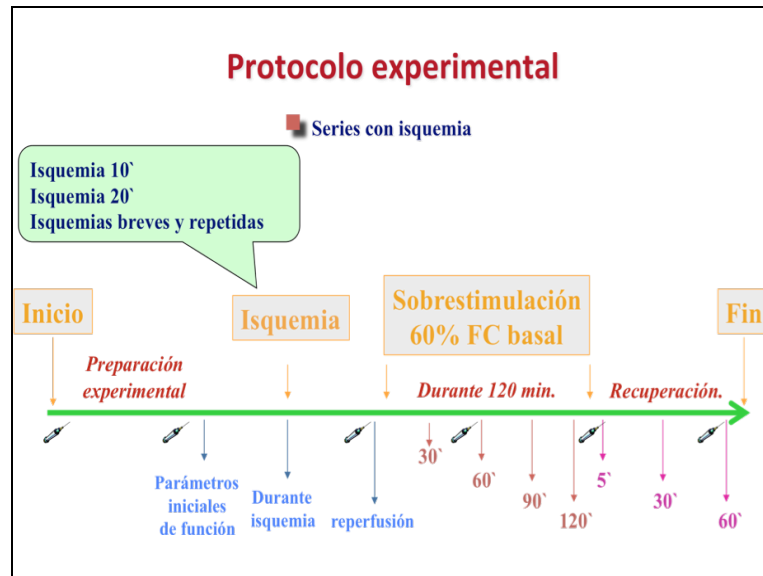


Figura 15.- Protocolo experimental en las series con isquemia. Cronograma de mediciones de función global y regional (flechas azules, marrones, y fucsia) y extracción de muestras de sangre (jeringuillas).

4. Parámetros analizados.

En todos los experimentos fueron analizadas las señales de electrocardiograma periférico, flujo coronario y de raíz aórtica, presión de ventrículo izquierdo, dP/dt, y curvas de función regional. La estandarización y calibración de las diversas señales se realizó antes de iniciar cada experimento y se repitió antes de realizar cada una de las medidas.

4.1. Parámetros de función global.

- Frecuencia cardiaca (lpm) (F.C.)
- Presión sistólica del ventrículo izquierdo (mm Hg) (PSVI).
- Presión telediastólica del ventrículo izquierdo (mmHg) (PTDVI).
- Gasto cardiaco (l/min) (G. C.).
- Volumen latido (ml) (Vol. lat.).
- dp/dt de la presión ventricular izquierda (mmHg/seg).
- Flujo en la arteria coronaria descendente anterior (ml/min) (F. Da.).

4.2. Parámetros de función miocárdica regional.

- Longitudes telesistólica (LTS, en mm) y telediastólica (LTD, en mm) de ambos segmentos (isquémico y control).
- Fracción de acortamiento (F. Ac.) de ambos segmentos (isquémico y control) (%).
- Porcentaje de aumento de la longitud telediastólica (%ALTD) y porcentaje de aumento de la longitud telesistólica (%ALTS).

La dp/dt , parámetro derivado automáticamente de la PVI, se ha utilizado como curva de referencia para la medida de los parámetros de función regional (Theroux y cols., 1974). Así, la LTD se mide tomando como referencia el punto de inicio de la señal positiva de la dp/dt . La LTS se mide a partir del nadir de la deflexión negativa de la dp/dt (figura 16).

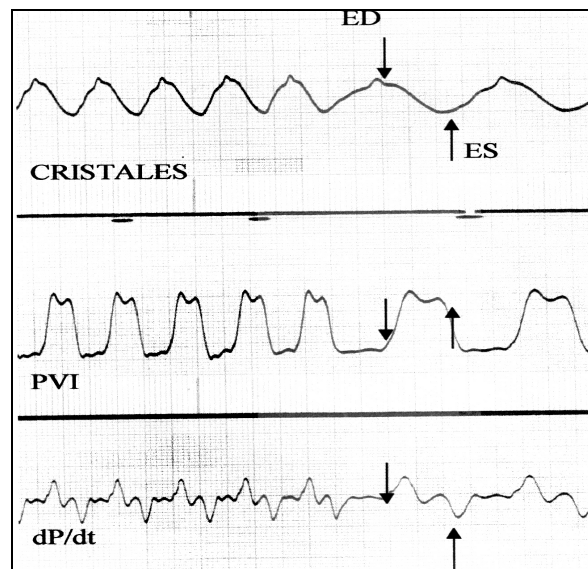


Figura 16.- Diagrama representativo de los trazados utilizados para el cálculo de la función miocárdica regional.

La fracción de acortamiento sistólico (F. Ac.) se calcula aplicando la fórmula:

$$F. Ac. = ((LTD - LTS) / LTD) \times 100$$

El porcentaje de aumento de la longitud telediastólica (%ALTD) se calcula aplicando la fórmula:

$$\%ALTD = ((LTD_{inicial} - LTD_t) / LTD_{inicial}) \times 100$$

(donde LTD_t es la longitud telediastólica en cada uno de los tiempos (t) del protocolo en que se realizan mediciones de la contractilidad.)

El porcentaje de aumento de la longitud telesistólica (%ALTS) se calcula aplicando la fórmula:

$$\%ALTS = ((LTSinicial - LTSt) / LTSinicial) \times 100$$

(donde LTSt es la longitud telesistólica en cada uno de los tiempos (t) del protocolo en que se realizan mediciones de la contractilidad.)

4.3. Parámetros de estrés oxidativo.

Los parámetros estudiados han sido:

- Hidroperóxidos lipídicos (LPOs), en plasma (nmol/l).
- Glutación total, en plasma (μmol/l).
- Glutación reducido (GSH), en plasma (μmol/l).
- Glutación oxidado (GSSG), en plasma (μmol/l).
- Cociente GSH/GSSG, en plasma.

5. Análisis estadístico.

El análisis estadístico se realizó siguiendo los siguientes pasos.

- a) En primer lugar se comprobó y depuró de la base de datos con el objetivo de detectar valores erróneos y proceder a su corrección siguiendo el flujo de trabajo esquematizado en la figura 17.

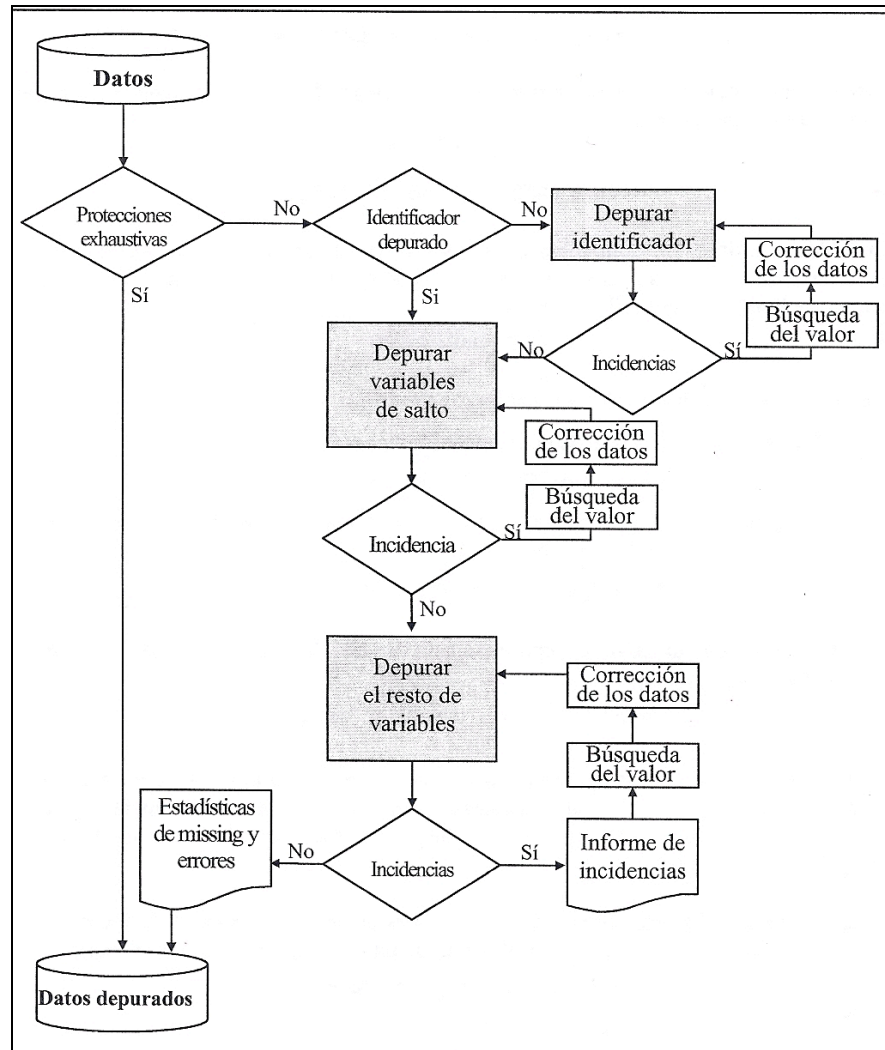


Figura 17: Esquema del flujo depuración de la matriz de datos

b) Los datos se han descrito como media y desviación estándar (DE). No se ha utilizado la mediana y el rango intercuartílico para evitar problemas de espacio en las tablas de resultados. Sin embargo, se comprobó que se cumplía el supuesto de normalidad (pruebas de Kolmogorov-Smirnov y Shapiro-

Wilk). Estos valores (media y DE) se han expuesto en las correspondientes tablas de resultados. También se ha optado por no representar los errores (DE) en las figuras que comparan parámetros o series para facilitar la comprensión de las mismas y porque ya aparecen en las tablas. Para evaluar el cambio porcentual de una variable respecto a su valor inicial se consideró a dicho valor como el 100%.

- c) Para comparar dos medias se utilizó la prueba t de *student* y para comparar más de dos medias el análisis de la variancia si los valores de la variable siguieron una distribución normal. En caso contrario se utilizó la prueba no paramétrica de Mann-Whitney para dos grupos o de Kruskal-Wallis para más de dos grupos. Cuando la comparación global entre grupos fue significativa, la diferencia entre grupos individuales se determinó aplicando la prueba de Tukey.
- d) Se consideró estadísticamente significativo un valor de $p < 0,05$; sin embargo, valores de $p < 0,1$ han sido señalados en las tablas de resultados dada su proximidad a la significación y tratándose de tamaños de muestra relativamente pequeños (4-5 individuos).

RESULTADOS

1. Resultados de función global y regional en cada serie.

1.1. Serie *sham*.

Se utilizaron 4 cerdos. Todos los animales completaron el protocolo de esta serie. La serie la formaron 1 macho y 3 hembras, con una mediana de edad de 2,8 meses (rango intercuartílico 2,5 – 3) y un peso medio de 22,7 kg. (DE 1,7).

1.1.1. Parámetros hemodinámicos y de función global.

No se detectaron cambios significativos en la serie control o *sham* durante las 4 horas que duró la observación en ninguno de los parámetros hemodinámicos evaluados respecto a sus valores iniciales a excepción de la dP/dt -. El valor de esta variable aumentó al final del experimento alcanzado valores en el límite de la significación respecto al inicial (Tabla 3).

	Basal	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
F.C. (l.p.m.)	110 ± 7,2	101 ± 13	102 ± 16	109 ± 15	112 ± 15
Vol. lat. (ml)	24 ± 8	20,1 ± 2,7	22,5 ± 8,8	20 ± 2,9	25 ± 8,6
G. C. (l/min)	2,5 ± 0,9	2,3 ± 1,3	2,5 ± 1,2	2,6 ± 1,3	2,9 ± 1,7
PSVI (mmHg)	67 ± 9	64 ± 15	63 ± 14	65 ± 12	68 ± 19
PTDVI (mmHg)	6,2 ± 1,5	6,2 ± 1,3	7 ± 2,9	7,5 ± 3	7 ± 2,5
dP/dt + (mmHg/s)	1537 ± 320	1500 ± 389	1425 ± 405	1575 ± 405	1700 ± 422
dP/dt - (mmHg/s)	1262 ± 377	1218 ± 504	1300 ± 438	1394 ± 466	1525 ± 510*

Tabla 3.- Parámetros hemodinámicos y de función cardiaca global en la serie *Sham*. Los valores representan media ± DE . * $p \leq 0,05$ respecto al valor inicial.

1.1.2. Parámetros de función regional.

1.1.2.1. Zona dependiente de la CCx.

Como se observa en la tabla 4 la longitud telediastólica (LTD) tendió a reducirse de forma mínima, sin modificarse la longitud telesistólica (LTS), y sin diferencias estadísticas respecto a sus valores iniciales. Esta menor LTD se tradujo en una reducción de la fracción de acortamiento (F. Ac.) regional en la zona control, que tampoco fue estadísticamente significativa.

	Basal	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
LTD (mm)	10,7 ± 0,8	10,6 ± 0,8	10,7 ± 1,1	10,3 ± 1,3	10,3 ± 1,4
%ΔLTD	100 ^S	98,8	99,3	95,9	95,9
LTS (mm)	9,9 ± 1,4	9,8 ± 1,3	10,1 ± 1,1	9,8 ± 1,5	9,8 ± 1,7
%ΔLTS	100 ^S	98,4	109,1	98,8	98,6
F. Ac. (%)	7,7 ± 7	8 ± 6,7	5,7 ± 1,5	5,1 ± 4,2	5,1 ± 4,5
%ΔF.Ac.	100 ^S	103,9	74	66,2	66,2

Tabla 4.- Parámetros de función regional en la zona control (territorio de la arteria circumfleja). Los valores representan media ± DE . ^Svalor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F. Ac.

1.1.2.2. Zona dependiente de la CDA.

Como se observa en la tabla 5 no encontramos diferencias en los parámetros de función regional en el territorio de la arteria descendente anterior a lo largo de la observación en la serie *sham*.

Durante las cuatro horas de observación el flujo coronario medido en la arteria descendente anterior (F. Da.) se mantuvo prácticamente sin modificaciones.

Tanto la LTD como la LTS apenas se modificaron, salvo una reducción de ambas observada a los 60 minutos del inicio del experimento, lo que se tradujo en una reducción significativa de la F. Ac., si bien se recuperó en las siguientes 3 horas de observación.

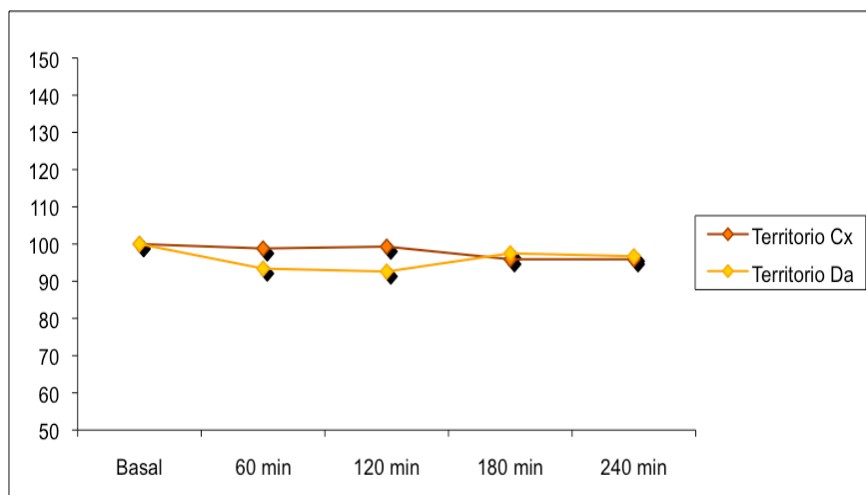
	Basal	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
F. Da. (ml/min)	17,4 ± 1,8	16,7 ± 2,5	16,5 ± 0,8	15,5 ± 0,6	15,6 ± 0,7
LTD (mm)	12,2 ± 1,2	11,4 ± 1	11,3 ± 1,3	11,9 ± 1,4	11,8 ± 1,4
%ΔLTD	100 ^S	93,4	92,6	97,5	96,7
LTS (mm)	10,7 ± 1	10,3 ± 1,2	10,3 ± 1,1	10,7 ± 1,1	10,6 ± 1,2
%ΔLTS	100 ^S	96,2	96,2	99,9	99,1
F. Ac. (%)	12,6 ± 1,8	10,4 ± 1,9*	11,4 ± 1,2	10,2 ± 2,4	11,1 ± 2,2
%ΔF.Ac.	100 ^S	82,5*	90,5	80,9	88,1

Tabla 5.- Parámetros de función regional de la zona dependiente de la descendente anterior. Los valores representan media ± DE. ^S Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. * Valor de $p \leq 0,05$ respecto al valor inicial.

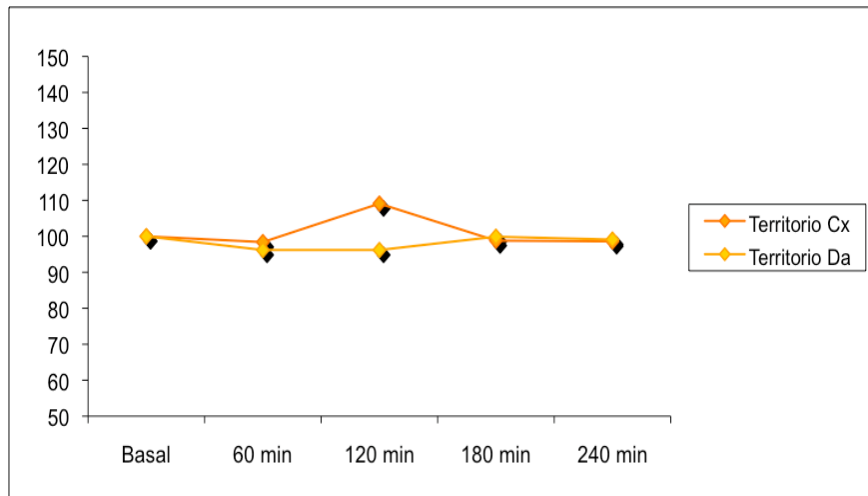
1.1.2.3. Comparación entre zona dependiente de la CDA y la zona dependiente de la CCx.

Cuando comparamos las dos zonas estudiadas, observamos que en la serie *sham* no existieron diferencias significativas en el porcentaje de cambio (respecto al valor inicial) de la LTD (figura 18A) y LTS (figura 18B). La F. Ac. se mantuvo más o menos constante en la zona dependiente de la CDA y tendió a disminuir en la zona dependiente de la CCx (figura 18C) aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas zonas.

A) **Longitud Telediastólica** (% de cambio respecto al valor inicial)



B) Longitud Telesistólica
(% de cambio respecto al valor inicial)



C) Fracción de Acortamiento
(% de cambio respecto al valor inicial)

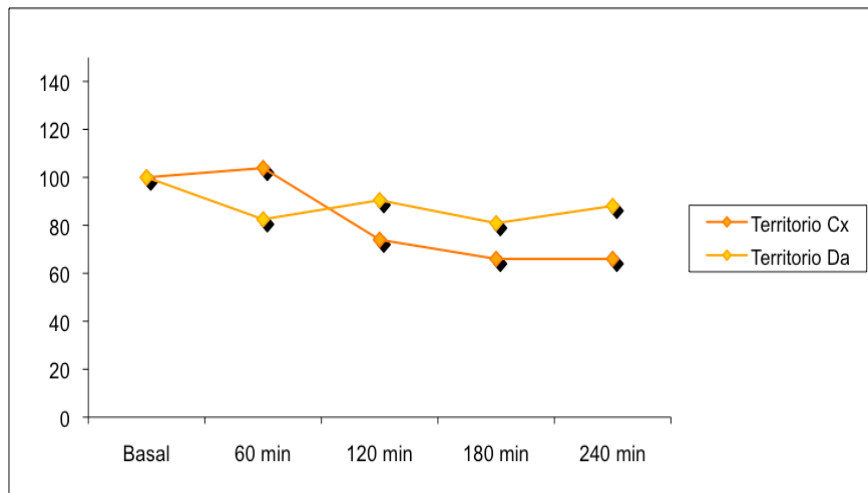


Figura 18 (A, B y C).- Representación de la evolución del cambio porcentual de la longitud telesistólica, telediastólica y fracción de acortamiento de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx en la serie *sham*. Valores de p entre zonas no significativos.

1.2. Serie con estimulación ventricular y sin isquemia.

Se utilizaron 7 cerdos. Cinco animales completaron el protocolo de esta serie. Esta serie estuvo formada por 1 macho y 4 hembras, todos de tres meses de edad y un peso medio de 23,8 Kg. (DE 2,2). De los dos animales excluidos, uno lo fue porque no finalizó el protocolo experimental debido a que sufrió una fibrilación ventricular a los 90 minutos de la sobreestimulación. Se trató de un macho de 4 meses de edad y 27 Kg. en el que la apertura de tórax e implante de dispositivos de medida fue más laboriosa que en el resto de animales de esta serie (100 vs 60 minutos). El otro animal, una hembra de 2 meses y medio y 25 Kg. fue excluida porque, tras una intubación orotraqueal muy laboriosa, la frecuencia cardiaca basal era muy elevada (190 lpm), aparentemente en ritmo sinusal, sin conseguirse su estabilización.

1.2.1. Parámetros hemodinámicos y de función global (tabla 6).

En esta serie se utilizó una frecuencia de estimulación promedio de 162 lpm. Tras el cese de la sobreestimulación, la FC se mantuvo elevada respecto a su valor inicial en los primeros cinco minutos ($p = 0,06$), tendiendo a volver lentamente a sus valores iniciales a los 30 y 60 minutos.

El volumen latido (Vol. lat.) y la PSVI disminuyeron significativamente durante la sobreestimulación. Sin embargo el gasto cardiaco (G. C.) no se modificó. Tras el cese de la taquicardia, el Vol. lat. se recuperó de forma inmediata mientras que el G. C.

permaneció sin cambios. La PSVI se recuperó inmediatamente tras el cese de la taquicardia pero sus valores fueron disminuyendo hasta alcanzar significación estadística respecto al valor inicial a los 60 minutos de la recuperación.

Los cambios en la PTDVI no fueron significativos durante la taquicardia aunque se objetivó un descenso ligero de la misma. La PTDVI no se modificó en la recuperación.

Tanto la dP/dt positiva como la negativa se redujeron significativamente durante la taquicardia. Durante la recuperación, la dP/dt positiva se mantuvo en valores significativamente bajos respecto al valor inicial, mientras que la dP/dt negativa se recuperó.

	Basal	stim60 m	stim120 m	rec5 m	rec30 m	rec60 m
F.C. (l.p.m.)	98 ± 12,5	162 ± 18,7	162 ± 18,7	122,2 ± 7,5	116 ± 21,9	116 ± 20,3
Vol. Lat. (ml)	30,1 ± 2,2	19 ± 4,8*	19,6 ± 6*	31,8 ± 9,1	31,5 ± 7,6	29,5 ± 6,7
G. Card. (l/min)	2,9 ± 0,5	3 ± 0,7	3,1 ± 0,8	4,2 ± 1,7	3,8 ± 1,7	3,5 ± 1,5
PSVI (mmHg)	89,4 ± 11,1	56,8 ± 15,6*	64,4 ± 21,1 [#]	96,6 ± 6,6	80,8 ± 11,1	77,2 ± 16,4*
PTDVI (mmHg)	8 ± 2,1	7,7 ± 2,1	6,7 ± 2,9	9,6 ± 4,3	8,8 ± 2	8,4 ± 2
dP/dt + (mmHg/s)	1730 ± 159	1490 ± 178*	1430 ± 171*	1385 ± 150*	1320 ± 152*	1345 ± 109*
dP/dt - (mmHg/s)	1805 ± 62	1105 ± 289*	1200 ± 272*	1868 ± 123	1612 ± 157*	1736 ± 202

Tabla 6.- Parámetros hemodinámicos y de función global en la serie con estimulación pero sin isquemia. Los valores representan media ± DE. *p ≤ 0,05 respecto a valor inicial. [#] Valor de p entre 0,1 y 0,05.

1.2.2. Parámetros de función regional.

1.2.2.1. Zona dependiente de la CCx (Tabla 7).

Durante la taquicardia la LTD tendió a disminuir alcanzando esta reducción significación estadística a los 120 minutos de la sobreestimulación. A los 5 minutos del cese de la sobreestimulación la LTD ya no mostró diferencia estadística respecto a su valor inicial, alcanzando un valor similar al basal al final de la recuperación.

La LTS no se modificó de forma significativa durante la sobreestimulación ni tras el cese de la misma.

La F. Ac. se redujo significativamente durante la taquicardia y se mantuvo reducida al cesar ésta y durante los 60 minutos de la fase de recuperación.

	Basal	stim60 m	stim120 m	rec5 m	rec30 m	rec60 m
LTD (mm)	9,6 ± 0,7	9,1 ± 0,9	8,7 ± 0,7*	9,2 ± 0,7	9,4 ± 0,7	9,5 ± 0,7
%ΔLTD	100 ^s	94,8	90,6	95,8	97,8	98,9
LTS (mm)	8,9 ± 0,7	8,8 ± 0,9	8,5 ± 0,8	8,9 ± 0,6	9 ± 0,7	9,1 ± 0,6
%ΔLTS	100 ^s	98,8	95,5	99,9	101,1	102,2
F. Ac.	7,7 ± 2,3	3,3 ± 1,9*	2,6 ± 2,1*	3,8 ± 1,7*	4,5 ± 1,6	4,3 ± 1,4*
%ΔF.Ac.	100 ^s	42,9*	33,8*	49,3*	58,4	55,8*

Tabla 7.- Parámetros de función regional en la zona control (territorio de la arteria circumfleja). Los valores representan media ± DE. ^sValor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. *p ≤ 0,05 respecto al valor inicial.

1.2.2.2. Zona dependiente de la CDA. (Tabla 8).

El flujo medido en la CDA decayó significativamente durante la taquicardia. En la fase de recuperación se recuperó inmediatamente, pero se detectó a los 30 y 60 minutos de la recuperación una clara tendencia al descenso aunque sin alcanzar la significación estadística respecto al valor de referencia inicial.

La LTD en la zona apico-medial se redujo durante la estimulación. Este menor alargamiento fibrilar telediastólico alcanzó un valor de p significativo a las 2 horas de la taquicardia. El acortamiento de la LTD objetivado durante la estimulación se recuperó rápidamente tras el cese de la taquicardia.

La LTS, por el contrario, apenas se modificó durante la estimulación. Durante la recuperación posttaquicardia la LTS se incrementó ligeramente, sin que ninguno de los valores alcanzase la significación estadística.

La menor LTD durante la sobreestimulación se tradujo en un descenso significativo de la F. Ac. en la fase de taquicardia. También en la fase de recuperación la F. Ac. se mantuvo por debajo de sus valores iniciales pero, a diferencia de la zona control, sin alcanzar significación estadística.

	Basal	stim60 m	stim120 m	rec5 m	rec30 m	rec60 m
F. Da. (ml/min)	12,1 ± 4,8	7,4 ± 4,6*	7,5 ± 2,2	14,8 ± 1,3	9,8 ± 2,5	8,9 ± 2,3
LTD (mm)	14,4 ± 2,7	12,8 ± 2,9	12,7 ± 2,4*	14,3 ± 2,8	14,3 ± 2,8	14,3 ± 2,9
%ΔLTD	100 ^S	88,8	88,2	99,3	99,4	99,7
LTS (mm)	11,9 ± 2,4	11,9 ± 2,5	11,7 ± 2,4	12,6 ± 2,6	12,4 ± 2,7	12,5 ± 2,8
%ΔLTS	100 ^S	99,9	98,3	105,9	104,2	105
F. Ac. (%)	16,9 ± 6,5	6,5 ± 2,5*	7,9 ± 1,4*	12,1 ± 2,9	13,6 ± 3,3	12,9 ± 3,6
%ΔF.Ac.	100 ^S	38,5	46,7	71,6	80,5	76,3

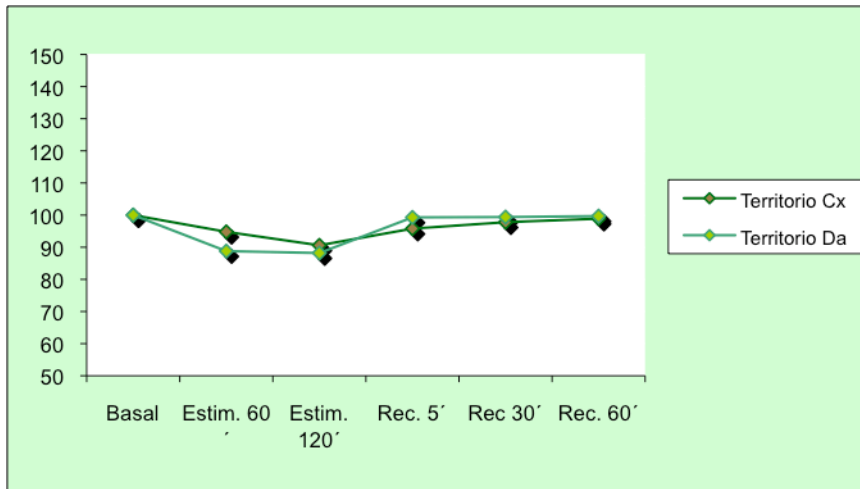
Tabla 8.- Parámetros de función regional de la zona dependiente de la descendente anterior. Los valores representan media ± DE. ^SValor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. * Valor de $p \leq 0,05$ respecto al valor inicial.

1.2.2.3.- Comparación entre zona dependiente de la CDA y la zona dependiente de la CCx. (figuras 19 A, B y C).

Comparamos el porcentaje del cambio de los parámetros de función regional respecto a sus valores iniciales en las dos zonas estudiadas (latero-basal y apico-medial) y no hallamos diferencias significativas en los valores de la LTD y LTS durante la taquicardia ni tras el cese de la misma (figuras 19A y 19B).

Tampoco el porcentaje de cambio de la F. Ac. mostró diferencias durante la taquicardia. Sin embargo, la fracción de acortamiento en la zona irrigada por la CCx mostró una reducción porcentual mayor que la irrigada por la CDA, siendo significativa esta diferencia solo a los cinco minutos del cese de la taquicardia con una tendencia a mantener estas diferencias a los 30 y 60 minutos (figura 19 C).

A) **Longitud Telediastólica**
(% de cambio respecto al valor inicial)



B) **Longitud Telesistólica**
(% de cambio respecto al valor inicial)



C) **Fracción de Acortamiento.**
(% de cambio respecto al valor inicial)

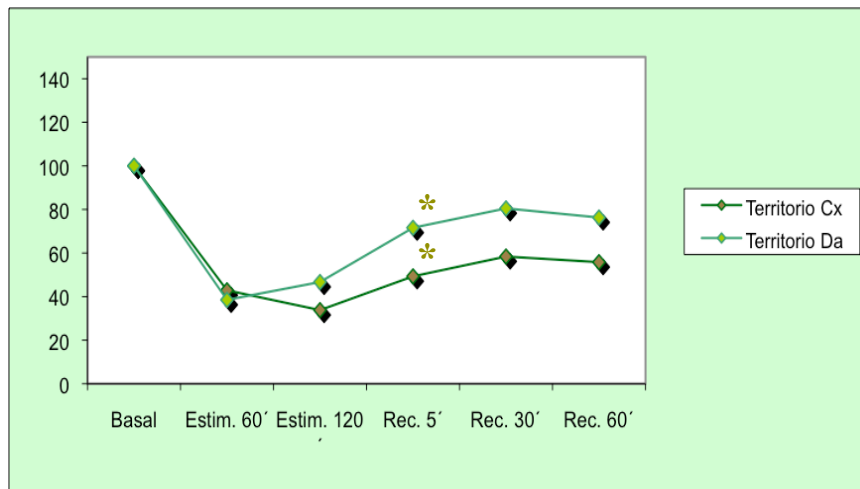


Figura 19 (A, B y C).- Representación de la evolución del cambio porcentual de la longitud telesistólica, telediastólica y fracción de acortamiento de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx en la serie con sobreestimulación y sin isquemia previa. * Valor de p entre zonas $\leq 0,05$.

1.3.- Serie con isquemia de 10 minutos seguida de estimulación.

Se utilizaron 7 cerdos. Cinco animales completaron el protocolo. Esta serie estuvo formada por 2 machos y 3 hembras, con una mediana de edad de 3,5 meses (rango intercuartílico 3 – 4,2) y un peso medio de 27 Kg. (DE 3,3). De los dos animales excluidos, uno lo fue porque no finalizó el protocolo experimental debido a que sufrió una fibrilación ventricular a los 100 minutos de la estimulación. Se trató de un hembra de 5 meses de edad y 32 Kg. El otro animal, una hembra de 3 meses y 21 Kg. presentó, al manipular la arteria descendente anterior, un espasmo que precisó de

nitroglicerina para revertirlo; posteriormente, al implantar el medidor de flujo aórtico, sufrió una asistolia que interpretamos causada por espasmo del tronco común izquierdo.

1.3.1.- Parámetros hemodinámicos y de función global (tabla 9).

La oclusión del segmento medio de la CDA no produjo alteraciones significativas en la FC durante los 10 minutos que duró la isquemia en esta serie. Tampoco en la reperfusión se modificó significativamente. En esta serie se utilizó una frecuencia de estimulación promedio de 164 lpm. Tras el cese de la estimulación, la FC se mantuvo sin diferencias respecto al valor de inicio.

Tanto el Vol. lat. como el G. C. se redujeron de forma significativa durante la isquemia, recuperándose en la reperfusión. Sin embargo la presión sistólica del ventrículo izquierdo apenas se modificó. Durante la estimulación, de nuevo el Vol. lat. se redujo de forma significativa, no así el G. C. que permaneció inalterado. La PSVI disminuyó durante la estimulación aunque sin alcanzar significación estadística. Tras el cese de la taquicardia, el Vol. lat. y el G. C. se redujeron progresivamente hasta alcanzar la significación estadística a los 30 y 60 minutos del cese de la taquicardia. En esta fase, la PSVI se recuperó en el periodo inmediato al cese pero con una tendencia a disminuir durante el resto de la recuperación.

La PTDVI aumentó durante la isquemia aunque sin alcanzar significación estadística debido a unas desviaciones típicas amplias. En la reperfusión retornó a los valores iniciales. La PTDVI se redujo durante la primera mitad de la sobreestimulación, también sin

significación estadística, aumentando hasta igualarse con el valor inicial en la segunda mitad de la taquicardia. Al finalizar la taquicardia, la PTDVI fue mayor que la inicial (pero con valor de p no significativo) a los 5 y 30 minutos, normalizándose al final de la observación.

La dP/dt positiva no se modificó durante la isquemia y tendió ($p < 0,1$) a incrementarse en la fase de reperfusión. Durante la estimulación, se mantuvo por encima de los valores iniciales en los primeros 60 minutos ($p < 0,1$) igualándose a su valor inicial al final de esta fase. Tras el cese de la estimulación la $dP/dt +$ no se modificó en los primeros minutos y se redujo progresivamente respecto al valor inicial a los 30 y 60 minutos aunque sin significación estadística.

La dP/dt negativa no se alteró durante los 10 minutos de isquemia y tampoco en la reperfusión. Disminuyó durante la estimulación ventricular rápida con valores a los 120 minutos significativamente menores que los iniciales. Tras cesar la sobreestimulación los valores de la dP/dt negativa fueron similares a los iniciales con una tendencia ligera al descenso en los 60 minutos siguientes.

1.3.2.- Parámetros de función regional.

1.3.2.1.- Zona dependiente de la CCx (tabla 10).

Ni la LTD ni la LTS se modificaron significativamente durante la isquemia o la reperfusión en esta zona. Durante la

	Basal	Isquemia (minuto 9)	Reperusión	Sobrestimulación			Recuperación		
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
F.C. (l.p.m.)	106,6 ± 15,2	98,2 ± 15,3	98,8 ± 12,1	164 ± 3,8	164 ± 3,8	108,4 ± 9,9	108,4 ± 9,9	102,4 ± 7,6	
Vol. Lat. (ml)	32,1 ± 11,4	28,6 ± 10,8*	31,4 ± 11,4	21,9 ± 6,3*	20,8 ± 5,7*	29,4 ± 10,3	27,5 ± 8,9 [#]	26,7 ± 9,1*	
G. Card. (l/min)	3,5 ± 1,6	2,8 ± 1,2*	3,2 ± 1,4	3,6 ± 1	3,4 ± 0,9	3,2 ± 1,3	2,9 ± 1,1 [#]	2,7 ± 0,5*	
PSVI (mmHg)	81 ± 18,1	73,8 ± 17,7	75,6 ± 18,9	62,4 ± 15,2	65,2 ± 14,6	78 ± 17,4	73,7 ± 14,9	69,6 ± 7,8	
PTDVI (mmHg)	9,7 ± 4,7	11,6 ± 7,6	9 ± 6,3	6 ± 1,4	9,4 ± 3,6	12 ± 5,7	12,2 ± 5,6	9,8 ± 3,3	
dp/dt + (mmHg/s)	1488 ± 243	1535 ± 543	1840 ± 485 [#]	1813 ± 437 [#]	1535 ± 413	1543 ± 318	1339 ± 342	1289 ± 318	
dp/dt - (mmHg/s)	1510 ± 595	1461 ± 410	1538 ± 436	1386 ± 307	1130 ± 548*	1545 ± 529	1338 ± 379	1364 ± 244	

Tabla 9.- Parámetros hemodinámicos y de función global en la serie con estimulación e isquemia de 10 minutos. Los valores representan media ± DE. Valores de p, respecto al valor inicial: *p < 0,05; [#] p entre 0,1 y 0,05.

	Basal	Isquemia (minuto 9)	Reperusión	Sobrestimulación			Recuperación		
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
LTD (mm)	9,5 ± 0,7	9,7 ± 0,4	9,6 ± 0,4	9,1 ± 0,4*	9 ± 0,4*	9,3 ± 0,5	9,2 ± 0,3	9,5 ± 0,6	
%ΔLTD	100 ^s	102,2	101,1	95,8 *	94,7 *	97,8	96,8	100,3	
LTS (mm)	8,9 ± 0,4	8,9 ± 0,4	9,1 ± 0,5	8,8 ± 0,6	8,8 ± 0,6	8,9 ± 0,6	8,8 ± 0,5	9 ± 0,6	
%ΔLTS	100 ^s	100,8	101,8	99,3	99,3	100,4	99,3	101,5	
F. Ac. (%)	6,3 ± 4	7,4 ± 3,1	6,3 ± 4,1	3,1 ± 4,5	2,7 ± 3,4	4,5 ± 1,5	4,5 ± 1,7	5,1 ± 1,9	
%ΔF. Ac.	100 ^s	117,5	100	49,2	42,8	71,4	71,4	80,9	

Tabla 10.- Parámetros de función regional en la zona control (territorio de la arteria circumfleja). Los valores representan media ± DE. ^sValor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F. Ac. *p ≤ 0,05 respecto al valor inicial.

taquicardia, la LTD se redujo significativamente, mientras que la LTS no sufrió modificaciones significativas. Tras el cese de la taquicardia, la reducción que sufrió la LTD se recuperó inmediatamente tras el cese de la misma. La LTS no presentó cambios.

La F. Ac. no se modificó en esta zona durante la isquemia y la reperfusión. Durante la estimulación disminuyó pero sin alcanzar estas diferencias la significación estadística respecto al valor inicial lo que atribuimos a la amplia desviación típica. Tras el cese de la taquicardia, la F. Ac. permaneció baja, con tendencia a recuperarse a los 60 minutos.

1.3.2.2.- Zona dependiente de la CDA. (Tabla 11).

En esta serie el flujo por la CDA se redujo un 26% durante la oclusión, incrementándose significativamente durante la reperfusión. Durante la taquicardia el flujo coronario se redujo solo ligeramente. Tras su cese, el flujo por la CDA se recuperó inmediatamente y se mantuvo estable hasta el final de esta fase.

La LTD en el territorio dependiente de la CDA no se modificó durante la isquemia ni en la fase de reperfusión, disminuyó significativamente durante la sobreestimulación, y recuperó sus valores iniciales a los cinco minutos del cese de la misma, manteniéndose así hasta el final. La LTS aumentó significativamente durante la isquemia recuperándose inmediatamente en la reperfusión. Es más, la LTS fue mayor que la LTD durante la isquemia, lo cual reflejó un movimiento discinético de esta región.

	Basal		Isquemia (minuto 9)		Reperusión		Sobrestimulación		Recuperación		
							60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.
F. Da. (ml/min)	20,2 ± 3,1	14,9 ± 5,6 [#]	33,2 ± 10,3*	18,8 ± 7,3	17,9 ± 7,1	23,8 ± 5,9 [#]	15,8 ± 4,1 [#]	18,9 ± 6,2			
LTD (mm)	15,1 ± 2,2	15,5 ± 3,9	14,8 ± 3,2	13,9 ± 3,2*	13,7 ± 3,1*	14,3 ± 3,5	14,7 ± 2,7	14,7 ± 2,5			
%ΔLTD	100 [§]	102,6	98	92 [§]	90,7*	94,7	97,3	97,3			
LTS (mm)	12,9 ± 2,2	15,9 ± 2,1*	13,1 ± 3,3	12,8 ± 3	12,4 ± 2,9	13,2 ± 3,1	13,2 ± 2,4	12,8 ± 1			
%ΔLTS	100 [§]	123,2 [#]	101,5	99,2	96,1	102,3	102,3	99,2			
F. Ac. (%)	14,6 ± 5,4	0,4 ± 6,3*	11,6 ± 6,6	7,9 ± 2,1*	8,6 ± 3,4*	7,6 ± 3,9*	10,2 ± 4,2*	12,6 ± 4,5			
%ΔF.Ac	100 [§]	2,7 *	79,4	54,1 *	65,9	52,1 *	69,9 *	86,3			

Tabla 11.- Parámetros de función regional en la zona sometida a isquemia (territorio de la arteria descendente anterior). Los valores representan media ± DE. [§]Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. *p ≤ 0,05 respecto al valor inicial. [#] Valor de p entre 0,1 y 0,05.

Durante la taquicardia la LTS fue similar a la inicial, al igual que en la fase de recuperación posttaquicardia.

La F. Ac. presentó una reducción muy significativa durante la isquemia, recuperándose inmediatamente tras retirar el clamp vascular. Durante la sobreestimulación se redujo de nuevo, recuperándose lentamente tras el cese de ésta. A los 5 y 30 minutos de la fase de recuperación, los valores de la F. Ac. todavía fueron significativamente inferiores al inicial. A los 60 minutos, aunque inferiores, la diferencia ya no fue significativa.

1.3.2.3.- Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx (figuras 20 A, B y C).

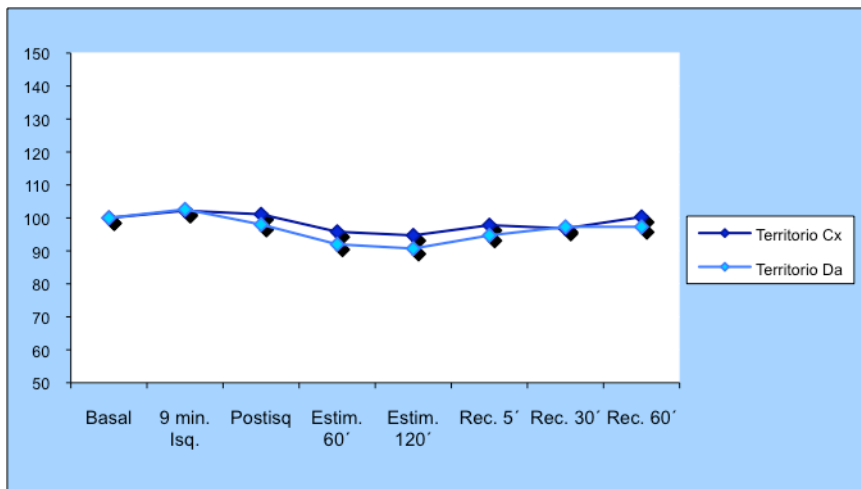
No hubieron diferencias significativas entre los porcentajes de cambio de la LTD de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx, en las distintas fases del experimento (figura 20 A).

Sin embargo, y durante la isquemia, la LTS sufrió un alargamiento del 23% en el territorio dependiente de la CDA (es decir se acortó menos) y que fue significativo respecto a la zona no isquémica, que no se modificó. Durante la taquicardia y durante la fase posttaquicardia no hubieron diferencias entre una y otra región. (figura 20 B).

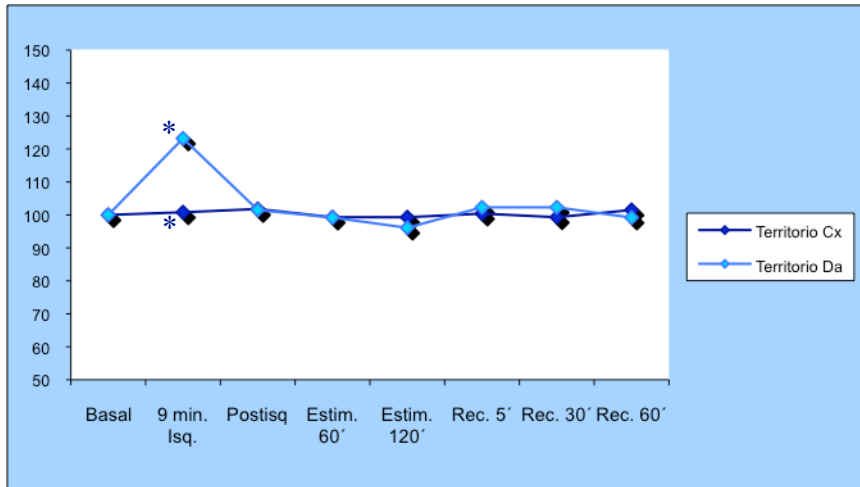
La F. Ac. se redujo un 97% (prácticamente acinética) en la zona dependiente de la CDA durante la isquemia, frente al incremento del 17,5% que experimentó en la zona dependiente de la CCx. Durante la taquicardia la reducción de la F. AC. fue similar en ambas regiones (en torno al 50%). En la fase de recuperación tras la

sobreestimulación, las F. Ac. de ambas zonas se recuperaron progresivamente, alcanzando el 80-86% de su valor inicial al final del experimento, sin diferencias estadísticas entre ellas (figura 20 C).

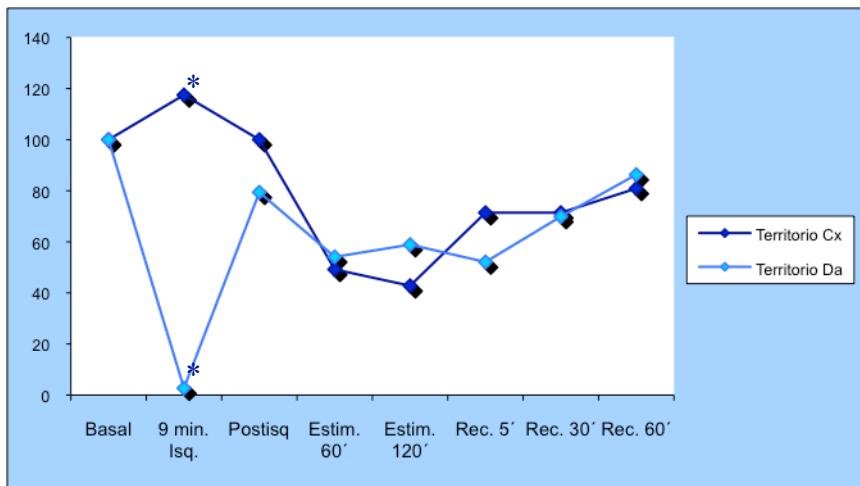
A) **Longitud Telediastólica**
(% de cambio respecto al valor inicial)



B) Longitud Telesistólica
(% de cambio respecto al valor inicial)



C) Fracción de Acortamiento
(% de cambio respecto al valor inicial)



Figuras 20 (A, B y C).- Representación de la evolución del cambio porcentual de la longitud telesistólica, telediastólica y fracción de acortamiento de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx en la serie con isquemia continua 10 minutos. * Valor de p entre zonas $\leq 0,05$.

1.4.- Serie con isquemia de 20 minutos seguida de estimulación.

Se utilizaron 6 cerdos, cinco animales completaron el protocolo de esta serie que estuvo formada por 1 macho y 4 hembras, con una mediana de edad de 3,5 meses (rango intercuartílico 2,8 – 3,5) y un peso medio de 27 Kg. (DE 3,3). Un animal fue excluido por desarrollar un cuadro de hipertermia maligna.

1.4.1.- Parámetros hemodinámicos y de función global (Tabla 12).

La FC no se modificó ni durante la isquemia, ni en la reperfusión. La frecuencia de estimulación promedio fue de 157 lpm. Tras el cese de la sobreestimulación, la FC fue más alta que la inicial en el control realizado en los primeros 5 minutos, normalizándose a los 30 y 60 minutos.

El Vol. lat. se redujo significativamente durante la isquemia, retornando a su valor inicial tras la desobstrucción de la arteria. Durante la taquicardia se redujo de nuevo, recuperándose inmediatamente tras el cese de ésta. El G. C. también disminuyó durante la isquemia normalizándose en la reperfusión. Durante la sobreestimulación se mantuvo ligeramente elevado respecto al valor inicial al igual que durante la fase de recuperación.

La PSVI, aunque también disminuyó durante la isquemia, no llegó a alcanzar significación estadística. Se redujo durante la taquicardia y retornó a los valores iniciales en la fase de recuperación. La $dP/dt +$ disminuyó durante la isquemia,

normalizándose en la fase de reperfusión, con valores de p cercanos a la significación estadística. No se modificó durante la sobreestimulación ni durante la recuperación.

La PTDVI no mostró cambios significativos. La dp/dt -, sin embargo, se redujo a los 20 minutos de isquemia, recuperándose por encima de los valores iniciales en la reperfusión. Disminuyó de nuevo durante la estimulación ventricular rápida recuperándose tras el cese de la misma aunque con una reducción no significativa a los 60 minutos.

	Basal	Isquemia (minuto 19)	Reperusión	Sobrestimulación			Recuperación		
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
F.C. (l.p.m.)	92 ± 6,2	87,2 ± 6,7	92 ± 17,2	157 ± 4,5	157 ± 4,5	107,5 ± 7,2 [#]	99,5 ± 7,6	97,2 ± 6,5	
Vol. Lat. (ml)	33,8 ± 10,8	29,3 ± 12,1 [*]	32,1 ± 11,4	25,2 ± 12,9 [*]	24,1 ± 13,2 [*]	30,7 ± 11,1	31,9 ± 11,9	31,5 ± 11,4	
G. Card. (l/min)	3,1 ± 1,1	2,6 ± 1,2 [*]	3 ± 1,5	3,9 ± 2,1	3,8 ± 2,1	3,8 ± 2	3,6 ± 2	3,6 ± 2,1	
PSVI (mmHg)	73 ± 14,8	62 ± 18,2	71 ± 6,5	59 ± 18,5	64,4 ± 13,2	77,5 ± 9,6	73,7 ± 6,3	80,3 ± 16,1	
PTDVI (mmHg)	8,8 ± 3,2	9,6 ± 1,8	8,8 ± 3,8	7,2 ± 1,7	7,8 ± 2,1	12 ± 3,7	8,4 ± 1,5	7,6 ± 1,3	
dP/dt + (mmHg/s)	1440 ± 233	1030 ± 387 [#]	1580 ± 485	1440 ± 763	1570 ± 615	1585 ± 557	1610 ± 692	1490 ± 327	
dP/dt - (mmHg/s)	1255 ± 346	1060 ± 311 [*]	1500 ± 799	1090 ± 835	1080 ± 834	1455 ± 701	1490 ± 838	1290 ± 542	

Tabla 12.- Parámetros hemodinámicos y de función global en la serie con estimulación e isquemia de 20 minutos. Los valores representan media ± DE. Valores de p, respecto al valor inicial: ^{*}p ≤ 0,5; [#] p entre 0,1 y 0,05.

1.4.2.- Parámetros de función regional.

1.4.2.1- Zona dependiente de la CCx (Tabla 13).

La LTD no se modificó durante la realización de la isquemia ni tampoco durante la reperfusión. Durante la sobreestimulación se detectó un acortamiento significativo (de entre el 6-8%) de la LTD de esta zona, que no llegó a recuperarse en la fase posttaquicardia. La LTS tampoco se modificó ni durante la isquemia ni durante la reperfusión. Durante la taquicardia y tras ésta, la LTS no reflejó modificaciones significativas.

La F. Ac. no se modificó en esta zona en la fase de isquemia aunque en la reperfusión se redujo un promedio del 30%, aunque sin significación estadística. Durante la sobreestimulación ventricular rápida la F. Ac. disminuyó de forma muy significativa ($p < 0,001$). Tras el cese de la taquicardia, se recuperó hasta un 85% de la inicial pero con tendencia a reducirse en los controles a los 30 y 60 minutos.

	Basal		Isquemia (minuto 19)		Reperusión		Sobrestimulación			Recuperación		
							60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
LTD (mm)	9,5 ± 0,9	9,5 ± 0,8	9,3 ± 0,8	8,9 ± 1,1*	8,7 ± 0,9*	9,1 ± 0,8	9,1 ± 0,8	8,9 ± 0,6				
%ΔLTD	100 [§]	100,6	98,8	94*	91,7*	96,9	96,5	94,9				
LTS (mm)	8,9 ± 0,8	8,9 ± 0,9	8,9 ± 0,9	8,8 ± 1,1	8,7 ± 0,9	8,6 ± 0,8	8,7 ± 0,8	8,6 ± 0,6				
%ΔLTS	100 [§]	100,1	100,4	99,6	98	97,7	98,2	97,9				
F. Ac. (%)	6,4 ± 1,8	6,8 ± 1,4	4,5 ± 1,6	0,7 ± 4,7*	-0,1 ± 3,7*	5,5 ± 2,7	4,6 ± 2,2	4,3 ± 3,3				
%ΔF.Ac.	100 [§]	106,2	70,3	10,9*	-1,6*	85,9	71,8	67,2				

Tabla 13.- Parámetros de función regional en la zona control (territorio de la arteria circumfleja). Los valores representan media ± DE. [§]Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. *p ≤ 0,05 respecto al valor inicial.

1.4.2.2.- Zona dependiente de la CDA (Tabla 14).

Una oclusión de 20 minutos en el segmento medio de la CDA redujo de forma significativa en un 50% el flujo coronario en el segmento proximal de esta arteria, con un incremento de casi el doble respecto al valor inicial durante la reperfusión. La taquicardia se acompañó de una reducción muy significativa del flujo por la CDA, normalizándose de forma inmediata, aunque con una tendencia a reducirse, durante la fase de recuperación.

La LTD no se modificó durante ninguna de las fases del experimento en esta serie. Sin embargo, la LTS aumentó significativamente un 22,6% durante la isquemia (menor acortamiento sistólico), retornando a los valores iniciales durante la reperfusión. Durante la taquicardia y tras ésta apenas se modificó este parámetro.

Ello se tradujo en una F. Ac. negativa, por movimiento discinético, que produjo en esta zona la isquemia. Durante la reperfusión, la F. Ac. se equiparó a la inicial. Durante la taquicardia se redujo un 50% respecto al valor inicial, manteniéndose reducida de forma significativa a los 60 minutos en la fase posttaquicardia.

	Basal	Isquemia (minuto 19)	Reperusión	Sobrestimulación			Recuperación	
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.
F. Da. (ml/min)	17,4 ± 5,9	9,8 ± 4,4*	30,8 ± 8,2*	6 ± 0,3*	8 ± 0,3*	19,4 ± 5,7	15,9 ± 7,1	13,8 ± 4,1
LTD (mm)	12 ± 1,6	12,6 ± 2,2	12,3 ± 1,8	11,6 ± 1,6	11,5 ± 1,4	12,1 ± 1,5	11,7 ± 1,5	11,8 ± 1,4
%ΔLTD	100 [§]	104,6	102,4	96,9	96	100,8	98,1	99
LTS (mm)	10,4 ± 0,9	12,8 ± 2,1*	10,8 ± 1,4	10,8 ± 1,3	10,6 ± 1,1	11,1 ± 1,2	10,5 ± 1,2	10,9 ± 1,1
%ΔLTS	100 [§]	122,6*	103,9	104,2	102,4	106,4 [#]	101,6	104,6
F. Ac. (%)	13 ± 5,2	-1,7 ± 3,2*	11,9 ± 2,9	6,5 ± 4*	7,2 ± 4,4*	8,2 ± 2,6 [#]	10 ± 3,3	8,1 ± 3,1*
%ΔF. Ac.	100 [§]	-13,1	91,5	50	55,4	63,1	76,9	62,3

Tabla 14.- Parámetros de función regional de la zona sometida a isquemia (territorio de la descendente anterior). Los valores representan media ± DE. [§]Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. Valores de p, respecto al valor inicial: *p ≤ 0,05; [#] p entre 0,1 y 0,05.

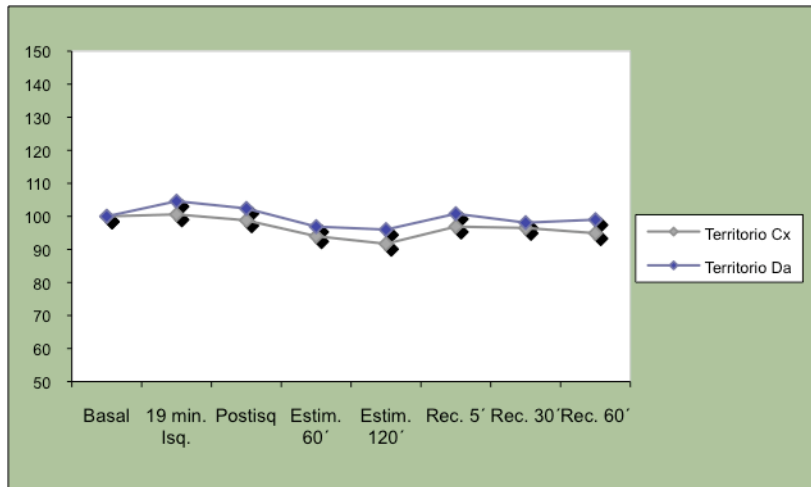
1.4.2.3.- Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx (figuras 21 A, B y C).

Los cambios porcentuales de la LTD respecto a su valor inicial no mostraron diferencias entre la zona dependiente de la CCx y la irrigada por la CDA a lo largo de la distintas fases del experimento (figura 21 A).

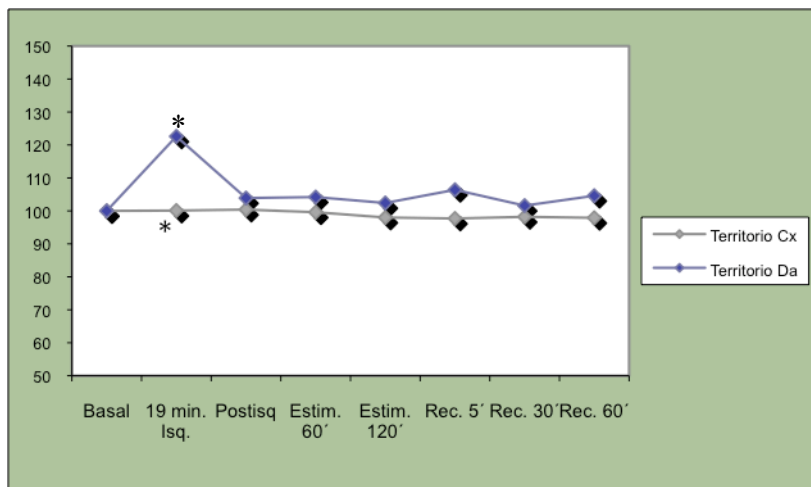
La LTS, sin embargo, sufrió, respecto a su valor inicial, un alargamiento (menor acortamiento) durante la isquemia en la zona dependiente de la CDA respecto a la zona control (no isquémica) Durante la reperusión, los valores de la LTS entre ambas zonas fueron similares al igual que durante la fase de taquicardia y de recuperación (figura 21 B).

Durante la isquemia, la F. Ac. fue significativamente menor en la zona irrigada por la CDA respecto a la zona irrigada por la CCx. En la fase de reperusión estas diferencias desaparecen, aunque llamó la atención que mientras la primera se recuperó rápidamente hasta sus valores iniciales, la segunda tendió a reducirse respecto al valor inicial. Durante la sobreestimulación se objetivó una reducción de la F. Ac. en ambas regiones durante la taquicardia siendo llamativa la mayor reducción observada en la zona dependiente de la CCx respecto a la zona dependiente de la CDA. Esta diferencia entre zonas fue significativa a los 120 minutos de inicio de la taquicardia. Tras su cese, las F. de Ac de ambas zonas se recuperan a valores entre el 60 y el 80% de los iniciales, pero sin diferencias entre ellas (figura 21 C).

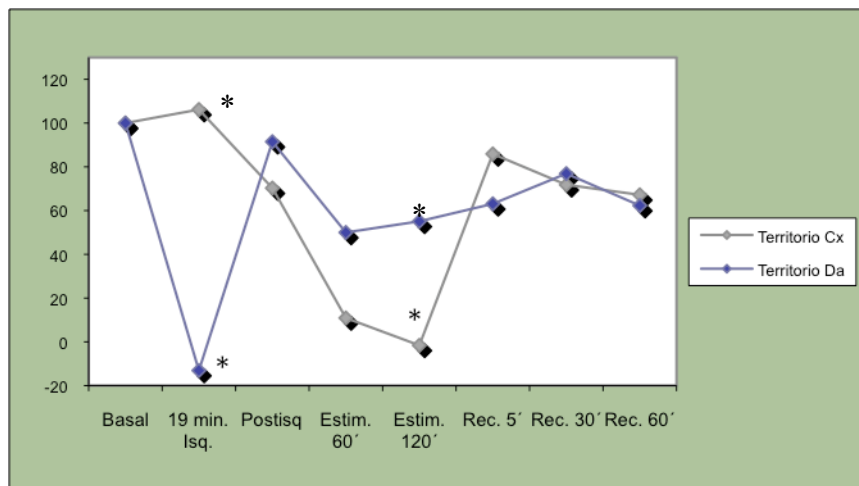
A) **Longitud Telediastólica**
 (% de cambio respecto al valor inicial)



B) **Longitud Telesistólica**
 (% de cambio respecto al valor inicial)



C) **Fracción de Acortamiento**
(% de cambio respecto al valor inicial)



Figuras 21 (A, B y C).- Representación de la evolución del cambio porcentual de la longitud telesistólica, telediastólica y fracción de acortamiento de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx en la serie con isquemia continua 20 minutos. * Valor de p entre zonas $\leq 0,05$.

1.5.- Serie con 20 isquemias breves y repetidas.

Se utilizaron siete cerdos completando el protocolo cinco. De los dos animales que no terminaron el protocolo experimental, uno fue excluido por presentar hipertermia (41° a los 60 minutos de la fase de estimulación ventricular) y el otro por presentar asistolia al finalizar el protocolo de isquemias. Esta serie estuvo formada por 2 machos y 3 hembras, con una mediana de edad de 3 meses (rango intercuartílico 2,25 – 3) y un peso medio de 22,4 Kg. (DE 3,9).

1.5.1.- Parámetros hemodinámicos y de función global (Tabla 15).

En esta serie se objetivó una reducción significativa de la FC durante la última isquemia, que no se recuperó durante la reperfusión. La FC media de estimulación fue de 158 lpm. Tras el cese de la taquicardia, aunque en promedio la FC se mantuvo en valores por debajo de la inicial, hubo una importante variabilidad entre animales lo que se tradujo en una desviación típica muy amplia y ausencia de significación estadística.

El Vol. lat. disminuyó significativamente durante la isquemia número 20 y no se recuperó durante la reperfusión. Durante la taquicardia la reducción del Vol. lat. se acentuó manteniéndose reducida tras el cese de la misma. El G. C. también se redujo durante la isquemia 20 sin recuperarse en la reperfusión que la siguió. La sobreestimulación consiguió aumentar el G. C. pero, tras el cese de la misma, el aturdimiento fue evidente reflejado por valores bajos del G. C.

La PSVI sufrió unos cambios paralelos a los del Vol. lat., manteniéndose en valores por debajo de los iniciales durante toda la prueba. Esta afectación importante de la función sistólica del V.I. también se reflejó en la $dp/dt +$.

La PTDVI no se modificó significativamente durante las distintas fases del experimento, aunque durante la sobreestimulación los promedios de sus valores fueron inferiores a los iniciales. Sin embargo, la $dp/dt -$ se mantuvo en valores significativamente bajos

durante las distintas fases, incluso a los 60 minutos de la recuperación.

	Basal		Isquemia n° 20		Última reperusión		Sobrestimulación			Recuperación	
							60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.
F.C. (l.p.m.)	101 ± 5,8	93 ± 5,5*	91 ± 6,5*	158 ± 5,5	158 ± 5,5	92 ± 25,7	90 ± 31,9	85 ± 28,4			
Vol. Lat. (ml)	26,9 ± 5,3	23,8 ± 5,2*	24,3 ± 5,7*	19,2 ± 2,7*	14,3 ± 4,9*	19,7 ± 6,1	17,3 ± 6,9 [#]	16 ± 6,2*			
G. Card. (l/min)	2,73 ± 0,6	2,23 ± 0,5*	2,23 ± 0,6*	3 ± 0,5	2,3 ± 0,6	1,9 ± 1 [#]	1,7 ± 1,2 [#]	1,5 ± 0,9*			
PSVI (mmHg)	70,6 ± 6,6	60,6 ± 11,3 [#]	60,8 ± 12,9 [#]	48,6 ± 6,1*	39,8 ± 8,9*	49 ± 14,7*	52 ± 11,9 [#]	46 ± 8,4*			
PTDVI (mmHg)	7,8 ± 3,1	7,6 ± 3,7	9,2 ± 6,3	5,6 ± 1,3	4,8 ± 1,8	6,8 ± 2,2	7,5 ± 3,8	7,2 ± 3,3			
dp/dt+ (mmHg/s)	1710 ± 383	985 ± 331*	1375 ± 245*	1470 ± 419	1110 ± 475 [#]	1095 ± 312 [#]	1090 ± 272 [#]	970 ± 189*			
dp/dt- (mmHg/s)	1455 ± 363	950 ± 185*	1080 ± 250*	870 ± 301*	650 ± 154*	740 ± 96*	800 ± 61*	665 ± 89*			

Tabla 15.- Parámetros hemodinámicos y de función global en la serie con 20 isquemia breves seguidas de sobrestimulación. Los valores representan media ± DE. Valores de p, respecto al valor inicial: *p ≤ 0,05; [#] p entre 0,1 y 0,05.

1.5.2.- Parámetros de función regional.

1.5.2.1.- Zona dependiente de la CCx (Tabla 16).

La LTD no se modificó durante la isquemia número 20 ni en la reperfusión que la siguió. Se redujo durante la sobreestimulación y retornó a valores iniciales durante la fase de recuperación posttaquicardia. La LTS tampoco se modificó significativamente durante las distintas fases.

Sin embargo, respecto al valor de inicio, la F. Ac. se redujo un 25% en esta zona durante la isquemia número 20 y se mantuvo así en la última reperfusión. Disminuyó aún más (un 77%) a los 60 minutos del inicio de la sobreestimulación, llegando a mostrar un movimiento discinético a las dos horas del comienzo de la taquicardia. En la fase de recuperación la F. Ac. se mantuvo en valores entre un 50 y un 60 % inferiores a los iniciales.

1.5.2.2.- Zona dependiente de la CDA (Tabla 17).

El flujo por la CDA se redujo significativamente durante la oclusión número 20, recuperándose durante la última reperfusión, pero no se produjo la fase de hiperemia que sí aconteció en las otras series. Durante la sobreestimulación, se mantuvo reducido el flujo por la DA en un 60% a los 120 minutos durante la taquicardia. Tras su cese, el flujo persistió reducido de forma significativa.

	Basal	Isquemia n° 20	Última reperfusión	Sobrestimulación			Recuperación		
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
LTD (mm)	9,9 ± 0,9	9,9 ± 0,5	9,9 ± 1	9,4 ± 0,9 *	9,4 ± 0,8 *	9,9 ± 1	9,9 ± 0,9	9,8 ± 1,2	
%ΔLTD	100	99,2	99,7	93,8*	94,1*	99,2	99,9	97,6 [#]	
LTS (mm)	9,4 ± 0,8	9,5 ± 0,8	9,5 ± 0,9	9,2 ± 0,6	9,5 ± 0,7	9,6 ± 1,1	9,7 ± 1	9,5 ± 1,2	
%ΔLTS	100 [§]	100,6	101,3	98,3	101	102,1	102,7	101,3	
F. Ac. (%)	5,6 ± 2,8	4,2 ± 2,7 *	4,1 ± 2,8 [#]	1,1 ± 4,8 [#]	-1,3 ± 5,3 *	2,9 ± 1,5	3 ± 0,8	2,2 ± 0,7 [#]	
%ΔF.Ac.	100 [§]	75	73,2	19,6	-23,2	51,8	53,6	39,3	

Tabla 16.- Parámetros de función regional en la zona control (territorio de la arteria circunfleja). [§]Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F.Ac. Valores de p, respecto al valor inicial.: *p ≤ 0,05. [#] p entre 0,1 y 0,05.

	Basal	Isquemia n° 20	Última reperfusión	Sobrestimulación			Recuperación		
				60 min.	120 min.	5 min.	30 min.	60 min.	
F. Da. (ml/min)	13,1 ± 1,5	4,5 ± 1,5*	13,5 ± 1,5	7,8 ± 1,6*	5,5 ± 2,6*	5,3 ± 2,2*	8 ± 2,2*	8,4 ± 1,6*	
LTD (mm)	11,4 ± 0,4	11,3 ± 0,7	11,4 ± 0,9	10,9 ± 0,4	11 ± 0,6	11,1 ± 0,9	11,2 ± 0,8	11,2 ± 0,6	
%ΔLTD	100 [§]	99,1	99,9	95,6	96,5	97,4	98,4	98,4	
LTS (mm)	10,3 ± 0,6	11,3 ± 1,1	10 ± 1	10,5 ± 0,4	10,5 ± 0,3	10,3 ± 0,7	10,4 ± 0,8	10,3 ± 0,7	
%ΔLTS	100 [§]	109,7	97,1	101,9	101,9	100	100,9	100	
F. Ac. (%)	10,1 ± 4,3	-1,6 ± 5,4*	12 ± 7	4,3 ± 2,9 *	4,7 ± 4,2 *	7,5 ± 2,9	7,1 ± 2,7	8,1 ± 4,4	
%ΔF. Ac.	100 [§]	-15,8	118,8	42,6	46,5	74,2	70,3	80,2	

Tabla 17.- Parámetros de función regional de la zona sometida a isquemia (territorio de la descendente anterior). [§]Valor de referencia para el cambio (Δ) porcentual en LTD, LTS y F. Ac. Valores de p, respecto al valor inicial: * p ≤ 0,05.

La LTD permaneció sin cambios significativos durante las distintas fases. La LTS fue ligeramente superior a la inicial durante la última isquemia. En la reperusión, la LTS se recuperó.

La F. Ac. alcanzó valores negativos en esta zona durante la isquemia 20 pero se recuperó inmediatamente en la fase de reperusión. Durante la sobreestimulación se redujo de nuevo entre un 55-60%, recuperándose parcialmente tras el cese de la taquicardia con valores todavía entre un 20 y un 30% inferiores a los iniciales.

1.5.2.3.- Comparación entre zona dependiente de la CDA y zona dependiente de la CCx (figuras 22 A, B y C).

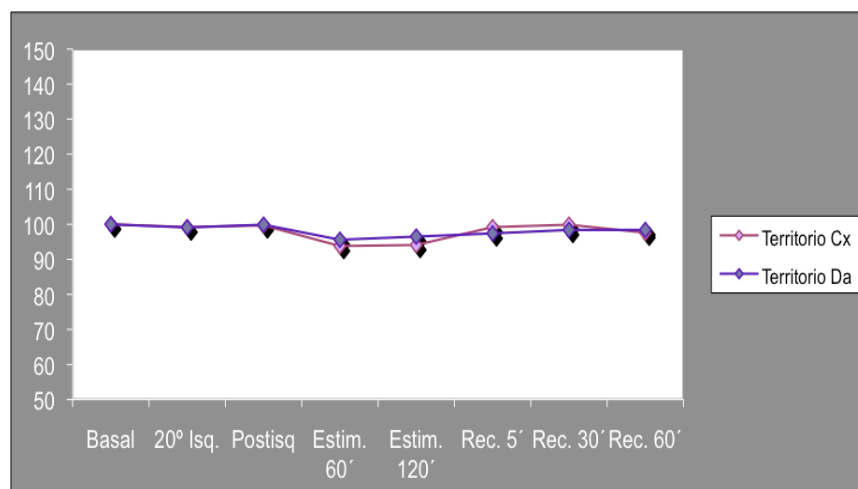
Las LTD de ambas regiones no mostraron cambios respecto a sus respectivos valores iniciales en ninguna de las fases del experimento, reduciéndose ambas mínimamente durante la fase de sobreestimulación. (figura 22 A).

La LTS de la zona dependiente de la CDA se incrementó un discreto 10% durante la última isquemia, pero este aumento no fue significativo respecto a la zona control. En las siguientes etapas, los cambios de la LTS no fueron diferentes entre zonas (figura 22 B).

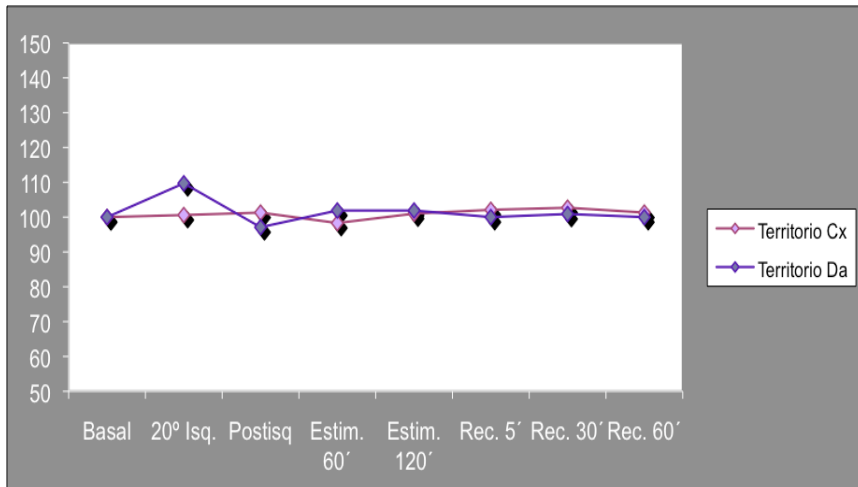
La F. Ac. mostró diferencias importantes y significativas entre las dos zonas (figura 22 C). Durante la isquemia número 20 se redujo más en el territorio isquémico (alcanzó valores negativos (en la zona dependiente de la CDA) pero también se redujo un 25% en la zona control (CCx). Tras esta isquemia, la zona dependiente de la CDA no solo se recuperó si no que incrementó su F. Ac. un 19% respecto a la inicial. Mientras, en esta misma fase, la F. Ac. en la

zona dependiente de la CCx no se recuperó, manteniéndose en valores un 27% inferiores a los de inicio. Durante la taquicardia, la F. Ac. se redujo en ambas zonas, aunque de forma más acentuada en la región que no fue sometida a isquemia, que llegó a presentar un movimiento discinético (reducción promedio de la F. Ac. en la zona dependiente de la CCx del 123%) a las dos horas del inicio de la sobreestimulación. Ambas zonas mejoraron la contractilidad tras el cese de la taquicardia pero con valores porcentualmente inferiores a los iniciales, particularmente en la zona dependiente de la CCx, cuya reducción de la F. Ac. a los 60 minutos de la recuperación fue significativamente mayor que la de la zona que fue sometida a isquemia (reducción del 40% vs 20% respecto a sus valores iniciales respectivos).

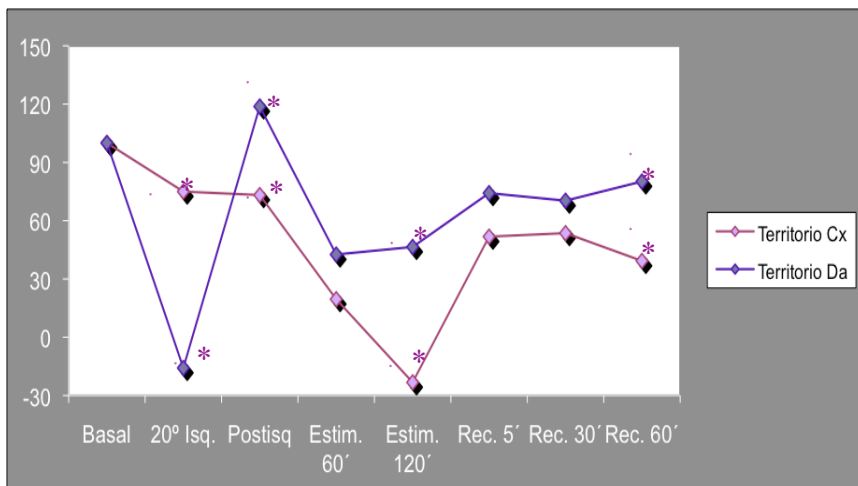
A) **Longitud Telediastólica**
(% de cambio respecto al valor inicial)



B) Longitud Telesistólica
(% de cambio respecto al valor inicial)



C) Fracción de Acortamiento
(% de cambio respecto al valor inicial)



Figuras 22 (A, B y C).- Representación de la evolución del cambio porcentual de la longitud telesistólica, telediastólica y fracción de acortamiento de las zonas dependientes de la CDA y de la CCx en la serie con isquemia de 20 minutos. *p ≤ 0,05 entre zonas.

2- Comparación de los resultados de función global y regional entre las series.

2.1.- Parámetros hemodinámicos y de función global.

No hubieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores absolutos iniciales en ninguno de los parámetros hemodinámicos y de función global entre las series.

La F.C no mostró diferencias significativas en la frecuencia cardiaca entre las series en la fase de isquemia y reperusión (o su equivalente temporal en las dos series sin isquemia). Todas las series fueron sobreestimuladas a una F. C. un 60% superior a la inicial (excepto la serie *sham*). En la fase de recuperación, solo la serie con isquemias breves y repetidas (●) y la serie con sobreestimulación y sin isquemia (■) mostraron valores diferentes ($p=0,06$) (figura 23).

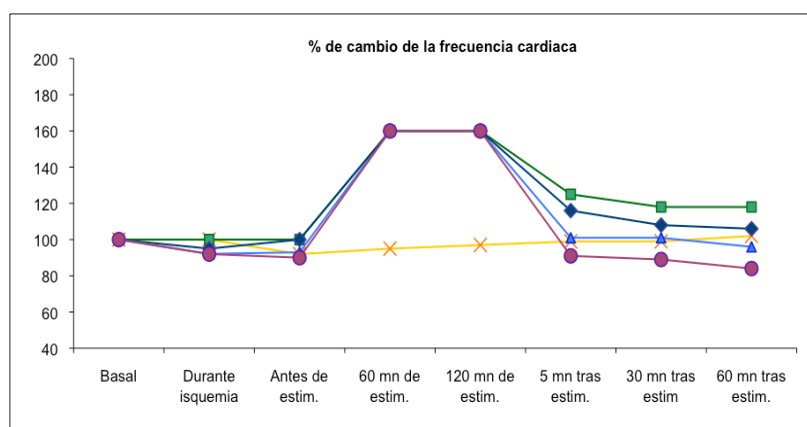


Figura 23.- Porcentaje de cambio de la frecuencia cardiaca en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas. * $p \leq 0,05$.

En las 3 series con isquemia se objetivó un reducción del Vol. lat. durante la oclusión de la CDA respecto a las otras 2 series, aunque las diferencias no alcanzaron la significación estadística. Tampoco en la reperfusión hallamos diferencias. Durante la sobreestimulación, en todas las series donde se realizó el Vol. lat. disminuyó, también sin diferencias significativas. La serie que redujo más este parámetro fue la serie con isquemias cortas y repetidas (●) aunque sin diferencias estadísticas respecto al resto de series. Tras cesar la taquicardia, el Vol lat. aumentó en todas las series. Es más, en esta serie el Vol. lat. disminuyó progresivamente, alcanzando un valor de $p = 0,07$ frente al promedio de las series con isquemia continua (▲◆) y $p = 0,01$ frente a las series sin isquemia (X■), a los 60 minutos de la recuperación (figura 24).

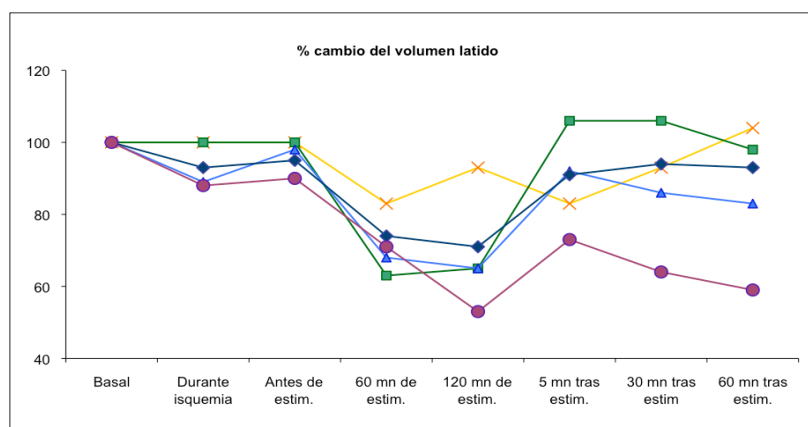


Figura 24.- Porcentaje de cambio del volumen latido en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas. * $p \leq 0,05$.

El G. C. también se redujo en las tres series con isquemia, durante la misma, entre un 10 y un 20% respecto al valor inicial, pero sin diferencias entre series ($p > 0,05$ entre ellas y respecto a las dos series control (sin isquemia)). A los 60 minutos de iniciada la taquicardia, el G. C. se mantuvo en valores similares a los iniciales en todas las series excepto en la serie con isquemia previa de 20 minutos (◆) en la que se incrementó un, no significativo, 25%. A los 120 minutos del inicio de la taquicardia, el G. C. se redujo en la serie con isquemias breves y repetidas (●) un 16% respecto a su valor inicial pero tampoco sin diferencias respecto al resto de series. Tras el cese de la sobreestimulación, la serie sin isquemia (■) incrementó inmediatamente el G. C. incluso un 40% por encima del valor inicial. Esto contrastó ($p < 0,05$) con la reducción que experimentó la serie (●). No hubo diferencias estadísticas entre las series con isquemia en este punto del experimento. Al final de la fase de recuperación, la serie (●) solo demostró diferencias significativas ($p = 0,04$) respecto a las series sin isquemia (X ■) mientras que, aunque frente a las dos series con isquemia continua (▲◆) las medias del cambio porcentual del G. C. fueron muy diferentes (58,9 (●) vs 97,9 (▲◆)), la p fue no significativa por la amplia desviación típica de la serie (●) ($DE = 46,7$) (figura 25).

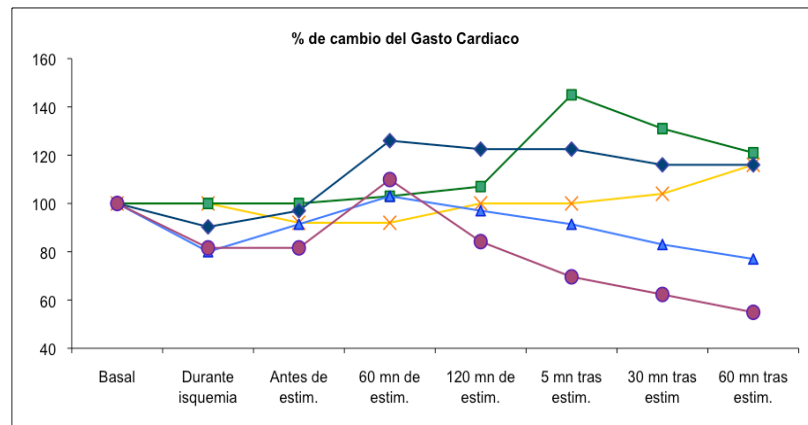


Figura 25.- Porcentaje de cambio del gasto cardiaco en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin ischemia, ▲ serie con ischemia 10 min., ◆ serie con ischemia 20 min., ● serie con ischemias breves y repetidas. * $p \leq 0,05$.

En las series con ischemia, la PSVI se redujo ligeramente (entre un 5 y un 10%) durante la oclusión de la CDA, tendiendo a recuperarse en la reperusión. Durante la taquicardia todas las series (excepto la serie *sham*) redujeron la PSVI, sin diferencias entre ellas. A los cinco minutos de cesar la taquicardia hubieron diferencias significativas entre la serie con ischemia cortas y repetidas (●) y las series sin ischemias (X■) ($p < 0,01$) y las series con ischemias de 10 y 20 minutos (▲◆) ($p < 0,01$). Al final de la recuperación se encontraron diferencias solo entre la serie con ischemias cortas y repetidas (●) y las series con ischemias continuas (▲◆) ($p = 0,036$). Respecto a las series control (sin ischemia) el valor de p alcanzado fue de 0,1 (figura 26).

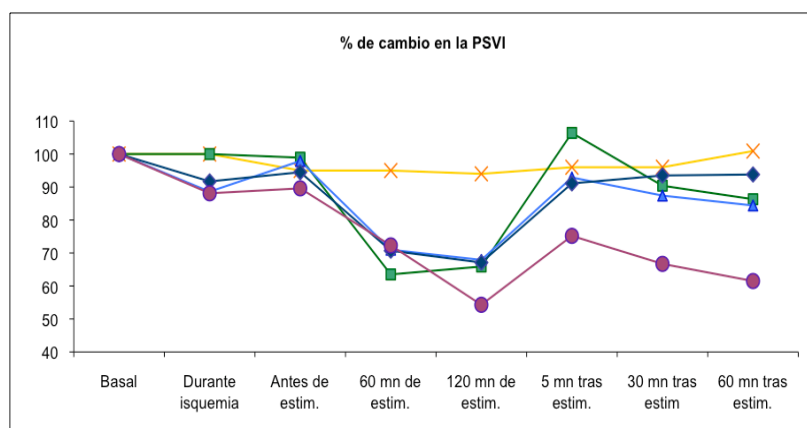


Figura 26.- Porcentaje de cambio de la presión sistólica del V. Izdo. en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin ischemia, ▲ serie con ischemia 10 min., ◆ serie con ischemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas. * $p \leq 0,05$.

La dP/dt positiva se redujo significativamente en la serie con ischemia breves y repetidas (●) frente a la serie con ischemia de 10 minutos (▲) ($p = 0,01$) al final de la fase de ischemia. Estas diferencias se mantuvieron durante la reperusión ($p < 0,02$) tanto frente a la serie (▲) como respecto al promedio de las dos series con ischemia continua (▲◆). La dP/dt positiva no mostró diferencias estadísticamente significativas entre las series durante la taquicardia aunque la serie con isquemias breves y repetidas (●) fue la que obtuvo valores más bajos respecto a los iniciales. Al cesar la taquicardia, sí encontramos diferencias importantes en el porcentaje de cambio de la dP/dt positiva entre series: a los cinco minutos del cese, la dP/dt en la serie con ischemia cortas y repetidas (●) obtuvo un valor de p de 0,09 frente a la serie con ischemia de 20 minutos

(◆) y $<0,01$ frente al promedio de las dos series con isquemia continua (▲◆). La diferencia entre las series (●) y (◆) se incrementó a los 30 minutos ($p = 0,06$) y a los 60 minutos ($p = 0,001$). También al final de la fase de recuperación (60 minutos) se detectaron diferencias entre la serie con isquemia cortas y repetidas (●) y las series con isquemia continua (▲◆) ($p=0,005$). Respecto a las series sin isquemia (X■) el valor de p obtenido fue de de 0,01 (figura 27).

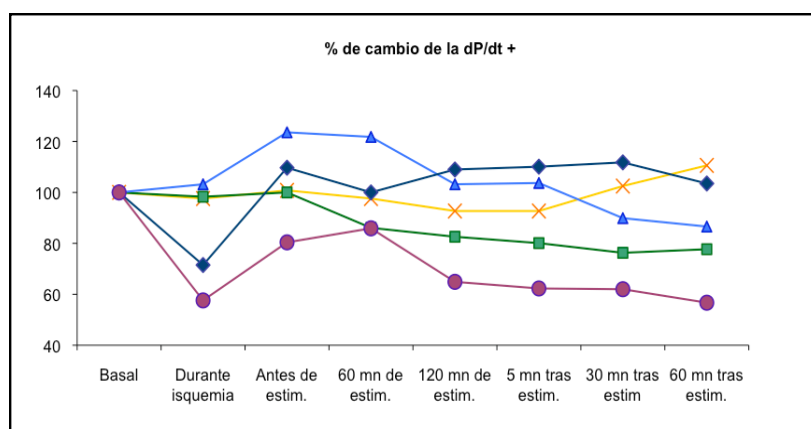


Figura 27.- Porcentaje de cambio de la dP/dt+ en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas. * $p \leq 0,05$.

La PTDVI no mostró diferencias ni durante la isquemia ni en la perfusión, aunque en esta última fase se observó una tendencia (no significativa estadísticamente) a una PTDVI más elevada en la serie con isquemias breves y repetidas (●). Durante la sobreestimulación no hubo diferencias entre las series. Tras el cese de la taquicardia, la PTDVI se elevó, en promedio, más del 60% en

la serie con isquemia de 20 minutos (◆) pero sin ser estadísticamente significativo por las amplias desviaciones típicas obtenidas. A los 30 y 60 minutos de la recuperación los valores entre series fueron similares entre si y muy cercanos al inicial (figura 28).

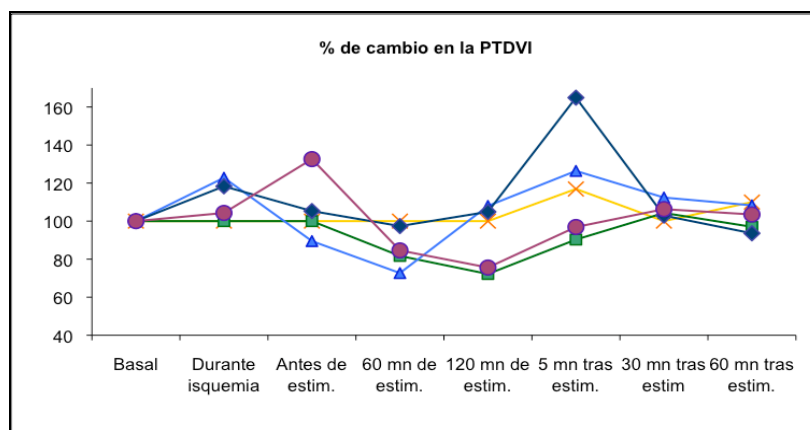


Figura 28.- Porcentaje de cambio de la presión telediastólica del V. Izdo. en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

Durante la isquemia, la reducción porcentual de la dP/dt negativa fue significativamente mayor en la serie con isquemias breves y repetidas (●) respecto a la serie con isquemia de 10 minutos (▲) ($p=0,001$) y la serie con isquemia de 20 minutos (◆) ($p=0,06$). No hubieron diferencias ni a mitad ni al final de la sobrestimulación aunque la serie (●) mostró valores más bajos que el resto de series. Tras el cese de la taquicardia, la dP/dt – se comportó de forma diferente en la serie (●) respecto al resto de series. En la figura 29 se observa que al final del experimento es claramente menor que en el

resto. Estadísticamente se han encontrado diferencias entre la serie con isquemias cortas y repetidas (●) y la serie con isquemia 20 minutos (◆), a los 5 (p= 0,06), a los 30 (p=0,03) y a los 60 minutos (p=0,006) del cese de la taquicardia. A los 60 minutos también encontramos diferencias entre la serie con isquemias cortas y repetidas (●) y las series con isquemia de 10 minutos (▲) (p=0,02) y con las series sin isquemia (X■) (p=0,003).

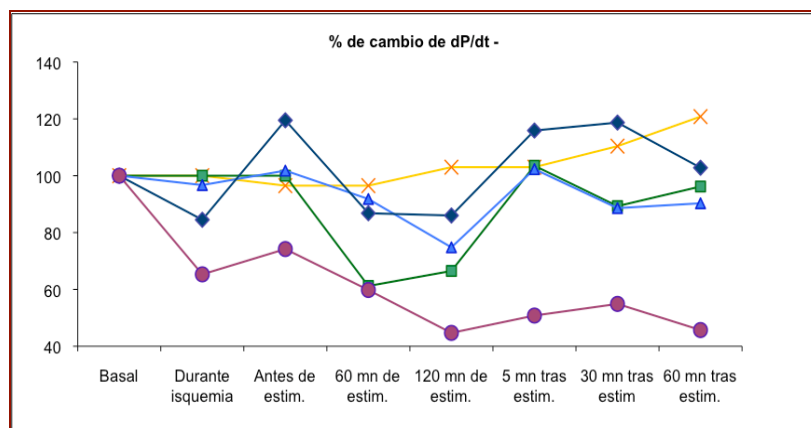


Figura 29.- Porcentaje de cambio de la dP/dt - en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

2.2.- Parámetros de función regional.

2.2.1.- Zona dependiente de la CCx.

El porcentaje de cambio en la LTD en la zona dependiente de la CCx durante la isquemia y durante la reperusión no demostró diferencias significativas entre las series. Tampoco las encontramos durante la sobreestimulación ni tras el cese de esta (figura 30).

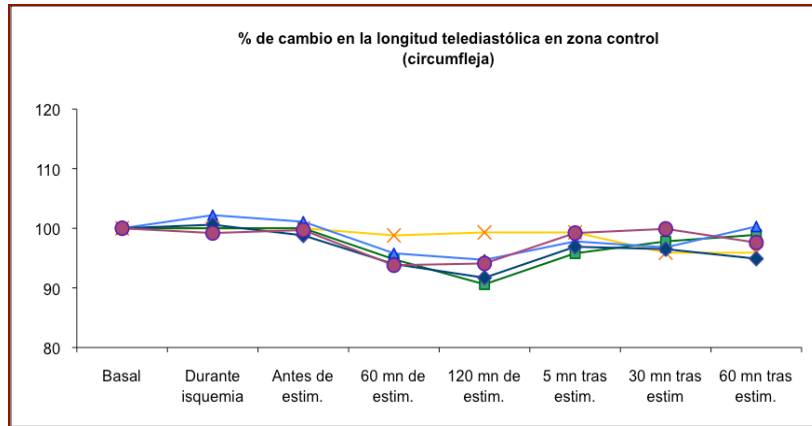


Figura 30.-Porcentaje de cambio de la LTD en la zona dependiente de la CCx. X serie sham (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

Tampoco hallamos diferencias entre las distintas series para la LTS en ninguna de las fases del experimento (figura 31).

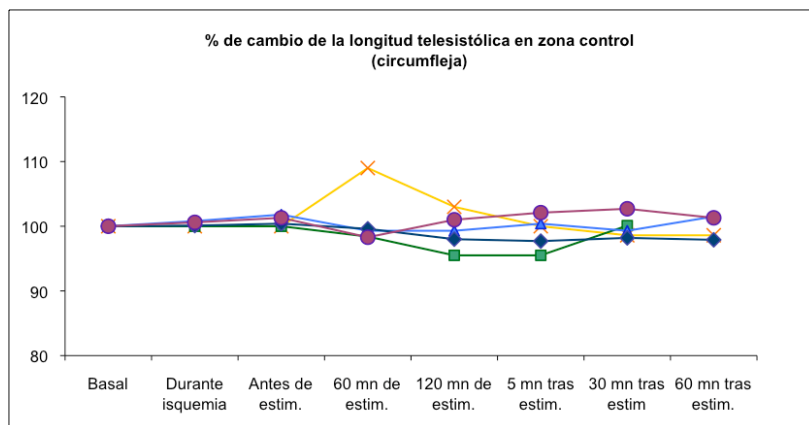


Figura 31.-Porcentaje de cambio de la LTS en la zona dependiente de la CCx. X serie sham (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

En la variable porcentaje de cambio de la F. Ac. encontramos diferencias estadísticamente significativas durante la realización de la isquemia entre la serie con isquemia breves y repetidas (●) y las series con isquemia de 10 y 20 minutos (▲◆) ($p=0,03$). Durante la estimulación se obtuvieron, a las dos horas de la taquicardia, reducciones de la F. Ac. significativamente mayores en la serie con isquemias cortas y repetidas (●) y en la serie con isquemia 20 minutos (◆) frente a la serie *sham* (X) ($p<0,001$) y respecto a las series con isquemia 10 minutos (▲) y con sobreestimulación pero sin isquemia (■) ($p=0,04$). La F. Ac. en la dependiente de la CCx no demostró diferencias entre las series durante la recuperación, aunque se observó una tendencia descendente en la serie con isquemias breves y repetidas (●) que alcanzó un valor de p de 0,07 frente a las series con isquemia continua (▲◆) (figura 32).

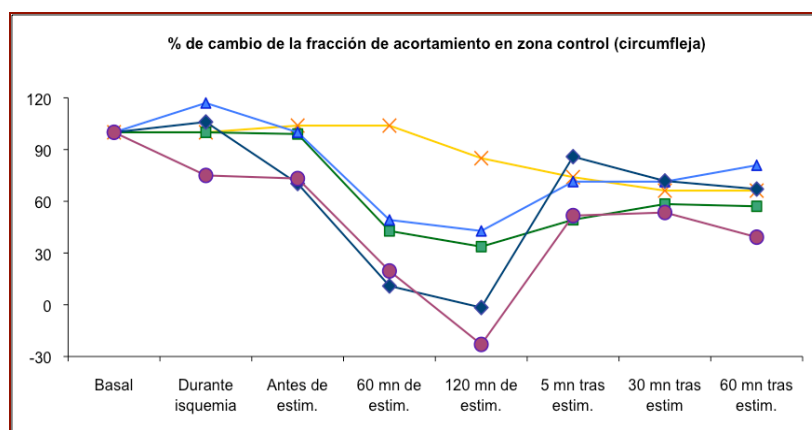


Figura 32.- Porcentaje de cambio de la F. Ac en la zona dependiente de la CCx. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

2.2.2.- Zona dependiente de la CDA.

No hallamos diferencias estadísticamente significativas en la LTD durante ninguna de las fases del experimento en zona dependiente de la CDA entre series (figura 33).

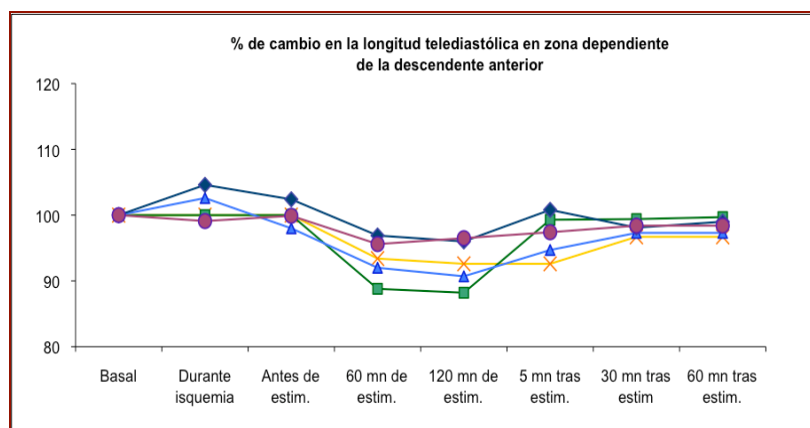


Figura 33- Porcentaje de cambio de la LTD en la zona dependiente de la CDA. X serie sham (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

Lo mismo ocurrió con la LTS aunque gráficamente se observa que, durante la isquemia, el porcentaje de aumento de dicha longitud (y por tanto de menor acortamiento sistólico) fue mayor en las series con isquemia prolongada de 10 y 20 minutos frente a la serie con isquemias breves y repetidas (figura 34).

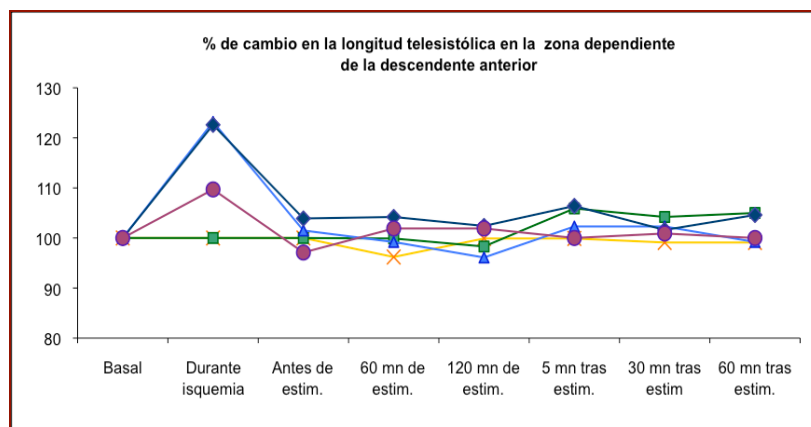


Figura 34.- Porcentaje de cambio de la LTS en la zona dependiente de la CDA. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin ischemia, ▲ serie con ischemia 10 min., ◆ serie con ischemia 20 min., ● serie con ischemias breves y repetidas.

Durante la realización de la ischemia no encontramos diferencias en el porcentaje de cambio de la F. Ac. entre las tres series con ischemia (▲◆●). Durante la reperfusion, la serie que alcanzó valores más altos de F. Ac. fue la serie con ischemias breves y repetidas (●), pero sin demostrarse diferencias significativas respecto a las series con ischemia continua (▲◆). Durante la estimulación todas las series mostraron valores significativamente más bajos en la fracción de acortamiento frente a la serie *sham* (X), pero entre ellas no se hallaron valores de p significativos. Tampoco tras el cese de la taquicardia encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las series, a excepción de un valor de $p = 0,03$ entre las series con ischemia continua (▲◆) y las dos series sin ischemia (X■) a los 5 minutos del cese (figura 35).

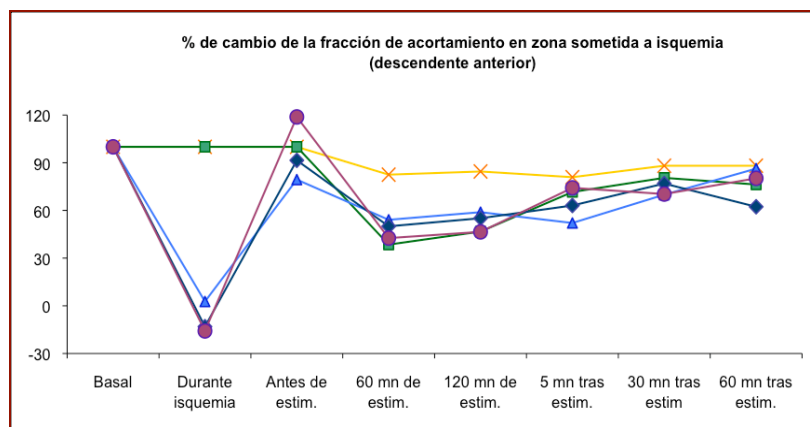


Figura 35.- Porcentaje de cambio en la F. Ac. en la zona dependiente de la CDA. X serie *sham* (datos extrapolados a fases temporales equivalentes), ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

3.- Parámetros de estrés oxidativo en cada una de las series.

3.1.- Serie *sham* (tabla 18).

La cantidad de lipoperóxidos (LPO) que se detectó a los 60 minutos tras abrir el tórax no demostró diferencias significativas respecto a los valores obtenidos antes de la esternotomía. Sin embargo, se objetivó un descenso significativo, del 68%, en los valores de LPO a las dos horas de observación. A la tercera y cuarta hora de iniciado el experimento se objetivó un incremento progresivo de la cantidad de LPO, llegando a alcanzar valores similares a los iniciales.

Sin embargo, la actividad glutatión total (GSH + GSSG) sí disminuyó tras la apertura del tórax, manteniéndose reducida durante el resto del experimento. Este comportamiento es atribuible a que

hubo un consumo significativo del glutatión reducido sin cambios significativos en la concentración del glutatión oxidado. Ello llevó a una reducción significativa de la actividad antioxidante dependiente del glutatión (cociente GSH/GSSG) a partir de la primera hora de observación.

	Basal (tórax cerrado)	60 min.	120 min.	180 min.	240 min.
LPO (nmol/l)	20,1 ± 1,5	19,3 ± 2,8	6,5 ± 0,9 *	15,8 ± 3,9	19,4 ± 5,1
GSH + GSSG (μmoles/l)	4,7 ± 1,73	1,5 ± 0,36*	2,5 ± 0,49	2,5 ± 0,35 #	2,5 ± 0,7
GSH (μmoles/l)	4,4 ± 0,8	1,2 ± 0,3*	2,2 ± 0,5 *	2,2 ± 0,4*	2,2 ± 0,7*
GSSG (μmoles/l)	0,31 ± 0,12	0,30 ± 0,1	0,32 ± 0,5	0,30 ± 0,6	0,33 ± 0,1
GSH/GSSG	14,2 ± 5,3	4 ± 11*	6,9 ± 1,6*	7,9 ± 3,3*	6,7 ± 1,9*

Tabla 18- Parámetros de estrés oxidativo en la serie *sham*. * $p \leq 0,05$ respecto al valor inicial. # $p =$ entre 0,051 y 0,1 respecto al valor inicial.

En la figura 36 se describe la evolución de la cantidad de LPO detectada respecto al cociente GSH/GSSG. Se observa que, a los 60 minutos, el incremento ligero que se observó en los LPO se acompañó de un descenso brusco del cociente GSH/GSSG; a los 120 minutos, se redujeron los niveles de LPO observándose un aumento ligero pero progresivo de la concentración de LPO sin incrementarse el cociente GSH/GSSG.

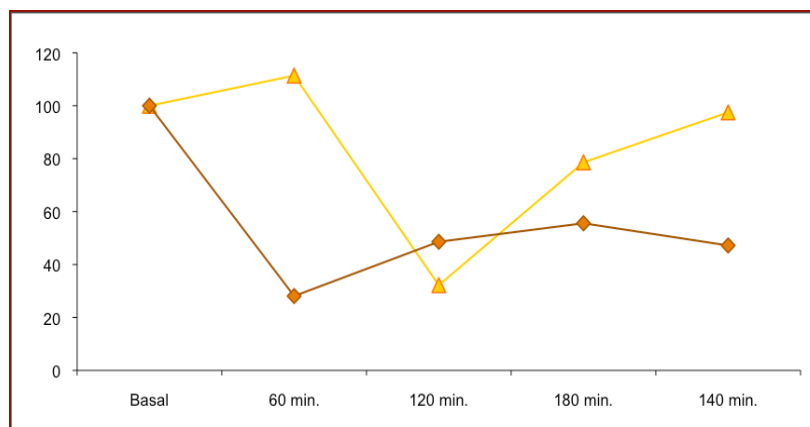


Figura 36.- Relación entre el porcentaje de cambio de LPO y de actividad antioxidante (respecto a sus valores iniciales) en las distintas fases del protocolo en la serie *sham*. ▲ lipo-peroxidación (LPO), ◆ cociente GSH/GSSG.

3.2.- Serie con sobreestimulación y sin isquemia (tabla 19).

Como en la serie *sham*, los LPO no se modificaron tras la apertura del tórax. Durante la taquicardia, en la muestra obtenida a los 60 minutos, se observó una reducción, del 35% respecto al valor inicial, que fue estadísticamente significativa. Tras el cese de la taquicardia, en la muestra obtenida en los primeros cinco minutos de la recuperación, los valores de LPO siguieron por debajo de los iniciales, recuperándose al final de la observación.

Tras la apertura del tórax, el glutatión total disminuyó en la fase que precedió a la estimulación, tal como sucedió en la serie *sham*. Sin embargo, fue llamativo el aumento en su concentración durante la sobreestimulación, manteniéndose sin cambios significativos en la fase posttaquicardia. Los cambios en la

concentración de GSH siguieron la misma evolución que los del glutatión total.

El glutatión oxidado se redujo tras la apertura del tórax, incrementándose de nuevo durante la taquicardia, pero sin diferencias significativas respecto a sus valores iniciales. Tras el cese de la sobreestimulación la concentración del glutatión oxidado descendió, casi alcanzando valor estadístico. Al final de la recuperación, la concentración de GSSG experimentó un incremento alcanzando un valor de p con tendencia a la significación ($p = 0,09$).

Al analizar la actividad antioxidante dependiente del glutatión a lo largo de este experimento observamos una reducción significativa del cociente GSH/GSSG tras la apertura del tórax, y una igualación a sus valores iniciales durante la taquicardia y a los 60 minutos tras la misma.

	Basal (tórax cerrado)	Pretaqui	Taqui60m	rec5 m	rec60 m
LPO (nmol/l)	19 ± 1,03	18,9 ± 0,7	12,3 ± 0,8 [‡]	15,7 ± 1,9*	17,8 ± 0,9
GSH + GSSG (μmoles/l)	4,4 ± 0,3	1,9 ± 0,8 [‡]	4,8 ± 3,8	4,2 ± 2,2	5,8 ± 2,9
GSH (μmoles/l)	4,1 ± 0,6	1,6 ± 0,5 [‡]	4,5 ± 3,7	3,9 ± 2,3	5,4 ± 2,8
GSSG (μmoles/l)	0,28 ± 0,17	0,24 ± 0,19	0,3 ± 0,08	0,24 ± 0,1 [#]	0,44 ± 0,15 [#]
GSH/GSSG	15,5 ± 3,3	5,3 ± 1,4 [‡]	14,6 ± 9,7	11,9 ± 23,1	13,2 ± 3,8

Tabla 19.- Parámetros de estrés oxidativo en la serie con sobreestimulación y sin isquemia. [#] $p =$ entre 0,051 y 0,1. * $p \leq 0,05$. [‡] $p \leq 0,01$. Todas las estimaciones son respecto al valor inicial.

En la figura 37 se representa la evolución de la cantidad de LPO detectada respecto al cociente GSH/GSSG en esta serie, ambas variables representadas como porcentaje de cambio respecto a su valor inicial. Al igual que en la serie *sham*, la reducción de los niveles de LPO fue precedida de una disminución del cociente GSH/GSSG; sin embargo, durante la taquicardia existió una rápida recuperación la capacidad antioxidante del glutatión a expensas de la producción de GSH, algo no observado en la serie *sham*.



Figura 37.- Relación entre el porcentaje de cambio de LPO y de actividad antioxidante (respecto a sus valores iniciales) en las distintas fases del protocolo en la serie con sobreestimulación y sin isquemia. ▲ lipo-peroxidación (LPO), ◆ cociente GSH/GSSG.

3.3.- Serie con isquemia de 10 minutos (tabla 20).

Tras la apertura del tórax y realización de la isquemia, en esta serie no se detectaron cambios en la concentración del LPO respecto a su valor inicial en la fase de reperusión. Este hallazgo

coincide con lo ocurrido en la serie *sham* y en la serie con sobreestimulación pero sin isquemia. Durante la sobreestimulación y en la fase de recuperación, los valores de LPO mostraron una tendencia decreciente que alcanzó valor estadísticamente significativo a los 60 minutos del cese de la taquicardia.

Como en las series anteriores, hubo un consumo significativo del GSH que se reflejó en la actividad glutatión total, la cual disminuyó tras la isquemia y se mantuvo reducida el resto del experimento. El GSSG permaneció sin cambios estadísticamente significativos a lo largo del experimento, con un incremento al final que obtuvo un valor de p cercano a la significación.

El cociente GSH/GSSG disminuyó significativamente durante la reperusión y se mantuvo reducido durante la taquicardia y en la fase de recuperación.

	Basal (tórax cerrado)	Reperusión	Taqui60m	rec5 m	rec60 m
LPO (nmol/l)	15,9 ± 6,3	17,5 ± 5,2	10,2 ± 5,3	11,6 ± 2,9	9,7 ± 2,8 *
GSH + GSSG (μmoles/L)	4,8 ± 1,3	2 ± 0,8*	2 ± 1,2 [#]	2 ± 0,5*	2,4 ± 0,9*
GSH (μmoles/L)	4,6 ± 1,4	1,7 ± 0,8*	1,8 ± 1,2 [#]	1,8 ± 0,5*	1,9 ± 0,9*
GSSG (μmoles/L)	0,28 ± 0,12	0,25 ± 0,08	0,27 ± 0,03	0,21 ± 0,02	0,43 ± 0,17 [#]
GSH/GSSG	20,1 ± 4,6	7,7 ± 4,6 *	6,5 ± 4,2 *	8,7 ± 1,5	5,5 ± 3,1 [‡]

Tabla 20.- Parámetros de estrés oxidativo en la serie con isquemia de 10 minutos. [#] p= entre 0,051 y 0,1. * p≤ 0,05. [‡] p≤ 0,01. Todas las estimaciones son respecto al valor inicial.

En la figura 38 se observa que tras la apertura del tórax y realización de la isquemia de 10 minutos la actividad antioxidante dependiente del glutatión se redujo y, esta reducción precedió a la disminución en la concentración de LPO durante la taquicardia. Sin embargo, durante la sobreestimulación, el cociente GSH/GSSG no se recuperó como sí lo hizo en la serie anterior. Tras el cese de la taquicardia, disminuyeron los niveles de LPO siguiendo una evolución paralela los valores del cociente GSH/GSSG.

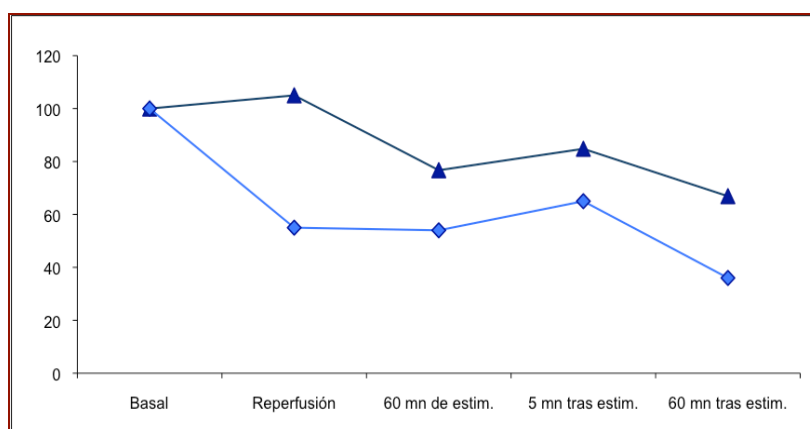


Figura 38.- Relación entre el porcentaje de cambio de LPO y de actividad antioxidante (respecto a sus valores iniciales) en las distintas fases del protocolo en la serie con isquemia de 10 min. ▲ lipo-peroxidación (LPO), ◆ cociente GSH/GSSG.

3.4.- Serie con isquemia de 20 minutos seguida de estimulación (tabla 21).

La concentración de LPO disminuyó ligeramente respecto a los iniciales durante la reperusión (tal como ocurrió en la serie con

isquemia de 10 minutos). Durante la sobreestimulación se redujo aún más, pero sin alcanzar la significación estadística. Durante la recuperación, y a diferencia de la serie con isquemia de 10 minutos, los valores de LPO se incrementaron de forma progresiva alcanzando cifras incluso algo superiores a las basales al final de la recuperación (valores de $p > 0,1$).

El glutatión total se redujo significativamente durante la reperfusión, precediendo al descenso de LPO durante la sobreestimulación, hallazgo que se observó en todas las series. Durante la taquicardia sus valores se recuperaron lo que no se observó en la serie anterior, en que los valores de glutatión total permanecieron bajos. En la extracción realizada a los 5 minutos del cese de la taquicardia volvieron a disminuir, normalizándose de nuevo al final de la recuperación.

Como en el resto de series el GSH siguió el mismo patrón que el glutatión total. Mientras, el GSSG fluctuó pero sin cambios significativos respecto a su valor inicial, siguiendo sus valores un patrón descendente-ascendente a lo largo del experimento.

Durante la reperfusión se redujo de forma significativa el cociente GSH/GSSG. Sin embargo este cociente se recuperó durante la sobreestimulación, volviendo a reducirse tras el cese de la taquicardia y manteniéndose reducido respecto a los valores iniciales hasta el final de la fase de recuperación.

	Basal (tórax cerrado)	Reperusión	Taqui60m	rec5 m	rec60 m
LPO (nmol/l)	13,9 ± 3,4	11,6 ± 3,9	8,9 ± 2,4	13,9 ± 2,6	15,6 ± 1,8
GSH + GSSG (μmoles/L)	5 ± 0,6	1,1 ± 0,2 ‡	5,1 ± 1,5	1,5 ± 0,6 ‡	4 ± 3,1
GSH (μmoles/L)	4,7 ± 0,7	0,8 ± 1,1 ‡	4,8 ± 1,4	1,2 ± 0,6 ‡	3,7 ± 2,9
GSSG (μmoles/L)	0,29 ± 0,13	0,25 ± 0,03	0,21 ± 0,07	0,27 ± 0,07	0,32 ± 0,13
GSH/GSSG	20,5 ± 5,3	3,4 ± 0,6 ‡	23,4 ± 6,3	5,1 ± 3,8 ‡	10,1 ± 4,5 ‡

Tabla 21.- Parámetros de estrés oxidativo en la serie con isquemia de 20 minutos.[#] p= entre 0,051 y 0,1. * p≤ 0,05. ‡ p≤ 0,01. Todas las estimaciones son respecto al valor inicial.

En la figura 39 se representa la evolución de la cantidad de LPO detectada respecto al cociente GSH/GSSG. Tras una reducción ligera inicial, la tendencia de la concentración de LPO es a aumentar tras el cese de la taquicardia, con las fluctuaciones descritas en la actividad antioxidante del glutatión.

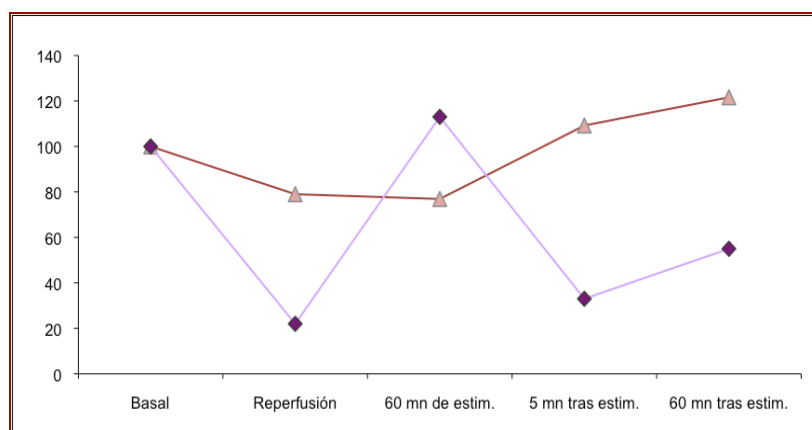


Figura 39.- Relación entre el porcentaje de cambio de LPO y de actividad antioxidante (respecto a sus valores iniciales) en las distintas fases del protocolo en la serie con isquemia de 20 min. ▲ lipo-peroxidación (LPO), ◆ cociente GSH/GSSG.

3.5.- Serie con 20 isquemias breves y repetidas (tabla 22).

Como en todas las series con isquemia, en la extracción realizada durante la reperusión no se detectaron cambios significativos en los valores de LPO respecto a los iniciales. Así mismo, y durante la taquicardia, se objetivó una disminución de los LPO que sí resultó estadísticamente significativa. Tras el cese de la sobreestimulación, los niveles de LPO se incrementaron progresivamente hasta valores superiores a los iniciales al final de la observación (60 minutos del cese de la taquicardia). Esta fue la única serie donde se observó un incremento significativo de este marcador de estrés oxidativo al final del experimento.

La concentración de glutatión total, al igual que del GSH, se redujo progresivamente hasta hacerse la diferencia respecto al valor

inicial muy significativa. Mientras, el glutatión oxidado tendió a reducirse aunque sin alcanzar la significación estadística.

Por el contrario, el cociente GSH/GSSG presentó una reducción progresiva a lo largo del experimento que ocurrió a expensas del consumo del glutatión reducido.

	Basal (tórax cerrado)	Reperusión	Taqui60m	rec5 m	rec60 m
LPO (nmol/l)	13,9 ± 2,6	16,1 ± 5,2	8,1 ± 3,2 *	13,3 ± 3,7	17,6 ± 3,6*
GSH + GSSG (μmoles/L)	4,3 ± 0,3	3,1 ± 2,5	2,4 ± 1,9	1,6 ± 0,5 ‡	1,5 ± 0,4 ‡
GSH (μmoles/L)	3,9 ± 0,2	2,8 ± 2,5	2,1 ± 1,9	1,3 ± 0,7 ‡	1,3 ± 0,4 ‡
GSSG (μmoles/L)	0,33 ± 0,14	0,28 ± 0,03	0,32 ± 0,02	0,27 ± 0,04	0,29 ± 0,02
GSH/GSSG	13,3 ± 4,3	8,7 ± 6,2 #	6,7 ± 6,1 #	4,3 ± 2 *	4,4 ± 1,3 *

Tabla 22.- Parámetros de estrés oxidativo en la serie con 20 isquemias breves y repetidas. # p= entre 0,051 y 0,1. * p≤ 0,05. ‡ p≤ 0,01. Todas las estimaciones son respecto al valor inicial.

En la figura 40 se representa la evolución del porcentaje de cambio de la cantidad de LPO detectada respecto al cociente GSH/GSSG. La realización de isquemias breves y repetidas produjo en la reperusión un incremento ligero de LPO y una reducción del cociente GSH/GSSG. Durante la taquicardia se objetivó una reducción de LPO y tras la taquicardia, el progresivo consumo del sistema antioxidante del glutatión condujo a un incremento progresivo de los niveles de LPO, que además fue el mayor de todas las series estudiadas.

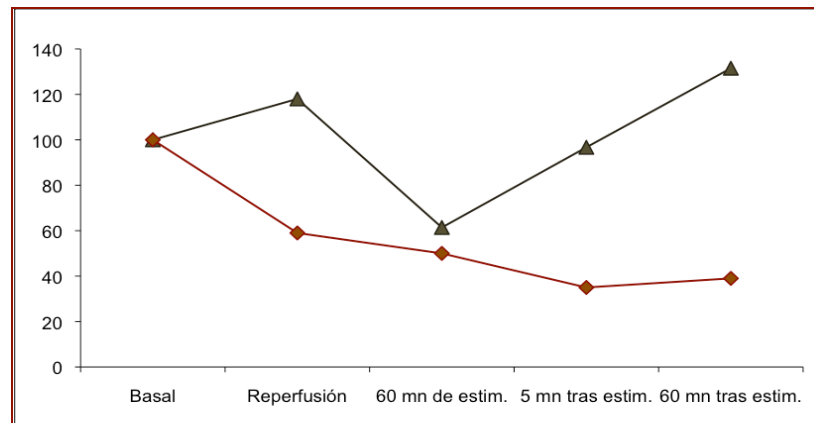


Figura 40.- Relación entre el porcentaje de cambio de LPO y de actividad antioxidante (respecto a sus valores iniciales) en las distintas fases del protocolo en la serie con isquemia breves y repetidas. ▲ lipo-peroxidación (LPO), ◆ cociente GSH/GSSG.

4.- Comparación de los resultados de estrés oxidativo entre las series.

4.1.- Lipoperoxidación (LPO).

En la figura 41 se representa el porcentaje de cambio de los LPO respecto al valor inicial en cada una de las series. En la extracción realizada antes de la sobrestimulación, que corresponde a la fase de reperusión en las series en las que se realizó isquemia, observamos que no hubo grandes diferencias en el comportamiento entre series ya que no se obtuvo significación estadística. Ni siquiera entre la serie con isquemia de 20 minutos, que disminuyó

ligeramente los valores de LPO, y la serie con isquemias breves y repetidas que los incrementó.

Durante la taquicardia, todas las series redujeron sus niveles de LPO, sin diferencias entre ellas.

Tras el cese de la taquicardia se incrementaron los valores de LPO respecto a los valores obtenidos durante la sobreestimulación en todas las series (incluida la *sham*) excepto en la serie con isquemia más corta (de 10 minutos) en que no se modifican.

Al final del protocolo experimental, la serie con isquemias breves y repetidas (●) mostró diferencias significativas en los niveles de LPO frente a la serie *sham* (x), la serie con sobreestimulación y sin isquemia (■) ($p=0,05$ en ambas) y la serie con isquemia 10 minutos (▲) ($p=0,02$).

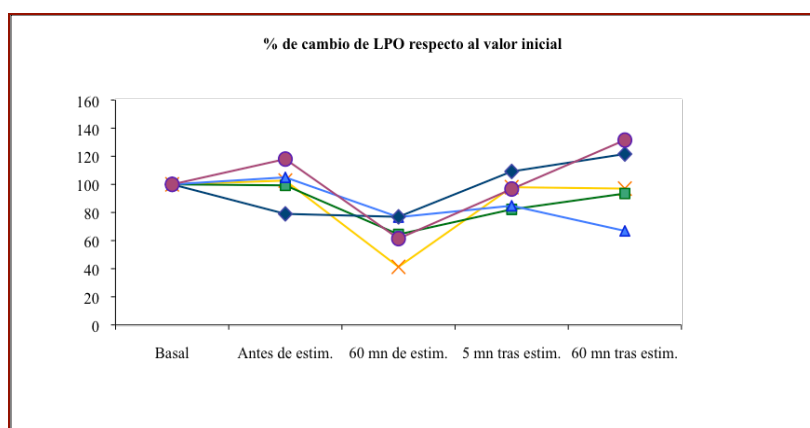


Figura 41.- Porcentaje de cambio de LPO respecto al valor inicial en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie *sham*, ■ serie sin isquemia, ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

4.2.- Glutación.

4.2.1.- Actividad glutación total (GSH + GSSG) (figura 42).

Durante el protocolo experimental, detectamos una amplia variabilidad en el comportamiento de la actividad glutación total en plasma.

En la extracción realizada antes de la sobrestimulación, que corresponde a la fase de reperfusión en las series en las que se realizó isquemia, se observó que la actividad glutación total se redujo en todas las series, aunque con menor intensidad en la serie con isquemias breves y repetidas (●). Sin embargo no obtuvimos diferencias estadísticamente significativas. A mitad de la fase de sobreestimulación dos series recuperaron la actividad glutación (la serie con sobreestimulación y sin isquemia (■) y la serie con isquemia prolongada de 20 minutos (◆)) pero sin diferencias estadísticamente significativas respecto al resto.

A los cinco minutos del cese de la taquicardia, todas las series mantuvieron valores inferiores a los iniciales salvo la serie con sobreestimulación y sin isquemia (■), de nuevo sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al final de la prueba sí detectamos diferencias en el sentido de una mayor actividad glutación en la serie con sobreestimulación y sin isquemia (■) que obtuvo valores significativamente mas altos que la serie con isquemias cortas y repetidas (●) ($p=0,034$). Al agrupar las series en 3 grupos (sin isquemia (X ■), con isquemia continua (▲◆) y con

isquemias breves y repetidas (●)) tampoco obtuvimos diferencias estadísticamente significativas.

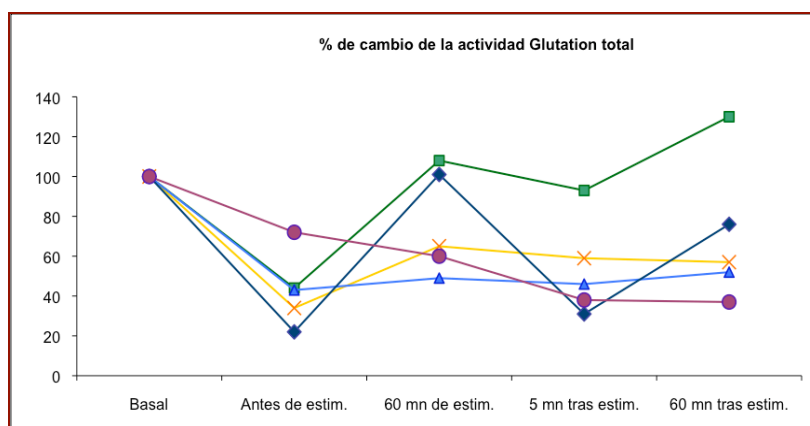


Figura 42.- Porcentaje de cambio de glutatión total (GSH + GSSG) respecto al valor inicial en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham; ■ serie sin isquemia; ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

4.2.2.- Glutatión reducido (GSH) (figura 43).

La figura 43 es prácticamente superponible a la figura 42 que representa la actividad del glutatión total.

Sin embargo, las diferencias se acentuaron (fueron estadísticamente significativas) entre la serie con estimulación y sin isquemia (■) y la serie con isquemia de 20 minutos (◆) ($p=0,03$) y la serie con isquemias breves y repetidas (●) ($p=0,06$), a los cinco minutos del cese de la taquicardia.

Al final del experimento, se incrementaron las diferencias entre la serie con estimulación y sin isquemia (■) y la serie con isquemias breves y repetidas (●) ($p = 0,02$).

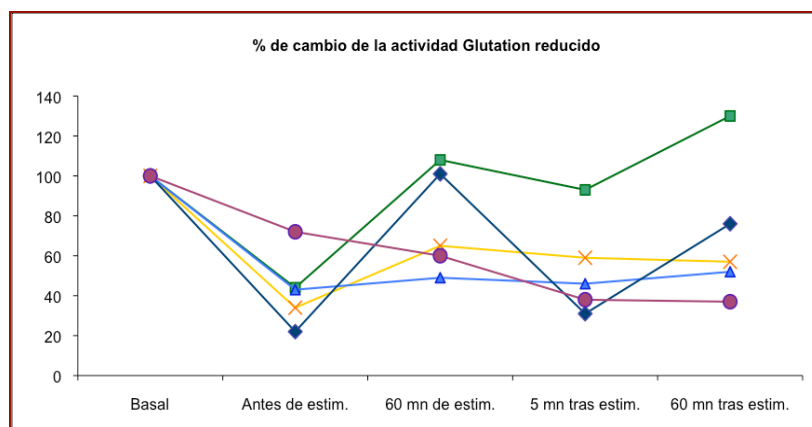


Figura 43.- Porcentaje de cambio del GSH respecto al valor inicial en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham; ■ serie sin isquemia; ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

4.2.3.- Glutathión oxidado (GSSG) (figura 44).

En la figura 44 se representa el porcentaje de cambio del GSSG respecto al valor inicial entre la series.

Durante la reperusión (o antes de sobreestimar), todas las series mantuvieron los niveles de GSSG sin cambios significativos respecto a los iniciales y sin diferencias entre series.

Durante la taquicardia hubo una gran homogeneidad en los valores de GSSG en todas las series.

Tras el cese de la sobreestimulación, y aunque no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre los valores alcanzados por cada serie, si llama la atención el comportamiento diferente de la serie con isquemia breves y repetidas (●) frente a las otras series con isquemia (▲◆), aunque no

se alcanzó significación estadística por unas desviaciones típicas muy amplias.

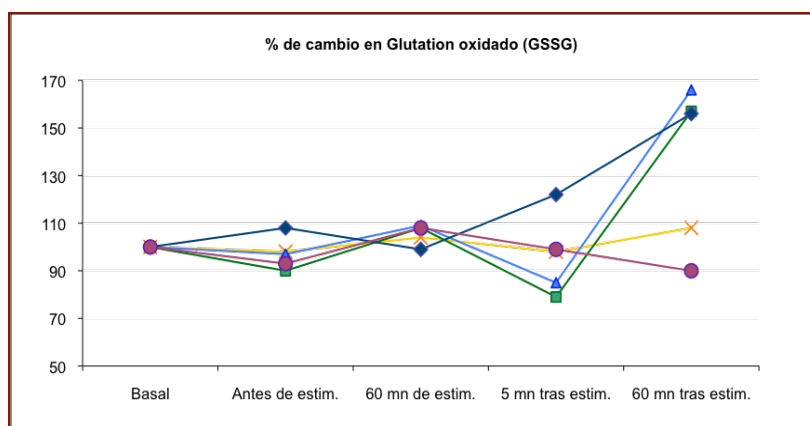


Figura 44.- Porcentaje de cambio del GSSG respecto al valor inicial en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham; ■ serie sin isquemia; ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

4.2.4.- Cociente GSH/GSSG (figura 45).

Se observa en la figura que antes de la estimulación en todas las series se produjo una disminución del cociente GSH/GSSG pero sin diferencias significativas entre las series.

Durante la sobreestimulación dos series aumentaron dicho cociente pero de nuevo sin diferencias estadísticamente significativas entre las 5 series. Es llamativo el incremento del cociente GSH/GSSG en la serie con isquemia de 20 minutos (◆) en este momento del experimento, ya que, además, dicho incremento fue significativo respecto al valor obtenido antes de sobreestimar ($p = 0,05$).

Tras el cese de la taquicardia, a los cinco minutos del mismo, no se obtuvieron diferencias entre las series. Sin embargo, al final de los 60 minutos de la fase de recuperación la serie sin isquemia (■) alcanzó valores significativamente mas altos que las series con isquemia de 10 minutos (▲) ($p=0,03$) y la serie con isquemia breves y repetidas (●) ($p=0,06$). Así mismo, esta serie (●), mostró diferencias respecto al valor promedio de las dos series sin isquemia (X ■) ($p= 0,03$).

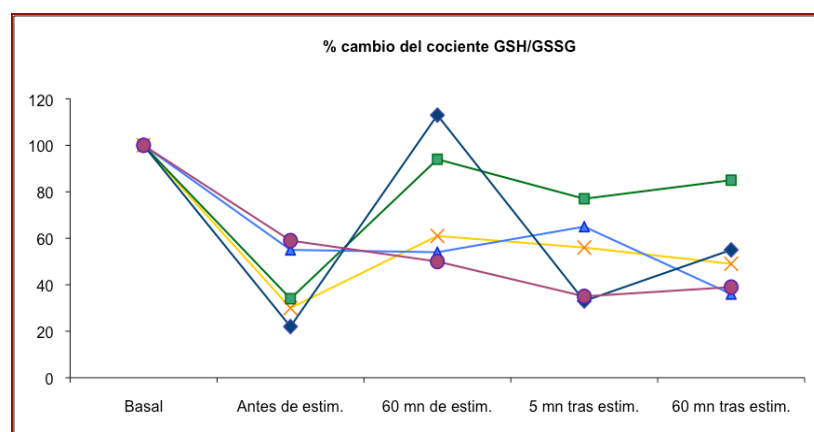


Figura 45.- Porcentaje de cambio del cociente GSH/GSSG respecto al valor inicial en las distintas fases del protocolo en cada una de las series. X serie sham; ■ serie sin isquemia; ▲ serie con isquemia 10 min., ◆ serie con isquemia 20 min., ● serie con isquemias breves y repetidas.

5.- Relación entre función y estrés oxidativo.

5.1.- Función global y estrés oxidativo.

Hemos correlacionado los valores de las variables cuantitativas de función global gasto cardiaco y volumen latido con los de la variable LPO y las diferentes cuantificaciones del glutatión

en cada una de las tres fases de nuestro estudio (reperusión, sobreestimulación y recuperación) y en cada una de las series.

En la fase reperusión no encontramos correlación entre los niveles de LPO y del glutatión con el gasto cardiaco y el volumen latido en ninguna de las series.

Durante la taquicardia, encontramos una correlación negativa y significativa entre el GSSG y el gasto cardiaco ($r = -0,94$, $p = 0,014$) pero solo en la serie con isquemias breves y repetidas (figura 46).

En la recuperación y sólo a los 60 minutos del cese de la sobreestimulación, hallamos correlaciones significativas entre el LPO al final de esta fase y el gasto cardiaco en la serie con isquemias cortas y repetidas ($r = -0,9$, $p = 0,037$) (figura 47).

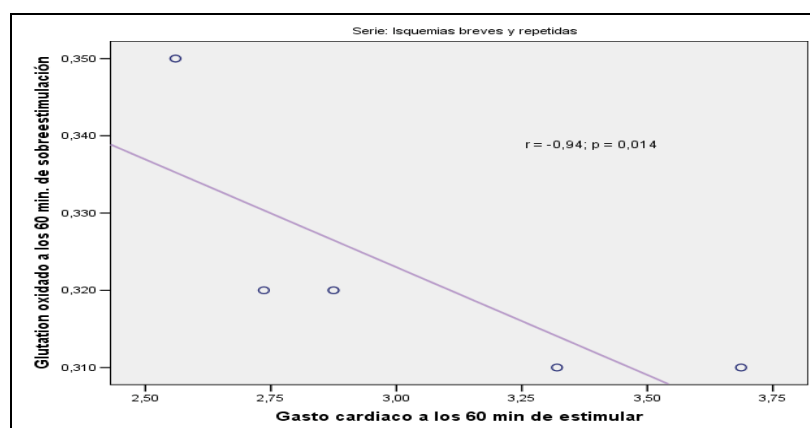


Figura 46.- Correlación entre los valores GSSG y gasto cardiaco a los 60 minutos de taquicardia en la serie con isquemia breves y repetidas.

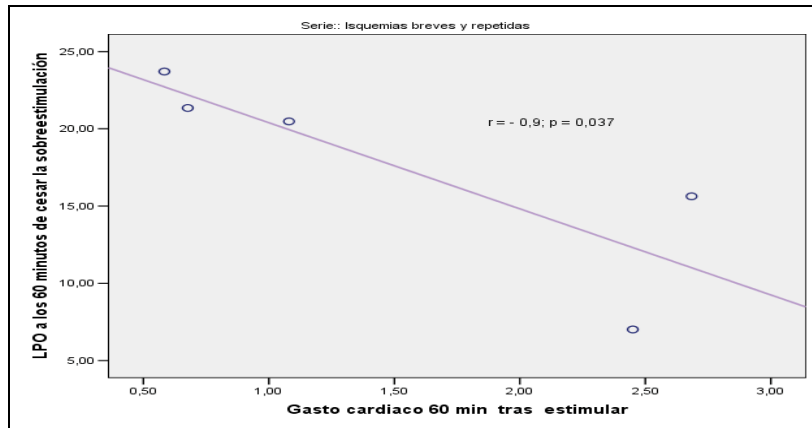


Figura 47.- Correlación entre los valores de LPO y gasto cardíaco a los 60 minutos de cesar la taquicardia en la serie con isquemia breves y repetidas.

5.2.- Función regional y estrés oxidativo.

Así mismo correlacionamos los parámetros de función regional con los de estrés oxidativo analizados no encontrando correlación significativa alguna entre las fracciones de acortamiento en las zonas control e isquémica, en cada una de las fases de reperfusión, sobreestimulación y recuperación y los valores respectivos de LPO y de glutatión en ninguna de las series.

DISCUSIÓN

1.- CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS.

1.1.- El modelo animal.

Como se explicó en la introducción, aunque los mamíferos pequeños, particularmente roedores y conejos, se han utilizado ampliamente en investigación sobre aterosclerosis y trombosis, los mamíferos grandes, sobre todo el perro y el cerdo, se han preferido para estudios de isquemia-reperusión o de insuficiencia cardiaca experimental (Vilahur y cols., 2011).

La isquemia miocárdica es, generalmente, un fenómeno regional y ha sido estudiada experimentalmente en muchas especies animales. Aunque Leonardo da Vinci ya utilizó cerdos para demostrar el movimiento del corazón durante el ciclo cardiaco hace 5 siglos, la utilización del cerdo como modelo animal en experimentación biomédica data del siglo XIX. Sin embargo, su uso no se popularizó debido a los problemas en su manejo. Así, Pavlov prohibió este animal en su laboratorio por considerar a esta especie como histérica debido a sus alaridos (Bollen y cols., 2000). Por ello, durante el siglo XIX y buena parte del siglo XX el perro ha sido, tradicionalmente, la especie animal más utilizada en estudios de isquemia miocárdica. Sin embargo, debido al coste y a la presión social en contra de su uso, el cerdo se ha convertido en un animal cada vez más utilizado en nuestros días (Tumbleson, 1986). Además, existen otras razones de peso para la utilización del modelo porcino en lugar del canino. El corazón del cerdo, al igual que el humano, dispone de una circulación colateral escasa y una

distribución anatómica coronaria similar, a diferencia del perro cuya circulación colateral está muy desarrollada y su distribución coronaria es de predominio izquierdo (Schaper y cols., 1967). Es más, en el perro la relación entre el peso del corazón y el peso corporal es significativamente mayor que en el ser humano. Así, en humanos esta relación es de 5g/kg mientras que es el doble en perros. Por el contrario el corazón del cerdo es similar al humano en todos estos aspectos, aunque depende de la edad del animal. En cerdos jóvenes, de peso entre 25 y 30 kg, la relación peso corazón/peso corporal es similar al hombre mientras que en animales adultos, de peso entre 100 y 200 kg, reducen a la mitad la relación entre peso cardíaco y peso corporal (Hanson, 1958). Por otro lado, se pensó que la utilización de cerdos jóvenes podría causar problemas de extrapolación respecto al ser humano adulto por inmadurez de su sistema nervioso. Sin embargo se sabe que el sistema nervioso central de los cerdos entre 3 y 5 meses de edad ha madurado lo suficiente como para que la regulación cardiovascular sea adecuada (Buckley y cols., 1979; Hendrick y cols., 1990).

Por tanto, el corazón del cerdo tiene el tamaño apropiado para una instrumentación quirúrgica adecuada, tiene una anatomía cardíaca y coronaria similar a la humana, son fáciles de alimentar y relativamente baratos y fáciles de guardar en estabulario (Shen y Vartner, 1996). Además, existe abundante bibliografía sobre su utilización en modelos agudos (con tórax abierto) y crónicos (tórax cerrado) en estudios de isquemia-reperfusión y en modelos crónicos

de taquimiocardiopatía e insuficiencia cardíaca (Vanoli y cols., 2004; Heusch y cols., 2011; Suzuki, y cols. 2011).

De esta forma, queda justificado el uso de este animal en nuestro modelo experimental de isquemia-reperfusión y taquimiocardiopatía aguda.

1.2.- Consideraciones sobre la preparación del animal. Bloqueo neuromuscular, analgesia y anestesia.

El cerdo es un animal que se estresa con facilidad en cautividad, particularmente cuando se le intenta inmovilizar, lo que puede afectar a la función cardiovascular. Por ello los cuidados veterinarios previos al experimento son fundamentales para la validez del método. En nuestro estudio los animales son controlados desde su llegada al estabulario por personal veterinario especializado y con amplia experiencia.

En el cerdo deben tenerse en cuenta varias consideraciones que determinan el protocolo anestésico a seguir: manejo difícil, ausencia de vías venosas periféricas suficientemente grandes y, como se ha comentado, su alta susceptibilidad a padecer estrés. Además, deben seleccionarse aquellos fármacos que menos efectos secundarios indeseables produzcan. Otro aspecto importante es el bloqueo neuromuscular que presenta particularidades en el cerdo relacionadas con la aparición de hipertermia maligna, patología típica de esta especie y que puede presentarse durante el periodo anestésico. En este estudio hemos utilizado bromuro de vecuronio, un bloqueante neuromuscular de la categoría de los agentes no

despolarizantes. Este fármaco se utiliza junto a anestésicos generales, relacionándose el riesgo de provocar hipertermia maligna al uso concomitante de anestésicos volátiles, más que al vecuronio por sí mismo (Buzello y cols., 1985). En nuestras series, 2 cerdos (7,1 %) presentaron hipertermia maligna y fueron por tanto excluidos del estudio. Los criterios diagnósticos de hipertermia maligna utilizados fueron: temperatura rectal superior a 41°C, taquicardia excesiva y contractura en extensión de miembros inferiores.

Otro aspecto importante es la necesidad de administrar analgesia, ya que la realización de una toracotomía estimula las señales aferentes del dolor, lo que conlleva incremento de catecolaminas circulantes. En nuestro estudio realizamos analgesia con cloruro morfíco intravenoso.

La elección del anestésico tiene consideraciones metodológicas importantes debido a que el efecto inotrópico negativo de los anestésicos puede influir en la función ventricular. En la fase de puesta a punto del protocolo experimental, los primeros animales fueron anestesiados con isoflurano, observándose una alta mortalidad antes de finalizar el procedimiento por depresión progresiva de la contractilidad miocárdica. Este problema no se observó al realizar la anestesia con sevoflurano (Díez y cols., 2003). Esta diferencia de efecto intraclase entre los anestésicos volátiles halogenados es concordante con lo publicado en la literatura científica (Priebe y cols., 1988; Mayer y cols., 1991; Ebert y cols., 1997). Por este motivo los primeros cerdos fueron excluidos y se

seleccionó el sevoflurano como anestésico. Los anestésicos volátiles halogenados sevoflurano y desflurano son los únicos que han demostrado reducir la morbilidad y mortalidad perioperatoria tanto en cirugía cardíaca como no cardíaca y así lo recogen las guías de actuación clínica (Landoni y cols., 2007; Fleisher y cols., 2007). El mecanismo de protección de estos anestésicos no ha sido descubierto hasta la fecha pero existen estudios que sugieren un efecto de preconditionamiento del miocardio a la isquemia (Landoni y cols., 2009). Este efecto puede tener implicaciones en nuestros resultados, reduciendo el efecto que el aturdimiento causado por los protocolos de isquemia-reperusión pudiera tener sobre el miocardio del animal. Sin embargo, la comparación de los resultados obtenidos en cada serie y entre las mismas sigue siendo válida ya que todos los animales recibieron el mismo protocolo anestésico.

Debido a que las respuestas fisiopatológicas a la isquemia pueden estar influenciadas por la presencia de agentes anestésicos (Manders y Vatner, 1976; Merin y cols., 1982) y el trauma quirúrgico agudo (Triana y cols., 1991), los modelos crónicos en animales conscientes son de primera elección para reproducir la isquemia miocárdica en humanos. Sin embargo son más costosos y la medición de la función miocárdica regional menos precisa que los estudios agudos (tórax abierto).

Otro aspecto importante es que los gases arteriales y el pH sanguíneo deben ser monitorizados estrechamente en los modelos experimentales agudos y corregidos mediante ajustes de la ventilación e infusión de bicarbonato sódico. Ambas medidas

estaban protocolizadas en nuestro trabajo. Por otro lado, la temperatura corporal es un determinante mayor de la función ventricular por lo que es obligatorio monitorizarla a lo largo de todo el experimento (Triana, 1991). En nuestras series no hallamos diferencias en la mediciones de temperatura rectal realizadas (datos no presentados).

1.3.- Justificación del protocolo experimental.

No solo en el síndrome coronario agudo la presencia de una taquiarritmia empeora el pronóstico (Crenshaw y cols., 1997; Sakata K y cols., 1997; Galcerá y cols., 1999; Rathore y cols., 2000; Al-Khatib y cols., 2001 y 2002). En el posoperatorio inmediato de una cirugía cardíaca que precise de circulación extracorpórea, la fibrilación auricular paroxística es un problema frecuente (25-50% de pacientes) con secuelas inmediatas como la inestabilidad hemodinámica y la insuficiencia cardíaca (Hogue y Hyder, 2000; Burke y Solomon, 2003). También se ha relacionado la taquicardia por fibrilación auricular con un peor pronóstico tras la revascularización coronaria percutánea (El-Omar y cols., 2003). Ambos tipos de revascularización tienen asociados periodos más o menos intensos de isquemia regional o global.

El resultado de una búsqueda bibliográfica exhaustiva nos ha demostrado que hay pocos trabajos que estudien la secuencia aturdimiento por isquemia-reperusión seguida de taquicardia y menos en modelos agudos. La mayoría de trabajos han estudiado simultáneamente los efectos de taquicardias sobre coronarias

estenosadas (isquemia por demanda). Tomoike y cols. (1978) estudiaron el efecto que ejercían frecuencias cardíacas crecientes sobre la función miocárdica regional bajo condiciones normales y bajo el efecto de estenosis coronarias que realizaron de forma simultánea con la taquicardia. Además, se trató de un modelo canino de tórax cerrado, con el animal consciente. Applegate y cols. (1990) compararon en perros la función ventricular izquierda durante una sobreestimulación auricular rápida en presencia de estenosis coronarias críticas. Todos los animales estaban anestesiados aunque algunos con tórax cerrado y otros abierto: al no encontrar diferencias en los valores medidos, los datos de ambos grupos se analizaron conjuntamente. Sinha y cols. (2006), también en un modelo canino, estudiaron el efecto de diferentes grados de isquemia de forma simultánea con sobreestimulación a 180 lpm desde dos lugares diferentes del ventrículo izquierdo.

Así mismo, son muchos los estudios que han utilizado modelos animales de taquimiocardiopatía por sobreestimulación crónica (Shinbane, 1997) pero son pocos los que se hayan centrado en el aturdimiento miocárdico tras una taquicardia de corta duración (taquimiocardiopatía aguda). Wang y cols. (2001), sobre miocardiocitos aislados de gato, estudiaron el efecto de una sobreestimulación rápida y breve sobre la función contráctil encontrando que existía una depresión de la misma por afectación de la proteinquinasa dependiente del calcio, lo cual podría ser una explicación a la disfunción contráctil que sigue a las taquiarritmias paroxísticas. Gare y cols. (2002) comprobaron en perros la hipótesis

de que las taquiarritmias ventriculares producen una disfunción ventricular mediada por la formación de especies reactivas del oxígeno. Nuestro grupo, primero en perros (Hernández y cols., 2008) y posteriormente en cerdos (Cosín-Aguilar y cols., 2009) ha estudiado el efecto sobre la función ventricular de la sobreestimulación aguda desde aurículas y ventrículos así como sobre la activación del sistema renina-angiotensina.

Por tanto, son necesarios más trabajos que analicen la fisiopatología de la depresión contráctil del miocardio que sigue a una taquicardia, siendo de interés especial realizar este estudio en un modelo animal donde el miocardio haya sufrido algún tipo de isquemia previa.

Nuestro modelo agudo de isquemia sobre un animal anestesiado y con el tórax abierto serviría para simular un escenario perquirúrgico como el de pacientes sometidos a cirugía cardiaca que puedan sufrir alguna taquiarritmia en el posoperatorio inmediato como por ejemplo una fibrilación auricular paroxística. Y, como demostraron Applegate y cols. (1990), se pueden extrapolar los resultados al animal anestesiado pero con el tórax cerrado por lo que también puede ser útil para estudiar los efectos de frecuencias ventriculares elevadas por encima de umbrales fisiológicos en el miocardio sometido a diferentes tipos de isquemia (p. ej. el escenario de un síndrome coronario agudo con oclusión transitoria (repetida o no) de una coronaria y seguida de una taquiarritmia). Además, podría ser útil como modelo para estudiar la fisiopatología de la insuficiencia cardiaca aguda.

1.4.- Elección de la zona isquémica y de la zona control.

La coronaria descendente anterior (CDA) ha sido la más utilizada para producir isquemia miocárdica regional ya que permite el muestreo selectivo de la vena coronaria regional para estudios metabólicos (Suzuki y cols., 2011). No obstante, la oclusión de la arteria circunfleja también ha sido usada ampliamente (Théroux y cols., 1977; Buda y cols., 1990; Shen y cols., 1999). Además, es bien conocido que en el hombre y en el cerdo la oclusión proximal de la CDA produce una afectación de la función ventricular global mayor que la oclusión de la arteria circunfleja, lo cual se atribuye a la mayor área de miocardio en riesgo. Por otro lado, Hoit y Lew (1988), demostraron que para una misma superficie isquémica, el incremento compensador en la función en las zonas no isquémicas era mayor si la isquemia se hacía en territorio de la CCx que si se hacía sobre la CDA. Con ello se ilustra que no sólo el tamaño de la zona isquémica, si no también su localización en el ventrículo izquierdo, determinan las consecuencias funcionales globales de la isquemia. Debido a esto y a que el abordaje quirúrgico de la CDA en el cerdo es más fácil que el de la CCx, hemos elegido la CDA para realizar las diferentes isquemias de nuestro protocolo experimental. En cuanto al segmento de la arteria sometido a oclusión, la incidencia de fibrilación ventricular aumenta cuanto más proximal se realice la oclusión llegando hasta el 45% de los animales a los 20 minutos de oclusión completa (Hill y Gettes, 1980). Nuestro grupo tiene la experiencia de que realizando el pinzamiento en el segmento medio, tras el nacimiento de la primera diagonal, en vez de en el

segmento proximal de la descendente anterior, la incidencia de fibrilación ventricular se reduce drásticamente (Pomar y cols., 1995). Así, en nuestro trabajo hemos realizado la oclusión de la descendente anterior en su segmento medio, siendo la incidencia de la arritmia nula durante la isquemia; sin embargo, hubo que excluir dos cerdos por fibrilación ventricular durante la sobreestimulación.

1.5.- Elección de la zona de implante del electrodo de sobreestimulación.

Experimentos de nuestro laboratorio, realizados en perros anestesiados, nos mostraron la afectación de la contractilidad segmentaria por la estimulación eléctrica del corazón por frecuencias altas pero de duración corta. Se comprobó que la sobrestimulación desde la aurícula en periodos de 10, 20 y 40 minutos con frecuencias en el límite de la conducción aurículo-ventricular no afectaban negativamente a la función miocárdica. En contraste, la estimulación ventricular a menor frecuencia producía afectación de la fracción de acortamiento de las distintas zonas miocárdicas monitorizadas. La afectación de la función ventricular perduraba un periodo corto de tiempo tras el cese de la estimulación (Hernández y cols., 2008).

En otros modelos en animales de experimentación con estimulación eléctrica más duradera se ha podido comprobar que la afectación de la función miocárdica sólo se producía si los ventrículos incrementaban su frecuencia, independientemente de la frecuencia auricular (Schoonderwoerd y cols., 2004).

Además, el lugar de la estimulación en el ventrículo es importante. Sinha y cols. (2006) encontraron diferencias significativas en la fracción de acortamiento regional dependiendo de si la estimulación ventricular se realizara en la región laterobasal o apicoseptal del ventrículo izquierdo, con una menor afectación de la contractilidad en la primera. Estos hallazgos concuerdan con otros estudios sobre los efectos de diferentes lugares de estimulación sobre la secuencia de contracción de la banda helicoidal del miocardio ventricular (Tomioka, 2006). Por este motivo, hemos elegido como lugar de estimulación en el ventrículo izquierdo una zona del epicardio del ventrículo izquierdo equidistante a las zonas donde se va a realizar la medición de la contractilidad regional (zona laterobasal (dependiente de la CCx) y zona apicomedia (dependiente de la CDA)). Este lugar es similar al utilizado en otros modelos de taquimiocardiopatía experimental (Cesseli y cols., 2001; Gare y cols., 2002; Hernández y cols., 2008; Cosín-Aguilar y cols., 2009).

1.6.- Función contráctil regional. Sonomicrometría.

En este estudio se ha utilizado la sonomicrometría debido a la amplia experiencia que nuestro grupo tiene con la misma (Rivera y cols, 1989a; Pallarés, 1996; Morillas, 2001). Los electrodos se implantaron en el subendocardio pues estudios previos demostraron que esta ubicación es más estable que la epicárdica (Rivera, 1989).

Sin embargo, esta técnica no está exenta de limitaciones. El daño miocárdico que se produce durante el implante de los

microcristales es una de ellas, aunque se ha comprobado que no excede 1mm la zona de implante y consiste en daño celular focal y hemorragia intersticial (Théroux y cols., 1974). Otra limitación es la variabilidad en la posición de los cristales a lo largo del experimento, lo cual podría producir errores significativos en las medidas efectuadas. Sin embargo, la estabilidad de las medidas observadas en la zona control a lo largo de toda la experimentación, y la posterior comprobación visual de la posición de los cristales al finalizar el experimento, tanto en la zona control como en la zona sometida a isquemia, minimiza esta posibilidad si el implante se realiza correctamente (Hattori y cols., 1982; Rivera, 1989).

Otra potencial fuente de error en el análisis de la longitud y contractilidad de un segmento miocárdico sería la influencia que las variaciones del tamaño del corazón durante el experimento pudieran tener sobre estos parámetros. En experimentos realizados en perros se ha descrito que el volumen del corazón varía dependiendo del estado fisiológico del animal, particularmente en experimentos a tórax abierto, en que una disminución significativa del volumen ventricular puede afectar a las mediciones de la contractilidad (Rankin y cols., 1976). Para minimizar este problema, hemos mantenido durante los experimentos una presión venosa central estable, con infusión, en caso necesario, de dextrano de peso molecular medio, con la finalidad de paliar las variaciones del volumen cardíaco.

Otro punto a tener en cuenta es la diferente disposición de las fibras en el corazón, según se encuentren en la capa epicárdica o

endocárdica, variando además según la zona estudiada (Streeter y cols., 1969; Hattori y cols., 1982). Esto conduce a diferencias en la fracción de acortamiento de las fibras miocárdicas dependiendo del estrato y de la zona que consideremos (Rivera y cols., 1989a). En general, en condiciones de perfusión normal, el subendocardio muestra una mayor motilidad que los estratos epicárdicos y la fracción de acortamiento es mayor cuando la medida se hace siguiendo el eje largo del corazón. En condiciones de isquemia transitoria, las fibras que tienen un recorrido paralelo al eje longitudinal del corazón se afectan más que las que siguen paralelas al eje circunferencial, y el estrato subendocárdico puede afectarse más que el subepicárdico (Rivera y cols., 1989b). Sin embargo, cuando se producen isquemias severas transmurales, las alteraciones son sincrónicas en todos los estratos. En función de ello y con la finalidad de poder valorar zonas más sensibles a la isquemia, hemos realizado el implante en capas subendocárdicas, situando los electrodos siguiendo el eje largo del corazón. Además, al realizarse una oclusión completa de la CDA, se minimizaba las diferencias en la afectación contráctil entre estratos miocárdicos. Se consideraba que los cristales estaban colocados adecuadamente uno opuesto al otro visualmente y cuando se conseguía la mayor amplitud de registro entre sístole y diástole. En todos los experimentos se ha seguido el mismo protocolo de implante con el objetivo de poder comparar entre series.

1.7.- Ocluser coronario.

Históricamente han sido diversos los ocluseros coronarios utilizados en experimentación animal. Tennant y Wiggers (1935) utilizaron una pinza (*clamp*) vascular, Debley (1971) ocluseros hidráulicos, Gallagher y cols. (1982) un clamp de tornillo. Otros han utilizado ocluseros neumáticos (Fujita y cols., 1988) o sistemas mecánicos de lazo (Cosín y cols., 1990). Con todos ellos se han descrito reducciones del flujo coronario distal al punto de oclusión una vez cesa ésta. Se ha propuesto como mecanismo el vasoespasmo (Uchida y cols., 1975; Cabadés y cols., 1985) y la trombosis y microembolizaciones de agregados de plaquetas (Folts, 1991). En este trabajo hemos utilizado un *clamp* vascular y no hemos observado disminución del flujo coronario una vez retirada la oclusión a pesar de utilizar un protocolo en que las oclusiones son repetitivas. Por tanto, la posibilidad de espasmo o embolización significativa durante la reperfusión, es poco probable en nuestro estudio, salvo en la serie con isquemias breves y repetidas en la que, aunque el flujo en la fase de reperfusión no se redujo, tampoco se observó el incremento del flujo por la CDA que sí se objetivó en las otras dos series con isquemia.

En este trabajo, el flujo coronario se ha medido mediante una sonda de ultrasonidos, implantada alrededor de la arteria descendente anterior, capaz de detectar el flujo instantáneo. Este tipo de sondas ha sido utilizada ampliamente y validada en diferentes estudios (Bednarik y May, 1995; St Louis y cols., 2000; Molloy y cols., 2004).

1.8.- Protocolo de isquemias.

En 1975 Heyndrickx y cols. describieron que la recuperación de la función contráctil tras 10 minutos de una oclusión coronaria en perros conscientes no era inmediata, si no que podía alargarse hasta horas incluso días. A este retraso en la recuperación de la función, tras una isquemia más o menos breve, más tarde se le denominó aturdimiento (Braunwald y Kloner, 1982). Aunque la mayoría de investigadores han utilizado una oclusión única y completa de una arteria coronaria para producir aturdimiento, (Verdouw, 1998), también se ha demostrado aturdimiento utilizando múltiples oclusiones cortas y repetidas (Pomar y cols., 1995; Pallarés y cols., 1997). Tampoco es necesario que la oclusión sea completa para causar aturdimiento. Así, oclusiones coronarias parciales, siempre que sean lo suficientemente prolongadas, (Matsuzaki y cols., 1983), o se realicen en presencia de ejercicio (Homans y cols., 1991), son capaces de inducir disfunción contráctil transitoria del miocardio.

Aunque el concepto de miocardio aturdido, como ya se ha explicado, ha sido ampliamente contrastado en experimentación animal, sobre todo en su modelo clásico de isquemia única, en clínica, la mayoría de los pacientes con síndrome coronario agudo experimentan episodios de isquemia múltiples y recurrentes, ya sea por trombosis, por espasmo o ambos (Fuster y cols., 1992).

Clásicamente, los modelos experimentales de isquemias breves y repetidas, previas a una isquemia más intensa y prolongada capaz de causar necrosis, se han utilizado para describir y estudiar el fenómeno del preconditionamiento miocárdico (Murry y cols.,

1986; Jennings y cols., 2001). Se ha descrito que el mismo procedimiento de preconditionamiento (isquemias breves intercaladas por episodios de reperfusión) pudiese constituir un fenómeno beneficioso para el miocardio si fuese seguido de una isquemia prolongada capaz de ocasionar necrosis (reduciendo el tamaño de la misma) (Kloner y Jennings, 2001b), o bien un fenómeno perjudicial si una isquemia menos intensa incidiese en el momento de máximo aturdimiento provocado, incrementándose la disfunción contráctil (Martí y cols., 1999). Además, puede aparecer aturdimiento en vez de preconditionamiento si el número de isquemias breves y repetidas es elevado (Cohen y cols., 1994; Pomar y cols., 1995; Pallarés y cols., 1997).

En nuestro modelo hemos elegido tres tipos de isquemia completa, de las cuales dos han sido isquemias continuas de 10 minutos y 20 minutos de duración y la tercera una serie de 20 isquemias breves y repetidas. El objetivo ha sido intentar reproducir el escenario clínico del síndrome coronario agudo. Los tres tipos de isquemia utilizados en el presente trabajo son capaces de inducir aturdimiento.

1.9.- La sobreestimulación a frecuencias suprafisiológicas como modelo de aturdimiento miocárdico.

Una taquicardia mantenida de forma crónica produce una depresión de la función contráctil del miocardio tanto clínica (Shachnow y cols., 1954; Packer y cols., 1986) como experimental (Coleman y cols., 1971; Armstrong y cols., 1986). Incluso periodos

más cortos (24 horas) de sobreestimulación rápida pueden deprimir la función contráctil sin signos clínicos de fallo cardíaco (Vartner y cols., 1994). Cambios precoces en el acoplamiento excitación-contracción pueden ser importantes en el desarrollo de aturdimiento miocárdico. Diversos autores han considerado que la depresión reversible de la contractilidad que sigue a la finalización de las taquiarritmias auriculares (Jordaens y cols., 1993; Khan, 2003) o ventriculares (Packer y cols., 1986; Koretsune and Marban, 1989) puede considerarse una forma de aturdimiento miocárdico. Los mecanismos por los que periodos cortos de taquiarritmia inducen aturdimiento miocárdico son menos conocidos que los mecanismos que producen taquimiocardiopatía crónica o aturdimiento de origen isquémico. Hasta la fecha, los estudios experimentales de inducción de disfunción contráctil por sobreestimulación rápida se han centrado en modelos crónicos como modelos *in vivo* de insuficiencia cardíaca congestiva (Armstrong y cols., 1986; Chow y cols., 1990; Hendrick y cols., 1990) y muy pocos estudios se han centrado en modelos agudos de taquimiocardiopatía (Wang y cols., 2001; Hernández y cols., 2008; Cosín-Aguilar y cols., 2009).

Sin embargo, la posibilidad de desarrollar algún grado de aturdimiento miocárdico exclusivamente con sobreestimulación a frecuencias altas es controvertida. Estudios, en modelos animales no encuentran alteraciones en la contractilidad regional tras sobreestimulación auricular a frecuencias altas, aunque la duración de la taquicardia fue tan breve como 3 minutos (Applegate y cols., 1990). Oldroyd y cols. (1990), en un estudio realizado en pacientes

con y sin enfermedad coronaria, encontraron que, tras estimulación auricular rápida y breve (no más de 20 minutos) de hasta 180 latidos por minuto, los pacientes sin enfermedad coronaria no elevaban la concentración de malonilaldehído, un marcador de estrés oxidativo, en el seno coronario. Sin embargo, sí se detectaba una elevación significativa si tenían enfermedad coronaria. Posteriormente, Buffon y cols. (2000) publicaron hallazgos parecidos en pacientes con síndrome X (duración de la sobreestimulación < de 5 minutos). Es posible que la duración y la frecuencia ventricular de la taquicardia sea una variable importante para poder desarrollar aturdimiento miocárdico. En la experiencia de nuestro grupo, solo la estimulación ventricular durante al menos 40 minutos, a una frecuencia de estimulación como mínimo un 40% superior a la frecuencia cardiaca inicial, indujo un aturdimiento significativo que perduró 20 minutos tras el cese de la taquicardia (Hernández y cols., 2008). Pruebas preliminares de puesta a punto del protocolo experimental descrito en este estudio pusieron de manifiesto que, en cerdos, era necesario una sobreestimulación a más frecuencia y de más duración para encontrar alteraciones de la contractilidad segmentaria que duraran al menos 5 minutos tras el cese de la taquicardia. Se comprobó que con frecuencias superiores al 60% de la inicial durante dos horas se detectaban alteraciones de la contractilidad tanto en la zona apicoseptal como en la basolateral.

Por ello, consideramos que nuestro modelo de aturdimiento miocárdico por isquemia seguida de sobreestimulación ventricular durante 2 horas, a una frecuencia un 60% superior a la frecuencia

cardiaca inicial, puede ser adecuado y aportar datos interesantes al conocimiento de la fisiopatología de la disfunción cardiaca en dos escenarios: en el síndrome coronario agudo complicado con frecuencias cardíacas suprafisiológicas y el posoperatorio inmediato de cirugía de revascularización coronaria, en el que a menudo acontecen taquiarritmias. Ambos escenarios son capaces de desencadenar insuficiencia cardiaca aguda.

1.10.- Peroxidación lipídica y glutatión como marcadores de estrés oxidativo y de defensa antioxidante.

El estrés oxidativo ha sido involucrado en la patogenia del aturdimiento miocárdico en numerosas publicaciones científicas. La mayoría de estos estudios se han centrado en el papel de las especies reactivas del oxígeno (EROs) en el aturdimiento por isquemia-reperusión (Bolli y cols., 1989). Pero también se han publicado trabajos que relacionan el estrés oxidativo con el aturdimiento posttaquicardia. Así, en modelos animales, la estimulación ventricular rápida y mantenida produce un incremento de las demandas metabólicas, una reducción del flujo sanguíneo y estrés oxidativo (Cardinal y cols., 2004). De la misma forma, frecuencias ventriculares elevadas, como en el caso de la fibrilación auricular paroxística, estimulan los mecanismos de estrés oxidativo (Goette y cols., 2009).

El estrés oxidativo, que ocurre en las células debido a un desequilibrio entre los sistemas oxidantes y antioxidantes, altera las principales macromoléculas biológicas como los ácidos nucleicos,

proteínas y lípidos. Los lípidos de membrana, principalmente los fosfolípidos, contienen ácidos grasos poliinsaturados (AGPs) que son particularmente susceptibles a la oxidación. Cuando el miocardio se torna isquémico y se acumulan EROs, se inicia un proceso de oxidación de los lípidos de las membranas celulares denominado peroxidación (Wagner y cols., 1994). Un primer efecto de la peroxidación lipídica es que se producen cambios en la permeabilidad de la membrana celular, incluso de la mitocondrial. Esta alteración de las propiedades de las membranas biológicas actúa como amplificador, formándose más radicales libres, degradándose los AGPs en una variedad de subproductos. Algunos de ellos, como los aldehídos, son muy reactivos y de vida media más larga pudiendo difundir desde su lugar de producción a lugares a distancia donde causar daño, actuando como segundos mensajeros tóxicos (Cabisco y cols., 2000). Entre los diferentes aldehídos que se pueden formar durante la peroxidación lipídica el más estudiado ha sido el malondialdehído (MDA). Sin embargo, los ensayos desarrollados para su cuantificación son poco específicos y suelen sobreestimarla (Janero, 1990). Se ha propuesto la medición directa de lipoperóxidos como un método más específico (Yamamoto y cols., 1987; Nourooz-Zadeh y cols., 1994). El método utilizado en este estudio (*Cayman lipid hydroperoxide assay kit*) mide el cambio en la absorbancia utilizando reacciones redox entre lipoperóxidos e iones ferrosos. Esta reacción produce iones férricos los cuales son detectados utilizando el ión tiocianato como cromógeno (Mihaljevic y cols., 1996). Este método se ha utilizado ampliamente en estudios

de medición de lipoperoxidación, es simple y funciona bien en estudios *in vitro* en plasma sanguíneo (Tong y cols., 2005; Cui y cols., 2010; Jezek y cols., 2010).

En biología se ha definido a una sustancia como antioxidante a aquella que, cuando está presente a concentraciones pequeñas en comparación con el sustrato oxidable, es capaz de retrasar significativamente o prevenir la oxidación de dicho sustrato (Halliwell y Gutteridge, 1999). Entre las defensas antioxidantes, están componentes no enzimáticos como el glutatión (en su forma reducida o GSH), tioredoxina y glutaredoxina, y mecanismos enzimáticos como la superóxido dismutasa, catalasa y la glutatión peroxidasa (Nigam and Schewe, 2000; Robertson y cols., 2001).

El tripéptido GSH (γ -glu-cys-gly) es el arma más rápida y abundante contra la acumulación de EROs. El glutatión actúa como cofactor del enzima glutatión-peroxidasa. Existe GSH intra y extra celular. Se ha descrito que la disminución de GSH intracelular no se debe únicamente a la inhibición de su síntesis, oxidación de GSH a glutatión disulfido (GSSG) o a un déficit en la vía de rescate de GSH, si no también a un incremento de la tasa de salida de GSH de la célula (Oda y cols., 1999). Por lo tanto, las fluctuaciones de GSH en plasma pueden deberse a ambos mecanismos. El método utilizado en este trabajo para cuantificar el GSH y GSSG se basa en la glutatión reductasa para la cuantificación de GSH (Griffith, 1980) y ha sido utilizado en numerosos estudios (Yamamoto y cols., 2009; Bulku y cols., 2010).

2.- ANÁLISIS DE LOS PARÁMETROS HEMODINÁMICOS Y DE FUNCIÓN VENTRICULAR GLOBAL Y REGIONAL.

2.1.- Efectos de la apertura del tórax y exposición del corazón al aire ambiente. Serie *sham*.

La apertura del tórax y la exposición del corazón al ambiente puede influir negativamente sobre la función y metabolismo del miocardio durante el periodo de observación de cada serie. Por ello hemos incluido en nuestro trabajo una serie *sham*. Estos efectos deletéreos se explican, entre otros, por el trauma quirúrgico y la manipulación en el implante de los dispositivos de medida. Una toracotomía realizada bajo anestesia general se asocia a una descarga simpática y a la activación de citocinas inflamatorias lo que induce un incremento de los determinantes de demanda miocárdica de oxígeno (inotropismo, frecuencia cardíaca y tensión de pared) y a un incremento del estrés oxidativo (Näslund y cols., 1992; Moon y cols., 1999; Ramos y Guisasola, 2010).

Además, la pérdida de calor por la exposición del tórax es otro factor a tener en cuenta ya que el miocardio aturdido es muy sensible a las variaciones de la temperatura (Triana y cols., 1991). En nuestras series, se utilizó una lámpara calorífica sobre el campo operatorio y una manta eléctrica para minimizar la pérdida de calor. Se controló la temperatura ambiente, y la temperatura rectal del animal, no hallándose diferencias significativas, ni intra ni entre series, durante el protocolo experimental.

A pesar de estas consideraciones, en la serie *sham* no hallamos diferencias en la frecuencia cardíaca ni antes ni después de abrir el tórax ni a lo largo de la exposición (4 horas). La explicación la podemos encontrar en que los animales no solo fueron sometidos a una anestesia profunda si no también a analgesia con opiáceos lo que minimizaría la descarga adrenérgica. En este sentido, es conocido que el bloqueo adecuado con opiáceos sistémicos de las señales aferentes originadas por el dolor en pacientes sometidos a toracotomía electiva reduce significativamente los niveles de catecolaminas circulantes (Bachmann-Mennenga y cols., 1993).

Tampoco encontramos diferencias en el gasto cardíaco, en el volumen latido, en la presión sistólica del ventrículo izquierdo o en la dP/dt positiva durante las cuatro horas de exposición. Sin embargo, detectamos un incremento lento, pero constante, del pico de la dP/dt negativa que llega a ser significativo al final de la observación. La dP/dt negativa pico se reduce cuando la relajación ventricular se altera, por ejemplo en la isquemia. Un progresivo aumento de la misma ocurre cuando mejora la relajación ventricular, aumenta la presión aórtica o ambas (Grossman, 1996). Si la dP/dt negativa aumenta y la poscarga no se altera o se reduce, significa una mejoría intrínseca de la relajación ventricular (Fifer y Grossman, 1996). Aunque la desaparición del efecto de contención del llenado ventricular tras la pericardiotomía podría explicar el comportamiento de la dP/dt negativa en la serie *sham*, estudios realizados en perros han demostrado que el hecho de abrir el pericardio no influye en dicho valores (Shirato y cols., 1991).

En cuanto a los parámetros de función regional, no encontramos cambios estadísticamente significativos durante las cuatro horas de observación de esta serie, aunque en la zona control (dependiente de la arteria circunfleja) la fracción de acortamiento se redujo un 30% respecto al inicial ($p > 0,05$). Esta reducción se produjo a expensas de que las fibras musculares de esta región alcanzaron una menor longitud telediastólica conforme avanzó la observación. Es poco probable que esto se hubiera debido a una reducción de la precarga ya que la PTDVI se mantuvo constante, e incluso se incrementó, al igual que la dP/dt -, a lo largo del experimento en esta serie. Además, el protocolo del modelo incluía una repleción continua de volumen para compensar las pérdidas por sangrado y por evaporación. En cualquier caso, esta reducción no fue estadísticamente significativa. También se mantuvo en límites normales la saturación de oxígeno arterial y el pH. Tampoco la comparación del porcentaje de cambio de los parámetros de contractilidad regional entre las regiones latero-basal y medio-apical en la serie *sham* mostró diferencias significativas.

Por tanto, la exposición y manipulación del corazón de la preparación experimental propuesta en este estudio, no causó modificaciones significativas en los parámetros hemodinámicos y funcionales durante el protocolo experimental.

2.2.- Efectos de la isquemia y la reperfusión sobre los parámetros de función miocárdica global y regional.

2.2.1.- Efectos de una isquemia única.

2.2.1.1.- Efectos sobre los parámetros hemodinámicos y de función global.

Los efectos de una oclusión coronaria sobre los parámetros de función sistólica y diastólica han sido ampliamente estudiados en el pasado. La oclusión de un segmento coronario conduce a una reducción de la contractilidad regional en pocos latidos que puede llegar a ser disquinética en 1 minuto. Conforme la contractilidad regional decrece se produce también una reducción de la $dP/dt +$ y un aumento progresivo de la PTDVI y puede disminuir el gasto cardiaco. Ahora bien, la magnitud de estos cambios hemodinámicos varía con la severidad de la isquemia así como con la cantidad de miocardio afectado (Canty, 2008).

En nuestro estudio, la realización de una isquemia por oclusión completa del segmento medio de la arteria descendente anterior causó una reducción significativa de entre el 10 y 20 % del volumen latido y del gasto cardiaco respecto a sus valores iniciales en ambas series con isquemia de 10 y 20 minutos. La $dP/dt +$ se redujo respecto al valor inicial en la serie con isquemia de 20 minutos, pero no en la serie con isquemia más corta (10 minutos). Sharma y cols. (1982) describen en perros cambios en la $dP/dt +$ solo cuando la isquemia era de al menos 60 minutos. El hecho de

que el cerdo posea escasa circulación colateral, puede explicar que en nuestro modelo encontremos alteraciones de la $dP/dt +$ solo con 20 minutos de oclusión completa.

La PTDVI se incrementó ligeramente en ambas series pero sin significación estadística. La dP/dt negativa pico, parámetro de función diastólica que refleja el estado de la relajación ventricular en la fase isovolumétrica, no se alteró durante la isquemia de 10 minutos pero sí durante la isquemia de 20 minutos, en que se redujo significativamente. Ésto ya fue descrito en otros trabajos (Fifer y Grossman, 1996; Solomon y Glantz; 1999).

En la reperfusión, el volumen latido, el gasto y la $dP/dt +$ se recuperaron de forma casi inmediata en ambas series. La dP/dt negativa también se normalizó inmediatamente tras la reperfusión en estas dos series. Estos hallazgos reflejan que, en caso de que hubiera habido aturdimiento postisquémico, o bien no afectó a los parámetros de función global o bien la aparición de un efecto negativo no es inmediato tras el cese de la oclusión si no que se retrasa unos minutos (Morillas, 2001). El inicio precoz de la sobreestimulación, en los primeros cinco minutos de reperfusión, podría haber impedido la detección de aturdimiento.

2.2.1.2.- Efectos sobre los parámetros de función regional.

Se ha comentado que la oclusión de una arteria coronaria va seguida de una secuencia de cambios en la contractilidad miocárdica. Tennant y Wiggers (1935) demostraron que, a los 60 segundos de oclusión coronaria, la zona isquémica cambia desde un

estado de acortamiento sistólico activo a uno de alargamiento sistólico pasivo o expansión sistólica paradójica, debido a la incapacidad de la zona isquémica para soportar la presión intraventricular generada por el miocardio normalmente perfundido. La aparición de este abombamiento sistólico o *bulging* sirve pues de parámetro visual para confirmar la intensidad de la isquemia, ya que no se detecta cuando las oclusiones coronarias son parciales (Hess y cols., 1983; Martí y cols., 1999). En las tres series con isquemia de nuestro trabajo hemos observado este fenómeno, acompañado del cambio de coloración a violáceo de la zona isquémica, con recuperación rápida en la reperfusión.

Además, la duración de la isquemia es una variable importante en el tiempo de recuperación de la contractilidad como demostraron Heyndrickx y cols. (1975 y 1978). Con una oclusión coronaria de 5 minutos, la función regional se mantuvo deprimida a las dos horas de la reperfusión pero se había recuperado a las 6 horas. Cuando la duración de la isquemia fue de 15 minutos, la función contráctil permaneció reducida más de 6 horas tras la restauración del flujo coronario.

Durante la isquemia, en nuestro modelo y en las dos series con isquemia única de 10 y 20 minutos, hemos detectado una afectación importante de la función regional en la zona dependiente de la arteria descendente anterior. El grado de afectación fue similar con 10 y con 20 minutos de isquemia.

Durante la reperfusión, la medición de la contractilidad se realizó en el primer minuto tras el despinzamiento de la coronaria,

observándose una recuperación significativa de la fracción de acortamiento. Esta aparente contradicción del concepto de aturdimiento, tras isquemia reversible, no lo es tanto cuando se observa que en otros estudios el deterioro de la función contráctil tras la isquemia no es inmediato si no que se retrasa unos minutos (Kloner y cols., 1998). Esto concuerda con el concepto de lesión por reperfusión, probablemente relacionado con el incremento de calcio citosólico y el pico de producción de radicales libres que se produce entre los 2-4 minutos de iniciada la fase de reperfusión (Buffon y cols., 2000). En este sentido, en el trabajo de Morillas (2001), una isquemia única y completa de 15 minutos de duración no resultó en alteraciones de la fracción de acortamiento regional en la medición realizada en el primer minuto de reperfusión pero sí al minuto 10.

Cuando observamos los resultados de contractilidad en la zona control durante la isquemia, existe un incremento (aunque no significativo) en la fracción de acortamiento, con recuperación de los valores iniciales en la reperfusión en ambas series con isquemias de 10 y 20 minutos. Este incremento “compensador” de la contractilidad en zonas alejadas de la isquémica es un fenómeno cuyo mecanismo es controvertido, si bien la mayoría de investigadores lo atribuyen al mecanismo de Frank-Starling (Braasch y cols., 1968; Matre y cols., 1987): la disminución del acortamiento y la expansión sistólica de la zona isquémica reducirían la poscarga de las regiones no isquémicas, favoreciendo el incremento del acortamiento en dichas zonas. Algunos investigadores atribuyen esta hipercinesia a una interacción

mecánica entre la región isquémica y no isquémica (Goto y cols., 1988) y otros a la influencia de ambos mecanismos (Noma y cols., 1988).

2.2.2.- Efectos de isquemias breves y repetidas.

2.2.2.1.- Efectos sobre los parámetros hemodinámicos y de función global.

En nuestro protocolo, la medición de los parámetros hemodinámicos y de función global se realizó durante y tras la última isquemia, que fue de igual duración (2 minutos) e intensidad (oclusión completa) que las 19 anteriores.

Durante la isquemia número 20, observamos que el efecto sobre estas variables no difiere del producido por las isquemias únicas y más prolongadas de las otras dos series, con una reducción significativa del volumen latido, del gasto cardíaco, de la dP/dt positiva y negativa. Además, la PSVI se redujo de forma cercana a la significación.

Durante la reperfusión, los valores de vol. lat., G. C. y PSVI se mantuvieron reducidas respecto al valor inicial, lo cual no se observó en las series con isquemia única, indicando este hecho la presencia de aturdimiento más precoz o intenso en esta serie, lo cual no sorprende, dados los 19 episodios previos de isquemia. La PTDVI también tendió a estar más elevada en esta serie durante la reperfusión.

Estos hallazgos sugieren que el aturdimiento producido por isquemias breves y repetidas puede ser de mayor intensidad que el causado por una isquemia única aunque más prolongada. En este sentido, es conocido que el deterioro de la función sistólica que persiste a pesar de la restauración del flujo coronario tras un episodio isquémico se relaciona con la duración de la isquemia (Heyndrickx y cols., 1975; Braunwald y Kloner, 1982; Bolli y cols., 1988a). Nicklas y cols. (1985) y Zhao y cols. (1987) demostraron que isquemias breves y repetidas eran capaces de producir un efecto similar al causado por una única isquemia más prolongada. Sin embargo, patrones diferentes de isquemias repetidas producían efectos diferentes: Lange y cols. (1984), utilizando episodios de isquemia más prolongados encontraron que tres episodios de isquemia de 15 minutos de duración cada uno separados por intervalos de 30 minutos causaban aturdimiento en la reperfusión pero no hallaron un efecto acumulativo. Los mismos hallazgos obtuvieron Weiner y cols. (1976) tras tres episodios de isquemia de 20 minutos separados por intervalos de 45 minutos de reperfusión.

Otra consideración es que, la realización de 20 isquemias de 2 minutos separadas cada una por 3 minutos de reperfusión, suponen en total 100 minutos de protocolo de isquemia-reperfusión frente a los 10 y 20 minutos de las series con isquemia continua. Sin embargo, en un estudio anterior de nuestro grupo que utilizó el mismo protocolo de 20 isquemias breves y reperfusión, no se encontraron diferencias significativas en la PSVI, en la $dp/dt + o$ en la PTDVI durante la isquemia número 20, respecto al valor inicial

(Pomar y cols., 1995). Esta diferencia respecto a nuestros hallazgos se puede explicar porque el cerdo (utilizado en nuestro estudio) a diferencia del perro (utilizado en el estudio de Pomar) carece de circulación colateral y por lo tanto sería más sensible a episodios de isquemia.

2.2.2.2.- Efectos sobre los parámetros de función regional.

Los efectos que 20 isquemias breves seguidas de periodos de reperfusión muy cortos tuvieron sobre la función regional de la zona dependiente de la CDA fueron similares, en términos estadísticos, a los observados en las series con isquemia única de 10 y 20 minutos, tanto durante la isquemia como durante la reperfusión. Esto es concordante con estudios previos como los de Fujita y cols. (1988) y sobre todo de Wynsen y cols. (1991), que demostraron que la duración de los periodos de reperfusión tras cada isquemia breve influía en el grado de aturdimiento posterior de tal modo que cuando los periodos de reperfusión eran cortos, el deterioro de la fracción de acortamiento era mayor y equiparable a periodos de isquemia más prolongados.

Sin embargo, y de forma llamativa, el comportamiento de la zona control fue diferente en nuestra serie con isquemias breves respecto a las dos series con isquemia única. Durante la isquemia, aunque no observamos diferencias significativas en los cambios en las longitudes telediastólicas y telesistólicas entre las tres series, la fracción de acortamiento en la zona testigo se comportó de forma diferente. En las series con isquemia de 10 y 20 minutos se observó

un incremento de la fracción de acortamiento de la zona control (“efecto compensador”) que contrastó con la reducción que sufrió la fracción de acortamiento en la serie con isquemias breves durante la isquemia número 20. Esta reducción de la fracción de acortamiento de la zona control de la serie con isquemias breves y repetidas fue estadísticamente significativa no solo respecto a sus valores iniciales, sino también respecto a las otras dos series con isquemia única. Este comportamiento negativo de la fracción de acortamiento en una zona a distancia de la sometida a isquemias breves y repetidas no se observó en el estudio realizado en perros por Pomar y cols. (1995) y que utilizó un protocolo de isquemia-reperfusión similar al nuestro. Lo habitual es que se produzca un aumento de la contractilidad en territorios a distancia de la zona isquémica, habiéndose involucrado diferentes mecanismos como los comentados en el apartado anterior. Sin embargo, Przyklenk y cols. (1993) en un modelo canino, sugieren que oclusiones breves y repetidas podrían precondicionar no solo a los miocitos del territorio sometido a isquemia si no incluso a aquellos pertenecientes a otros territorios vasculares, y estar mediatizado este fenómeno por algún factor o factores activados, producidos o transportados a través del corazón durante los episodios de isquemia-reperfusión. A este efecto se le ha denominado precondicionamiento remoto. Moon y cols. (1998) encontraron que, tras una isquemia que causa aturdimiento miocárdico en el territorio de la arteria circunfleja, disminuía la reserva de flujo coronario en el territorio de la arteria descendente anterior, sugiriendo una disfunción endotelial a distancia del

miocardio aturdido. Desde entonces, diversos trabajos han estudiado el efecto a distancia de una isquemia en diferentes órganos como el corazón, riñón, cerebro incluso intestino, centrándose en el posible efecto cardioprotector (precondicionamiento remoto). En este sentido, isquemias intermitentes en otros territorios vasculares (por ejemplo la arteria humeral) podrían tener un efecto protector sobre el miocardio durante un infarto con elevación del ST (Bøtker y cols., 2010) o durante CABG (Hausenloy y cols., 2007).

Si la reducción de la fracción de acortamiento en esta serie es reflejo del efecto de sustancias circulantes, liberadas desde la zona sometida a isquemia, que conducirían a una reducción del metabolismo y la función de miocardio sano preparándose de esa forma ante una posible noxa isquémica, es una hipótesis que todavía no ha sido demostrada. Lo que sí se ha objetivado, es que el preconditionamiento isquémico a distancia muestra una importante variabilidad entre especies, lo que podría explicar la diferente respuesta obtenida con el mismo protocolo de isquemias-reperfusión por Pomar en perros y por nuestro estudio en cerdos (Yellon y Downey, 2003).

2.3.- Efecto de la frecuencia ventricular suprafisiológica sobre la función global y regional.

2.3.1.- Serie con sobreestimulación y sin isquemia.

Durante la realización de una sobreestimulación ventricular a una frecuencia superior, en un 60%, a la inicial, observamos una

reducción de todos los parámetros de función sistólica y diastólica analizados, conservándose el gasto cardiaco por el efecto de la frecuencia cardiaca elevada. La reducción de los parámetros de función sistólica son explicables por la desincronización de la contracción ventricular que produce la sobreestimulación desde el ventrículo izquierdo, como es el caso de nuestro modelo (Hernández y cols., 2008). El acortamiento de la diástole causado por la taquicardia y la desincronización de la relajación ventricular contribuyen a la reducción del llenado ventricular lo que explicaría la reducción de la dp/dt negativa y de la PTDVI (Castellá y cols., 2006).

Durante la taquicardia, los parámetros de función regional se alteraron en las dos zonas analizadas, dependiente de la CCx y dependiente de la CDA, y lo fueron a expensas de un menor alargamiento telediastólico de la fibras miocárdicas. Ambas fracciones de acortamiento se redujeron significativamente, en torno a un 60%, respecto a la inicial, sin diferencias significativas en las mediciones realizadas a los 60 y a los 120 minutos de iniciar la taquicardia.

2.3.2.- Series con isquemia previa.

No hemos encontrado diferencias significativas en el comportamiento de los parámetros hemodinámicos y de función global en las series con isquemia previa respecto a la serie sin isquemia durante la sobreestimulación.

Tampoco hallamos diferencias en la contractilidad segmentaria de la zona dependiente de la CDA durante la taquicardia que, aunque se redujo en todas las series sobreestimuladas, no demostró diferencias entre ellas. Sin embargo, sí encontramos diferencias en la contractilidad regional en la zona control, objetivando una importante reducción de la fracción de acortamiento en la serie con isquemia de 20 minutos y, sobre todo en la serie con isquemias breves y repetidas, que fue significativa a los 120 minutos de la sobreestimulación. La fracción de acortamiento de la zona control en la serie con isquemias repetidas se redujo un 123%, presentando una contractilidad discinética al final de la sobreestimulación. Algo parecido, pero menos intenso, ocurrió con la serie de isquemia única de 20 minutos.

Estos hallazgos en una zona que no fue sometida a isquemia sugieren de nuevo la existencia de un efecto “a distancia” mediado por algún mecanismo humoral o neuronal, ya que, aunque en todas las series hubo una reducción de la contractilidad atribuible a la pérdida de la sincronía de la contracción ventricular, ésta fue más pronunciada en aquellas series en que el estímulo isquémico realizado en otro territorio fue más intenso (Heusch y cols., 2011).

2.4.- Aturdimiento posttaquicardia: diferencias según el tipo de isquemia previa.

2.4.1.- Serie con sobreestimulación y sin isquemia.

Uno de los objetivos de nuestro estudio fue comprobar si una sobreestimulación ventricular a una frecuencia suprafisiológica era capaz de producir aturdimiento miocárdico.

Aunque el aturdimiento miocárdico se debe, básicamente, a un acontecimiento isquémico que ocurre tras periodos breves y transitorios de isquemia miocárdica (Kloner y Jennings, 2001a y b) también se ha descrito tras taquicardia en las aurículas (Khan y cols., 2003) y en los ventrículos. Así, Wang y cols. (2001), en un modelo de miocitos ventriculares aislados, encontraron que una sobreestimulación rápida, con longitudes de ciclo progresivamente menores (700, 500, 400, 300 y 250 mseg) y breve (60 y 90 seg.) producía una depresión de la contractilidad de la célula que atribuyeron a la activación del mecanismo de señal celular dependiente de Ca^{2+} -Proteína Kinasa C. Otros estudios han demostrado que frecuencias elevadas producen una reducción del flujo coronario subendocárdico, acortamiento de la diástole y aumento de las necesidades metabólicas del miocardio que conllevan reducción del inotropismo (Bache y Cobb, 1977; Spinale y cols., 1991b; Shannon y cols., 1993; Nikolaidis y cols., 2001).

En trabajos desarrollados en nuestra Unidad experimental, utilizando perros, hemos observado que la estimulación del ventrículo izquierdo a frecuencias del 20% y 40% sobre la

frecuencia basal durante periodos de 10, 20 y 40 minutos, reducía la fracción de acortamiento de forma significativa ($p < 0,001$) y esta reducción estaba en relación directa con la frecuencia de la estimulación. Tras el cese de la estimulación, las alteraciones de la fracción de acortamiento persistían únicamente cuando la estimulación ventricular era de 40 minutos (Solaz y cols., 1991). Estas observaciones sobre afectación de la contractilidad miocárdica por taquicardia que persiste un tiempo tras el cese de la misma se parecen al fenómeno de aturdimiento miocárdico observado con la isquemia miocárdica por obstrucción coronaria. En estos experimentos, la estimulación auricular a un 20 y 40% de la FC basal, no afectó a la función miocárdica regional como sí ocurría cuando la estimulación era ventricular (Hernández y cols., 2008).

En nuestro estudio encontramos que la afectación de la contractilidad regional tras la sobreestimulación de la pared libre del ventrículo izquierdo, fue mayor en la región latero-basal que en la apico-medial, particularmente en los primeros minutos que siguieron al cese de la taquicardia ($p < 0,05$). Ello se puede explicar por el efecto que la estimulación rápida del ventrículo izquierdo tiene sobre la secuencia de contracción de la banda miocárdica (Torrent-Guasp y cols., 2005; Tomioka y cols., 2006). Así, un análisis reciente del acortamiento de los miocitos dentro de la banda miocárdica ventricular demostró cómo una sobreestimulación univentricular inicia un impulso prematuro en el punto de estimulación que rompe la secuencia de progresión del acortamiento fibrilar a lo largo de la configuración espacial de la hélice muscular cardiaca. Además, el

grado de afectación de la contractilidad regional era diferente según el lugar de implante de los cristales fuera más basal o apical (Liakopoulos y cols., 2006). Además, esta disincronía contráctil produciría contracción sin torsión lo cual reduciría la eficacia de la contracción ventricular (Buckberg y cols., 2008).

Por otro lado, en esta serie sin isquemia objetivamos, tras el cese de la taquicardia, que aunque el volumen latido se recuperó inmediatamente y el gasto cardiaco permaneció en valores normales, la dP/dt positiva se mantuvo en cifras por debajo de las iniciales ($p < 0,05$) y la PSVI sufrió una reducción progresiva que fue significativa al final de la observación. Esta reducción significativa intra-serie de los parámetros de función sistólica global y regional, apoya la hipótesis del aturdimiento ventricular posttaquicardia. Sin embargo, al comparar con la serie *sham* (comparación entre series), no obtuvimos diferencias significativas, por lo que creemos que este protocolo experimental, solo con sobreestimulación a un frecuencia un 60% superior a la inicial, no es suficiente como modelo de insuficiencia cardiaca aguda por aturdimiento, al menos en cerdos.

2.4.2.- Series con isquemia.

En pacientes con enfermedad coronaria, un aumento de los requerimientos miocárdicos de oxígeno (isquemia por aumento de la demanda) puede causar también aturdimiento y producir una disfunción ventricular izquierda postisquémica con efecto acumulativo si los episodios de isquemia son repetidos (Barnes y cols., 2002). En la clínica, la presencia de taquiarritmias en la fase

aguda de un síndrome coronario agudo (Galcerá y cols., 1999; Al-Khatib y cols., 2001) o durante la realización de revascularización coronaria ya sea percutánea (El-Omar y cols., 2003) o quirúrgica (Hogue y Hyder, 2000; Saxena y cols., 2011) se ha asociado con un peor pronóstico, incluso una vez el episodio isquémico se ha resuelto. Sin embargo, muy pocos estudios experimentales han estudiado la secuencia isquemia-taquicardia. La gran mayoría estudia simultáneamente la isquemia y la taquicardia (isquemia por demanda). Tras una revisión exhaustiva de la literatura, los pocos trabajos encontrados en animales realizan la secuencia taquicardia seguida de isquemia (Sinha y cols. 2006) y no al revés, como es el caso de nuestro estudio y que creemos se corresponde mejor con lo que acontece en la clínica.

Nuestro modelo experimental en cerdos anestesiados y con tórax abierto, sometidos a diferentes tipos de isquemia seguidas de una taquicardia, trata de reproducir de una forma directa el escenario clínico de la cirugía de revascularización coronaria complicada con una taquiarritmia en el postoperatorio inmediato. De forma indirecta, intentamos estudiar los mecanismos de disfunción ventricular en el paciente con síndrome coronario agudo que, tras la apertura de la arteria, sufre una taquiarritmia y disfunción cardiaca.

Las series con isquemia se comportaron de forma diferente, respecto a las variables que estimaron la función miocárdica global, en la fase que siguió al cese de la taquicardia. La serie con isquemia única de 10 minutos presentó, respecto a sus valores iniciales, una reducción significativa del volumen latido y del gasto cardiaco en la

fase que siguió al cese de la taquicardia así como una disminución, no significativa en los valores de la dp/dt positiva y negativa. Sin embargo, en la serie con isquemia única de 20 minutos, no se evidenció esta reducción respecto al valor inicial. Es más, algunos de estos parámetros tendieron a aumentar en esta serie. Ahora bien, al comparar el cambio porcentual entre series, no encontramos diferencias.

Creemos que la diferencia de comportamiento entre las dos serie con isquemia única en cuanto a los parámetros de función global puede ser explicado por que la serie con isquemia más prolongada habría producido una estimulación catecolaminérgica mayor que la serie con isquemia de menor duración. El hallazgo de una frecuencia cardiaca más elevada en la serie con isquemia de 20 minutos durante la fase de recuperación avala esta hipótesis. En este sentido, en los primeros 10 minutos de isquemia el miocardio suele estar protegido del exceso de liberación de catecolaminas, protección que se va perdiendo al alargarse la isquemia (Schömig y cols., 1991).

Tampoco nuestros resultados han demostrado un aturdimiento mayor en las series con isquemia continua respecto a la serie sin isquemia o la serie *sham*.

Por lo tanto, los protocolos de isquemia continua de 10 y 20 minutos seguidos de sobreestimulación ventricular no causaron un aturdimiento miocárdico uniforme y duradero. De hecho no empeoraron los resultados de función obtenidos en la serie sin isquemia.

Fue la serie con isquemias breves y repetidas la que causó un mayor afectación de la función global del ventrículo izquierdo. Todos los parámetros, tanto de función sistólica como diastólica, se vieron reducidos significativamente respecto a su valor inicial. Además, hubo diferencias significativas entre esta serie y las otras dos con isquemia única, particularmente la reducción de la PSVI, de la PTDVI positiva y la PTDVI negativa. El efecto sobre la contractilidad regional no fue significativo respecto al resto de series, aunque se observó una tendencia a un mayor aturdimiento de la zona dependiente de la CCx, que no se observó en la zona dependiente de la CDA.

Estos resultados sugieren que el modelo de isquemias breves y repetidas seguido de taquicardia es más adecuado para inducir disfunción cardíaca que los modelos en que la isquemia es continua (al menos hasta 20 minutos). Esto puede tener utilidad para el desarrollo de nuevos modelos animales que reproduzcan mecanismos de descompensación cardíaca aguda en el contexto de cardiopatía isquémica y taquiarritmias. Sin embargo, al interpretar estos resultados, debe tenerse en cuenta que la duración de la fase de isquemias breves y siguientes reperfusiones fue de 100 minutos en nuestro modelo, frente a los 10 y 20 minutos de las series con isquemia continua, lo cual puede haber influido en los datos obtenidos al alargar el tiempo de exposición del corazón.

En cuanto a los efectos sobre los parámetros de función regional, el hallazgo más llamativo de nuestro estudio ha sido que, de forma inesperada, durante la fase de recuperación tras la

taquicardia, el territorio control laterobasal irrigado por la CCx se comportó de forma diferente, con mayor afectación, que la zona anteroapical que fue sometida a isquemia (territorio CDA). Ahora bien, con ciertas diferencias según el tipo de isquemia.

Así, en las series con isquemia continua, y tras el cese de la taquicardia, se mantuvo cierto grado de aturdimiento tanto en la zona que fue sometida a isquemia (apicomedial) como en la zona control (laterobasal), pero más intenso en la zona sometida a isquemia (se obtuvieron valores de *p* significativos respecto a los iniciales). Sin embargo, en la serie con isquemias breves y repetidas, la zona que presentó aturdimiento posttaquicardia más intenso fue la zona control. Al comparar entre series, solo la serie con isquemias breves y repetidas demostró un mayor aturdimiento en la región dependiente de la CCx, con una *p* cercana a la significación. Estas diferencias entre la zona de la base del VI y la del ápex en la serie con isquemias repetidas, también se detectaron durante la isquemia, en los primeros cinco minutos de la reperfusión y durante la sobreestimulación. Como hipótesis, podría ocurrir un acondicionamiento isquémico de esta zona de la base que indujera una reducción de su función (Przyklenk y cols., 1993; Moon y cols., 1998). Además se produciría una mayor afectación causada por la disincronía en la contracción de la banda miocárdica al sobreestimar desde el ventrículo izquierdo (Torrent-Guasp y cols., 2005; Tomioka y cols., 2006). La suma de ambos efectos podría explicar nuestro hallazgo. En este sentido, se ha descrito la reducción de la fracción de acortamiento, tanto en zonas del

miocardio laterobasales como apicomediales, durante una taquicardia (Canty y cols., 1990). Sin embargo pocos estudios han comparado la intensidad de dicha reducción. Tomoike y cols. (1978) describieron, en un modelo canino sometido a isquemia y taquicardia durante 4 minutos, el aturdimiento de la zona isquémica pero no de la control. A parte de la diferente duración de la taquicardia y de las isquemias de este estudio respecto al nuestro, estos autores eligieron como zona control la dependiente de la CDA y sometieron a isquemia la dependiente de la CCx. Esto podría explicar las diferencias respecto a nuestro trabajo.

3.- Análisis de la producción de lipo-peróxidos y del poder reductor del plasma.

3.1.- Efecto de la apertura del tórax y de la exposición al aire ambiente. Serie *sham*.

El hecho de anestesiarse al animal, realizarle una toracotomía y una pericardiotomía con manipulación del epicardio e implantación de diversos dispositivos de medida, algunos de ellos requirieron la punción del miocardio, así como la exposición del tórax abierto al aire y temperatura ambiente, sin duda produce una respuesta inflamatoria y un aumento de la producción de EROs con la consiguiente activación de los sistemas antioxidantes (Inselmann y cols., 1997; Clermont y cols., 2002). Por tanto, el análisis de la serie *sham* es fundamental para evaluar el papel, como factores de confusión, de todas las variables que intervinieron en la preparación experimental.

Y en este sentido, un hallazgo importante de este estudio es que, en cuanto a la producción de LPOs, la serie *sham* se comportó, en términos estadísticos, de la misma forma que el resto de las series durante la mayor parte del experimento excepto en las extracciones realizadas al final del mismo. En este momento, encontramos en la serie *sham* una concentración en plasma de LPO, respecto a su valor inicial, menor que en las dos series con mayor carga isquémica y de reperfusión.

Algo similar ocurrió en la detección de la actividad antioxidante. La serie *sham* no mostró diferencias en la concentración plasmática de glutatión ni en el cociente GSH/GSSG respecto al resto de series excepto, de nuevo, al final del experimento.

Por lo tanto, de estos resultados hemos deducido que, debido a la complejidad y diversidad de los mecanismos que se ponen en funcionamiento cuando se produce un estrés que pueda causar un desequilibrio entre sustancias prooxidantes y sustancias antioxidantes y, dado que en nuestro protocolo experimental se produce una secuencia muy próxima en el tiempo de “agresiones” al organismo (toracotomía - manipulación del corazón – isquemia – taquicardia), hay que ser muy cautos en la interpretación de los resultados referidos a estrés oxidativo obtenidos de las muestras de sangre extraídas a lo largo del experimento, dando más valor a los valores obtenidos en la última extracción, que son las más alejadas del último estímulo prooxidante al miocardio como es la taquicardia.

3.2.- Efecto de la isquemia.

El papel de las EROs y de los productos generados como consecuencia de su interacción con las membranas biológicas, ha sido ampliamente estudiado en el aturdimiento miocárdico. Los radicales libres son producidos, en su mayor parte, durante la reperfusión mas que durante la isquemia (Dhalla y cols., 2000) Debido a que en nuestro protocolo experimental la extracción de sangre tras la isquemia se realizó en los cinco minutos siguientes a la desobstrucción arterial, este decalaje temporal puede ser insuficiente para que los valores de LPO y glutatión obtenidos en plasma de sangre periférica reflejen las alteraciones relacionadas con el estrés oxidativo. En este sentido, Lantos y cols. (2001), en un modelo canino de isquemia-reperfusión en el que ocluían durante 60 minutos la CDA, seguida de un periodo de reperfusión de otros 60 minutos, encontraron que la concentración de MDA, un marcador de lipoperoxidación, fue prácticamente la misma en el seno coronario que en sangre venosa periférica antes de la isquemia y durante la misma. Sin embargo, durante la reperfusión detectaron un aumento significativo de MDA solo en la muestra obtenida del seno coronario. Además, este incremento solo fue significativo en la muestra obtenida a los 60 minutos de reperfusión. Los autores especulan con que la dilución del MDA en sangre periférica podría explicar las diferencias. Es decir, el lugar de la extracción de la muestra también se ha de tener en cuenta a la hora de la interpretación de nuestros resultados. En este sentido, Buffon y cols. (2000b) encontraron diferencias significativas en la concentración de

hidroperóxidos lipídicos en 15 pacientes sometidos a angioplastia de la descendente anterior según la muestra de sangre se extrajera de la aorta o del seno coronario. En la muestra extraída de la aorta no hubo diferencias en la concentración de LPOs respecto al valor basal en las muestras extraídas 1, 5 o 15 minutos tras el desinflado del balón. Sin embargo, en las muestras obtenidas del seno coronario, se encontraron incrementos significativos ya desde el primer minuto de reperfusión. Estos autores concluyen que una isquemia breve es capaz de inducir un incremento sostenido de LPOs detectable en las venas efluentes del miocardio sometido a isquemia-reperfusión pero no en la circulación sistémica. Otros autores ya habían descrito la posibilidad de no detectar o detectar solo débilmente marcadores de estrés oxidativo en sangre periférica tras episodios transitorios de isquemia-reperfusión, debido bien a dilución o bien a eliminación por los sistemas antioxidantes (Blann y cols., 1993; Oostenbrug y cols., 1997).

Por lo explicado en el párrafo anterior, no sorprende que en nuestro trabajo no observáramos diferencias significativas en los valores de LPO ni entre las series, ni en cada serie respecto a su valor inicial, en la muestra obtenida en la fase de reperfusión, antes de iniciar la sobreestimulación.

Sin embargo, sí observamos un consumo del glutatión total y una reducción del cociente GSH/GSSG en todas las series independientemente de si se les realizó algún tipo de isquemia. Creemos que esta respuesta de activación de las defensas antioxidantes se debió al fuerte estrés que originó la esternotomía y

exposición del corazón al aire. En este sentido, Ramos y Guisasola (2010), encontraron que tras un estrés quirúrgico intenso y prolongado, como en la toracotomía, se producía una gran activación de los sistemas antioxidantes en concreto de la síntesis de proteínas de choque térmico. Estudios en mamíferos han demostrado que las proteínas de choque térmico reducen el glutatión total y el cociente GSH/GSSG e incrementan la peroxidación lipídica (Lord-Fontaine y Averill-Bates, 2002; Guo y cols., 2007).

Otro hallazgo muy llamativo de nuestro estudio es que la reducción de la concentración de GSH que encontramos en todas las series antes de iniciar la estimulación no se acompañó de un aumento de la concentración de GSSG como hubiera sido esperable. Este fenómeno ya fue observado en otros estudios como el de Caparrós y cols. (2005), donde compararon las defensas antioxidantes en dos grupos de pacientes sometidos a cirugía cardíaca: un grupo con circulación extracorpórea (CEC) y otro sin ella. Encontraron que el grupo con CEC reducía su concentración de GSH sin aumentar la de GSSG como expresión de una defensa antioxidante ineficaz resultante de la gran cantidad de radicales libres originados por la CEC y que superarían a la capacidad de las defensas antioxidantes. Además, se ha publicado que el primer antioxidante en consumirse es el ascorbato y que los productos derivados de la acción de las EROs no se incrementan en plasma hasta que el ascorbato ha sido consumido por completo (Frei y cols., 1988). Una explicación al no incremento de GSSG paralelo al descenso de GSH en plasma sería que el GSH es introducido en los eritrocitos para ser utilizado en la

reducción de dehidroascorbato, el producto de la oxidación del ascorbato. En este proceso se formaría GSSG pero su paso a plasma conllevaría un decalaje temporal por lo que en la muestra obtenida antes de la sobreestimulación no detectaríamos su incremento.

3.3.- Efecto de la taquicardia.

Las EROs son mediadores clave no solo en la lesión por isquemia-reperusión (Ambrosio y cols., 1991; Lazzarino y cols., 1994; Rigattieri y cols., 2000), si no también en el aturdimiento miocárdico tras una estimulación ventricular rápida o una taquicardia ventricular. Ferdinandy y cols. (1993) demostraron que una taquicardia ventricular inducida por electroestimulación aumentaba la formación de EROs independientemente de las alteraciones del flujo coronario en corazones aislados de ratas. Nakamura y Egashira (2000) encontraron que la administración del antioxidante probucol a perros sometidos a sobreestimulación ventricular rápida reducía la acumulación de EROs. Gare M y cols. (2002), estimulando durante tres horas el miocardio canino a 230 latidos por minuto seguido de un periodo de recuperación de 2 horas, encuentran un aumento en la presión telediastólica del VI y una reducción de la presión sistólica, de la dP/dt max (tasa máxima de aumento de la presión del VI) y del acortamiento segmentario (medido con pares de cristales intramiocárdicos). La recuperación de la contractilidad segmentaria era tiempo-dependiente y más rápida en los animales pretratados con un antioxidante (N-acetil-cisteína). Estos datos apoyan la hipótesis de que las EROs juegan un papel

importante en la patogénesis de la disfunción miocárdica posttaquicardia in-vivo.

En nuestra serie con sobreestimulación ventricular y sin isquemia, frecuencias ventriculares en torno a 162 lpm durante dos horas no produjeron un incremento de la concentración de LPO en sangre periférica; es más, en la muestra obtenida a los 60 minutos de iniciada la taquicardia lo que hallamos fue una reducción de la concentración de LPOs en plasma respecto a los valores iniciales, probablemente debido al efecto de las defensas antioxidantes puesto de manifiesto por la reducción de GSH y del cociente GSH/GSSG en la extracción anterior.

Del análisis de la fase de recuperación deducimos que la sobreestimulación ventricular a frecuencias altas no parece inducir un estrés oxidativo significativo ya que la concentración de LPO, aunque en ascenso, no se incrementó a valores superiores a los iniciales ni se produjo nuevo consumo de GSH.

Sin embargo, en esta serie la reducción de la presión sistólica del V. I. y de la dP/dt positiva y la fracción de acortamiento en la región laterobasal (y en menor medida en la región apicomedia) sí demostraron cierto grado de aturdimiento posttaquicardia, que no parecen deberse, por lo expuesto, a un efecto relacionado con el estrés oxidativo.

3.4.- Efecto de la secuencia "isquemia seguida de taquicardia".

Oldroyd y cols. (1990) sobreestimularon (incrementos de la FC del 10% cada dos minutos hasta: desarrollar dolor torácico, depresión del ST de 2 mm o alcanzar 180 lpm) desde la orejuela

derecha a 26 pacientes durante la realización de una coronariografía. Encontraron que, en aquellos pacientes en que se halló un incremento del ácido láctico en seno coronario (todos con estenosis coronarias significativas), la elevación de malondialdehído era significativamente mayor que en aquellos pacientes que no elevaron el ácido láctico (en este grupo habían pacientes con y sin enfermedad coronaria). Concluyeron que una isquemia miocárdica inducida por una taquicardia (isquemia por demanda) era capaz de causar peroxidación lipídica. Buffon y cols. (2000), en una muestra de pacientes con coronarias sin lesiones y sospecha de síndrome X, encontraron que la sobreestimulación desde la aurícula derecha (incrementos de 10 latidos cada 30 segundos hasta 160 lpm o hasta la aparición de descenso isquémico del ST), producía un incremento de LPOs en el seno coronario aunque solo en aquellos pacientes que presentaron angina o cambios isquémicos del ST durante la sobreestimulación. En un modelo porcino de isquemia por demanda producida por infusión de dobutamina mientras se reducía el flujo por la arteria descendente anterior, Stanley y cols (2005) inducían un aumento del estrés oxidativo que era inhibido en los animales que recibieron un antioxidante.

Como se ha discutido en el apartado anterior, durante la taquicardia todas las series redujeron sus niveles de LPO, respecto a los valores iniciales. Sin embargo, tras el cese de la sobreestimulación, el grado de formación de LPOs fue diferente. Únicamente una serie incrementó de forma significativa la concentración de LPO respecto al inicial y fue la serie con isquemias

breves y repetidas (incremento del 27%). Este hallazgo indicaría que el protocolo de oclusiones cortas seguidas de fases breves de reperfusión sería el mecanismo que mayor estrés oxidativo generaría.

Por otro lado, la actividad antioxidante se comportó de forma parecida en las series con isquemia salvo por dos hechos. Durante la sobreestimulación se detectó un incremento de la concentración de GSH en la serie con isquemia de 20 minutos que no ocurrió en el resto de series. Posiblemente se debió a una mayor activación del *turn over* del glutatión originado en una isquemia más prologada previa. La otra diferencia ocurrió al final del experimento, a los 60 minutos del cese de la taquicardia, en que se objetivó un incremento del glutatión oxidado en las series con isquemia continua pero no en la serie con isquemia breves y repetidas. La explicación podría estar en que la sucesión de isquemia y reperfusión produciría un mayor estrés oxidativo y agotamiento de la vía del glutatión como antioxidante, sin dar tiempo a su recuperación. El hallazgo en esta serie de una menor concentración de GSH al final del estudio apoya esta hipótesis.

4.- Relación entre función y estrés oxidativo.

Por último, no hemos encontrado una correlación entre los valores de los parámetros de función global y regional de la función contráctil del miocardio y los de estrés oxidativo, excepto en la serie con isquemias cortas y repetidas. En esta serie hallamos una

correlación inversa entre estrés oxidativo y gasto cardiaco, lo que apoya la conclusión de que la repetición de episodios breves de isquemia completa tendría el mayor efecto deletéreo sobre la función miocárdica y uno de los mecanismos implicados sería el estrés oxidativo.

CONCLUSIONES

En base a los resultados obtenidos y a las consideraciones realizadas en el presente trabajo, las principales conclusiones son:

1.- La preparación experimental realizada en este estudio y las condiciones ambientales asociadas, no han influido de forma significativa en las mediciones de la función cardíaca global y regional descritas y por tanto en los resultados.

2.- El protocolo experimental de 20 isquemias breves y repetidas seguidas por sobreestimulación ventricular izquierda durante 2 horas, a una frecuencia cardíaca suprafisiológica:

2.1.- Afecta de forma más intensa la función global del ventrículo izquierdo que los protocolos con isquemia continua de 10 y 20 minutos de duración. Esta afectación persiste al menos 60 minutos tras el cese de la taquicardia y la interpretamos como aturdimiento miocárdico.

2.2.- En este protocolo, el aturdimiento de la función contráctil segmentaria es más intenso en la región no sometida a isquemia (base del VI, dependiente de la CCx) que en la región sometida a isquemia (ápex, dependiente de la CDA).

2.3.- Solo en este protocolo, la afectación de la función global ventricular se correlaciona con la aparición de estrés oxidativo.

3.- Ni el protocolo de sobreestimulación sin isquemia previa, ni los protocolos con isquemias continuas (de 10 y 20 minutos) previas a la sobreestimulación, causan una afectación significativa, uniforme y duradera, de los parámetros de la función global y segmentaria del

ventrículo izquierdo. Por ello, no los consideramos buenos protocolos experimentales de insuficiencia cardiaca aguda en el modelo porcino.

4.- La medición de lipoperóxidos y del glutatión en plasma de sangre periférica mostró valores heterogéneos, por lo que no consideramos que esta vía sea la idónea para la obtención de muestras para estudio de estrés oxidativo.

5.- El modelo experimental porcino con tórax abierto, al que se le aplica el protocolo experimental de 20 isquemias breves y repetidas descrito en el presente estudio, es un modelo útil para el estudio de la fisiopatología del fallo cardiaco agudo relacionado con isquemia miocárdica aguda complicada con una taquiarritmia como sucede en el síndrome coronario agudo complicado con frecuencias cardiacas suprafisiológicas y en el postoperatorio inmediato de cirugía de revascularización coronaria, donde a menudo acontecen taquiarritmias.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler N, Camin L, Shulkin P. Rat model for acute myocardial infarction: application to technetium-labeled glucoheptonate, tetracycline, and polyphosphate. *J Nucl Med* 1976; 17:203-207.
- Akerboom TP, Sies H. Assay of glutathione, glutathione disulfide and glutathione mixed disulfides in biological samples. *Methods Enzymol* 1981; 77:373-382.
- Al-Khatib SN, Pieper KS, Lee KL, Mahaffey KW, Hochman JS, Pepine CJ. Atrial fibrillation and mortality among patients with acute coronary syndromes without ST-segment elevation: results from the PURSUIT trial. *American Journal of Cardiology* 2001; 88:76-79.
- Al-Khatib SN, Granger C, Lee KL, Califf RM, Simoons ML, Armstrong PW. Sustained ventricular arrhythmias among patients with acute coronary syndromes with no ST-segment elevation: incidence, predictors and outcomes. *Circulation* 2002; 106:309-312.
- Allen DG, Orchard CH. Myocardial contractil function during ischemia and hipoxia. *Circ Res* 1987; 60:153-168.
- Allison TB, Ramey CA, Holsinger JW Jr. Transmural gradients of left ventricular tissue metabolites after circumflex artery ligation in dogs. *J Mol Cell Cardiol.* 1977; 9:837-852.
- Alyono D, Anderson R, Parrish D, Dai X, Bache R. Alterations of myocardial blood flow associated with experimental canine left ventricular hypertrophy secondary to valvular aortic stenosis. *Circ Res* 1986; 58:47-57.
- Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest* 1991; 87:2056-2066.
- Ambrosio G, Betocchi S, Pace L, Pace L, Losi MA, Perrone-Filardi P. Prolonged impairment of regional contractile function after resolution of exercise-induced angina: evidence of myocardial stunning in patients with coronary artery disease. *Circulation* 1996; 94:2455-2464.
- Ames BN, Shigenaga MK, Hagen TM. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90:7915-7922.

- Andreotti F, Pasceri V, Hackett DR, Davies GJ, Haider AW, Maseri A. Preinfarction angina as a predictor of more rapid coronary thrombolysis in patients with acute myocardial infarction. *N Engl J Med.* 1996; 334:7-12.
- Andrés L. *Cronificación de la disfunción segmentaria mediante repetición de procesos breves de isquemia/reperfusión.* Directores: Juan Cosín Aguilar, Amparo Hernández Martínez. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina de Valencia, 2001.
- Applegate RJ, Walsh R, O'Rourke RA. Comparative effects of pacing-induced and flow-limited ischemia on left ventricular function. *Circulation* 1990; 81:1380-1392.
- Apstein CS, Grossman W. Opposite initial effects of supply and demand ischemia on left ventricular diastolic compliance. The ischemia-diastolic paradox. *J Mol Cell Cardiol*, 1987; 19:119-128.
- Arber S, Hunter J, Ross J, Hongo M, Sansig G, Borg J, Perriard J, Chien K, Caroni P. MLP-deficient mice exhibit a disruption of cardiac cytoarchitectural organization, dilated cardiomyopathy and heart failure. *Cell* 1997; 88: 393-403.
- Armstrong PW, Stopps TP, Ford SE, DeBold AJ. Rapid ventricular pacing in the dog: pathophysiologic studies of heart failure. *Circulation* 1986; 74:1075-1084.
- Bache RJ, Cobb FR. Effect of maximal coronary dilatation on transmural myocardial perfusion during tachycardia in the awake dog. *Circ Res* 1977; 47:648-653.
- Bachmann-Mennenga B, Biscopring J, Kuhn DF, Schurg R, Ryan B, Erkens U. Intercostal nerve block, interpleural analgesia, thoracic epidural block or systemic opioide application for pain relief after thoracotomy. *Eur J Cardiothorac Surg* 1993; 7:12-18.
- Baker M, Cerniglia G, Zaman A. Microtiter plate assay for the measurement of glutathione and glutathione disulfide in large numbers of biologicals samples. *Anal. Biochem.* 1990; 190:360-365.
- Barnes E, Dutka DP, Khan M, Camici PG, Hall RJ. Effect of repeated episodes of reversible myocardial ischemia on myocardial blood flow and function in humans. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002; 282: H1603–H1608.

- Barta J, Tóth A, Edes I, Vaszily M, Papp J, Varró A, Papp Z. Calpain-1-sensitive myofibrillar proteins of the human myocardium. *Mol Cell Biochem* 2005; 278:1-8.
- Basaga HS. Biochemical aspects of free radicals. *Biochem. Cell. Biol.* 1989; 68:989-998.
- Beckman JS y Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad and ugly. *Am J Physiol* 1996; 271:C1424-1437.
- Bednarik JA, May CN. Evaluation of a transit-time system for the chronic measurement of blood flow in conscious sheep. *J Appl. Physiol* 1995; 78: 524-530.
- Berry EM, Kohen R. Is the biological antioxidant system integrated and regulated? *Med Hypoth* 1999; 53: 397-401.
- Bindoli A. Lipid peroxidation in mitochondria. *Free Radic Biol Med*, 1988; 5:247-261.
- Blann A, Midgley H, Burrows G, Maxwell S, Utting S, Davies M. Free radical, antioxidants and endothelial cells damage alter percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Coron Artery Dis* 1993; 4:905-10.
- Bloor CM, White FC, Lammers RJ. Cardiac ischemia and blood flow in swine. In Stanton HC, Mersman HJ, eds. *Swine in cardiovascular research*. Boca Raton, FL: CRC Press, 1986; Vol II:87-104.
- Bollen P, Hansen A, Rasmussen H. The laboratory swine. Sucko M, ed. *The laboratory animal pocket reference series*. Boca Raton, FL: CRC Press. 2000.
- Bolli R, Zhu WX, Thornby JI, Padraig GO, Roberts R. Time course and determinants of recovery of function after reversible ischemia in conscious dogs. *Am J Physiol* 1988a; 254: H102-H114.
- Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai E, McCay P. Demonstration of free radical generation in « stunned » myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N tertiary butyl nitron. *J Clin Invest.* 1988b; 82:476-485.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma O, Halliwell B, Lai E, McCay P. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion: evidence that myocardial “stunning” is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989; 65:607-622.
- Bolli R. Basic and clinical aspects of myocardial stunning. *Prog Cardiovasc Dis* 1998; 40:477-516.

- Bolli R, Marban E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79:609-634.
- Bolli R. The late phase of preconditioning. *Circ Res* 2000; 87:972-983.
- Bøtker HE, Kharbanda R, Schmidt MR, Böttcher M, Kaltoft AK, Terkelsen CJ, Munk K, Andersen NH, Hansen TM, Trautner S, Lassen JF, Christiansen EH, Krusell LR, Kristensen SD, Thuesen L, Nielsen SS, Rehling M, Sørensen HT, Redington AN, Nielsen TT. Remote ischaemic conditioning before hospital admission, as a complement to angioplasty, and effect on myocardial salvage in patients with acute myocardial infarction: a randomised trial. *Lancet* 2010; 375:727-34.
- Braasch W, Gudbjarnson S, Puri PS, Ravens KG, Bing RJ. Early changes in energy metabolism in the myocardium following acute coronary artery occlusion in anaesthetized dogs. *Circ Res* 1968; 23: 429-438.
- Bragadeesh T, Jayaweera A, Pascotto M, Micari A, Le D, Ktamer C, Epstein F, Kaul S. Post-ischemic myocardial dysfunction (stunning) results from myofibrillar oedema. *Heart* 2008; 94:166-171.
- Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, post-ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66:1146-1149.
- Breisblatt WM, Stein RL, Wolfe CJ, Follansbee W, Capozzi J, Armitage J, Hardesty R. Acute myocardial dysfunction and recovery: a common occurrence after coronary bypass surgery. *J Am Coll Cardiol*. 1990;15:1261-1269.
- Brill IC. Auricular fibrillation with congestive failure and no evidence of organic heart disease. *Am Heart J* 1937; 13:175-82.
- Brummelkamp WH, Boerema I, Hoogendyck L. Treatment of clostridial infections with hyperbaric oxygen dressing a report on 26 cases. *Lancet* 1963; 281:235-238.
- Buckberg G, Mahajan A, Saleh S, Hoffman J, Coghlan C. Structure and function relationships of the helical ventricular myocardial band. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2008; 136:578-589.
- Buckley NM, Gootman PM, Yellin EL, Brazeau P. Age-related cardiovascular effects of catecholamines in anesthetized piglets. *Circ Res* 1979; 45:282-292.

- Buda AJ, Leftkowitz CA, Gallagher KP. Augmentation of regional function in nonischemic myocardium during coronary occlusion measured with two-dimensional echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1990; 16: 175-180.
- Budas GR, Churchill EN, Mochly-Rosen D. Cardioprotective mechanisms of PKC isozyme-selective activators and inhibitors in the treatment of ischemia-reperfusion injury. *Pharmacol Res*, 2007; 55:523-36.
- Buffon A, Riggattieri S, Santini S, Ramazzotti V, Crea F, Giardina B, Maseri A. Myocardial ischemia-reperfusion damage after pacing-induced tachycardia in patients with syndrome X. *Am J Physiol* 2000a; 279:H2627-2633.
- Buffon A, Santini S, Ramazzotti V, Riggattieri S, Liuzzo G, Biasucci L, Crea F, Giardina B, Maseri A. Large, sustained cardiac lipid peroxidation and reduced antioxidant capacity in the coronary circulation after brief episodes of myocardial ischemia. *J Am Coll Cardiol* 2000b; 35:633-639.
- Bugge-Asperheim B, Leraand S, Kill R. Local dimensional changes of the myocardium measured by ultrasonic technique. *Scand J Clin Lab Invest* 1969; 24:361-371.
- Bulku E, Zinkovsky D, Patel P, Visahl J, Lahoti T, Khodos I, Stohs S, Ray S. A novel dietary supplement containing multiple phytochemicals and vitamins elevates hepatorenal and cardiac antioxidant enzymes in the absence of significant serum chemistry and genomic changes. *Oxid Med Cell Longev*. 2010; 3:129–144.
- Burke SW, Solomon AJ. Atrial fibrillation in patients after cardiovascular surgery: incidence, risk factors, preventive and therapeutic strategies. *Am J Cardiovasc Drugs* 2003; 3:95-100.
- Buzello W, Williams C, Chandra P, Watkins M, Dozier S. Vecuronium and porcine malignant hyperthermia. *Anesth Analg* 1985; 64:515-519.
- Cabadés A, Cosín J, Hernández A, Ferrando C. Coronary blood flow and reperfusion arrhythmias. *New Trends Arrhyt* 1985; 3:229-237.
- Cabiscol E, Tamarit J, Ros J. Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive species. *Internatl Microbiol* 2000; 3:3-8.
- Calderone A, Bouvier M, Li K, Juneau C, de Champlain J, Rouleau J. Dysfunction of the beta and alpha-adrenergic systems in a model of congestive heart failure. The pacing-overdrive dog. *Circ Res* 1991; 69:332-343.

- Camici PG, Dutka DP. Repetitive stunning, hibernation and heart failure: contribution of PET to establish a link. *Am J Physiol*. 2001; 280:H929-H936.
- Canty JM. Coronary pressure-function and steady-state pressure-flow relations during autoregulation in the unanesthetized dog. *Circ Res* 1988; 63:821-836.
- Canty JM, Giglia J, Kandath D. Effect of tachycardia on regional function and transmural myocardial perfusion during graded coronary pressure reduction in conscious dogs. *Circulation* 1990; 82:1815-1825.
- Canty JM. Coronary blood flow and myocardial ischemia. In: Libby P, Bonow R, Mann D, Zipes D (eds). *Braunwald's Heart Disease: a Textbook of cardiovascular medicine* 8th ed. Philadelphia, USA: Saunders (Elsevier), 2008; Vol.II:1167-1194.
- Caparrós A, Montijano A, Olalla E, Narbona I. Análisis comparativo de la defensa antioxidante en cirugía cardíaca con y sin circulación extracorporeal. *Rev Esp Cardiol* 2005; 58:822-9.
- Carabello B, Nakano K, Corin W, Biederman R, Spann J Jr. Left ventricular function in experimental volume overload hypertrophy. *Am J Physiol* 1989; 256:H974-H981.
- Cardinal R, Rousseau J, Bouchard C, Vermeulen M, Latour JG, Pagé P. Myocardial electrical alteration in canine preparations with combined chronic rapid pacing and progressive coronary artery occlusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 286:H1496-1506.
- Carlson EB, Hinohara T, Morris K. Recovery of systolic and diastolic left ventricular after a 60-second coronary arterial occlusion during percutaneous transluminal coronary angioplasty for angina pectoris. *Am J Cardiol*. 1987; 60:460-466.
- Carlsson M, Saloner D, Martin A, Ursell P, Saeed M. Heterogeneous microinfarcts caused by coronary microemboli: evaluation with multidetector CT and MR imaging in a swine model. *Radiology* 2010; 26:299-308.
- Castellá M, Buckberg G, Saleh S. Diastolic dysfunction in stunned myocardium: a state of abnormal excitation-contraction coupling that is limited by Na⁺-H⁺ exchange inhibition. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29:S107-S114.

- Cesseli D, Jakoniuk I, Barlucchi L, Beltrami A, Hintze T, Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P. Oxidative stress-mediated cardiac cell death is a major determinant of ventricular dysfunction and failure in dog dilated cardiomyopathy. *Circ Res* 2001; 89:279-286.
- Chandrashekhar B, Michel D, Colston J, Freeman G. Regulation of CCAAT/Enhancer binding protein, interleukin-6, interleukin-6 receptor and gp130 expression during myocardial ischemia/reperfusion. *Circulation* 1999; 99:427-433.
- Charlat ML, O'Neill PG, Hartley CJ, Roberts R, Bolli R. Prolonged abnormalities of left ventricular diastolic wall thinning in the "stunned" myocardium in conscious dogs: time course and relation to systolic function. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13: 185-194.
- Chen G, Askenase AD, Chen K, Horowitz LN, Segal BL. The contraction of stunned myocardium: isovolumetric bulging and wasted ejection shortening in dog heart. *Cardiovasc Res* 1992; 26: 115-125.
- Chilian W, Eastham C, Marcus M. Microvascular distribution of coronary resistance in beating left ventricle. *Am J Physiol* 1986; 251:H779-88.
- Chow E, Woodard JC, Farrar DJ. Rapid ventricular pacing in pigs: an experimental model of congestive heart failure. *Am J Physiol* 1990; 258:H1603-5.
- Clermont G, Vergely C, Jazayeri S, Lahet J, Goudeau J, Lecour S, David M, Rochette L, Girard C. Systemic free radical activation is a major event involved in myocardial oxidative stress related to cardiopulmonary by-pass. *Anesthesiology* 2002; 96:80-87.
- Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Conscious rabbits become tolerant to multiple episodes of ischemic preconditioning. *Circ Res* 1994; 74:998-1004.
- Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning from adenosine receptor to K_{ATP} channel. *Annu Rev Physiol*. 2000; 62:79-109.
- Cohn J, Tognoni G. Valsartan Heart Failure Trial Investigators. A randomized trial of the angiotensin-receptor blocker valsartan in chronic heart failure. *N Engl J Med* 2001; 345:1667-1675.
- Coleman HN, Taylor RR, Pool PE, Whipple GH, Covell JW. Congestive heart failure following chronic tachycardia. *Am Heart J* 1971; 81:790.

- Colomer JL, Cosín J, Pomar F, Hernández A, Solaz J, Andrés F, Graullera B. Influencia de la frecuencia cardiaca sobre el flujo coronario en estenosis parciales de la descendente anterior. *Latido* 1992; 4:55.
- Conradie S, Goetzee A, Goetzee J. Anesthetic modulation of myocardial ischemia and reperfusion injury in pigs: comparison between halothane and sevoflurane. *Can J Anesth* 1999; 46:71-81.
- Cope D, Impastato W, Cohen M, Downey J. Volatile anesthetics protect the ischemic rabbit myocardium from infarction. *Anesthesiology* 1997; 86:699-709.
- Cosín J, Rivera M, Solaz J, Hernández A, Andrés F. Efectos del captopril en la prevención de las alteraciones mecánicas miocárdicas inducidas por isquemia aguda. *Rev Lat Cardiol* 1990; 11:46-53.
- Cosín-Aguilar J, Hernández A, Aguilar A, Portolés M, Díez JL. Prevention of myocardial dysfunction by epleronone in experimental tachycardiomyopathy. *Med Sci Monit* 2009; 15:141-147.
- Crenshaw BS, Ward SR, Granger CB, Stebbins AL, Topol EJ, Califf RM. Atrial fibrillation in the setting of acute myocardial infarction: The GUSTO-I experience. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:406-413.
- Crimm A, Severance HWJ, Coffey K, McKinnis R, Wagner GS, Califf RM. Prognostic significance of isolated sinus tachycardia during first three days of acute myocardial infarction. *Am J Med* 1984; 76:983-88.
- Cristal N, Szwarcberg J, Gueron M. Supraventricular arrhythmias in acute myocardial infarction. Prognostic importance of clinical setting; mechanism of production. *Annals of Internal Medicine* 1975; 82:35-39.
- Crystal RG, Ramon JR. GSH system. Glutation: eje de la defensa antioxidante. *Excerpta Medica*. 1992; 5-6.
- Cui W, Chen S, Hu KQ. Quantification. Quantification and mechanisms of oleic acid-induced steatosis in HepG2 cells. *Am J Transl Res* 2010; 2:95-104.
- Dahl LK. Effects of chronic excess salt feeding. Induction of self-sustaining hypertension in rats. *J Exp Med* 1961; 114:231-236.

- Damiano RJ, Tripp HF, Asano T, Small KW, Jones RH, Lowe JE. Left ventricular dysfunction and dilatation resulting from chronic supraventricular tachycardia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1987; 94:135-43.
- Dana A, Sumeray MS, Yellon DM. Ischaemic preconditioning: a clinical perspective. *Hosp Med*.1998; 59:216-220.
- Debley VG. Miniature hydraulic occluder for zero blood flow determinations. *J Appl Physiol* 1971; 31:138-139.
- De Gennaro L, Brunetti ND, Cuculo A, Pellegrino PL, Izzo P, Roma F, Di Biase M. Increased troponin levels in non ischemic conditions. *J Interven Cardiol* 2008; 21:129-139.
- De Leiris J, Harding D, Pestre S. The isolated perfused rat heart: a model for studying myocardial hypoxia or ischemia. *Basic Res Cardiol* 1984; 79:313-321.
- Deutsch E, Berger M, Kussmaul W, Hirshfeld J, Hermann H, Laskey W. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty: clinical, hemodynamic and metabolic features. *Circulation* 1990; 82:2044-2051.
- Dhalla N, Elmoselhi A, Hata T, Makino N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2000; 47:446-456.
- Diamond GA, Forrester JS, De Luz PL, Wyatt H, Swan HJ. Postextrasystolic potentiation of ischemic myocardium by atrial stimulation. *Am Heart J* 1978; 95:204-209.
- Díez JL, Hernández A, Aguilar A, Portolés M, Vila C, Cosín J. ¿Es apropiada la anestesia con isoflurano en un modelo experimental de isquemia y sobreestimulación ventricular? *Latido* 2003; 9:457.
- Downey JM, Yellon DM, The biology of preconditioning. In: Heyndrickx GR, Vatner SF, Wijns W, eds. *Stunning, Hibernation and Preconditioning: Clinical Pathophysiology of Myocardial Ischemia*. Philadelphia, Pa: Lippincott-Raven Publishers; 1997:105-119.
- Duncker D, Klases C, Ishibashi Y, Herrlinger S, Pavek T, Bache R. Effect of temperature on myocardial infarction in swine. *Am J Physiol* 1996; 270: H1189-H1199.
- Derumeaux G, Ovize M, Loufoua J, André-Fouet X, Minaire Y, Cribier A. Doppler tissue imaging quantitates regional wall motion during myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1998; 97:1970-1977.

- Ebert T, Kharasch E, Rooke A, Shroff A, Muzi M and the Sevoflurane Ischemia Study Group. Myocardial ischemia and adverse cardiac outcomes in cardiac patients undergoing noncardiac surgery with sevoflurane and isoflurane. *Anesth Analg* 1997; 85:993-9.
- El-Omar M, Dangas G, Mehran R, Lansky A, Kipshidze N, Polena S, Fahy M, Moussa I, Glasser L, Moses J, Stone G, Leon MB. Usefulness of atrial fibrillation as a marker of outcome after percutaneous coronary intervention. *Am J Cardiol* 2003; 91:232-234.
- Farber NE, Pieper GM, Gross GJ. Regional differences in postischemic recovery in the stunned canine myocardium. *Am Heart J* 1987; 114:1.086-1.092.
- Farre LF, Casado S. Heart failure, redox alterations and endothelial dysfunction. *Hypertension* 2001; 38:1400-1405.
- Fedor JM, Rembert JC, McIntosh DM, Greenfield JC. Effects of exercise and pacing induce tachycardia on coronary collateral flow in the awake dog. *Circ Res.* 1980; 46:214-220.
- Feigl E. Coronary physiology. *Physiol Rev* 1983; 63:1-205.
- Fenelon G, Wijns W, Andries E, Brugada P. Tachycardiomyopathy: mechanisms and clinical implications. *Pace* 1996; 19:95-106.
- Fenton HJH. The oxidation of tartaric acid in the presence of iron. *J Chem Soc Proc* 1894; 10:157-158.
- Ferdinandy P, Das DK, Tokasi A. Pacing-induced ventricular fibrillation leading to oxygen free radical formation in aerobically perfused rat hearts. *J Moll Cell Cardiol* 1993; 25:683-692.
- Fieno D, Kim R, Chen E, Lomasney J, Klocke F, Judd R. Contrast-enhanced magnetic resonance imaging of myocardium at risk. Distinction between reversible and irreversible injury through infarct healing. *J Am Coll Cardiol* 2000; 36:1985-91.
- Fifer M y Grossman M. Measurement of ventricular volumes, ejection fraction, mass, wall stress and regional wall motion. En: Baim D y Grossman W Eds. *Cardiac catheterization, angiography and intervention*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996: p. 333.

- Flaherty JT, Pitt B, Gruber JW, Heuser R, Rothbaum D, Burwell L, George B, Kereiakes D, Deitchman D, Gustafson N. Recombinant human superoxide dismutase (h-SOD) fails to improve recovery of ventricular function in patients undergoing coronary angioplasty for acute myocardial infarction. *Circulation* 1994; 89:1982-1991.
- Fleet WF, Johnson TA, Graebner CA, Gettes LS. Effect of serial brief ischemic episodes on extracellular K^+ , pH and activation in the pig. *Circulation* 1985; 72:992-932.
- Fleisher LA, Beckam JA, Beown K, et al. ACC/AHA guidelines on perioperative cardiovascular evaluation and care for noncardiac surgery. *J Am Coll Cardiol* 2007; 50:1707-32.
- Folts J. An in vivo model of experimental arterial stenosis, intimal damage and periodic thrombosis. *Circulation* 1991; 83 (suppl IV):3-14.
- Frei B, Stocker R, Ames B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci* 1988; 85:9748-9752.
- Fryer RM, Hsu Ak, Gross GJ. Activation of cardiac K_{ATP} channel opening is important during index ischemia and following myocardial reperfusion in ischemic preconditionated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 2001; 33:831-834.
- Fujita M, McKown D, McKwon M, Harteley JW, Franklin D. Evaluation of coronary collateral development by regional myocardial function and reactive hiperemia. *Cardiovasc Res* 1987; 21:377-384.
- Fujita M, Mikuniya A, McKown D, McKwon M, Franklin D. Regional myocardial volume alterations induced by brief repeated coronary occlusion in conscious dogs. *J Am Coll Cardiol* 1988; 12:1048-53.
- Fujiwara H, Matsuda M, Fujiwara Y, Ishida M, Kawamura A, Takemura G. Infarct size and the protection of ischemic myocardium in pig, dog and human. *Jpn Circ J* 1989; 53:1092-1097.
- Fuster V, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. The pathogenesis of coronary artery disease and the acute coronary syndromes. *N Engl J Med* 1992; 326:242-250.

- Galcerá J, Melgarejo A, García Alberola A, Baranco M, Martínez-Lozano F, Rodríguez S. Incidencia, características clínicas y significación pronóstica de las taquicardias supraventriculares en el infarto agudo de miocardio. *Revista Española de Cardiología* 1999; 52:647-55.
- Gallagher KP, Okasada G, Hess OM, Koziol JA, Kemper W, Ross J Jr. Subepicardial segmental function during coronary stenosis and the role of myocardial fiber orientation. *Circ Res* 1982; 50:352-359.
- Ganote C, Humphrey S. Effects of anoxic or oxygenated reperfusion in globally ischemic, isovolumic, perfused rat hearts. *Am J Pathol* 1985; 120:129-145.
- Gao WD, Atar D, Liu Y, Perez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997; 80:393-399.
- García-Dorado D, Fernández F. Mecanismos fisiopatológicos de la isquemia y la reperfusión miocárdica. *Rev Esp Cardiol* 1988; 41:109-118.
- García-Dorado D, Oliveras J, Gili J, Sanz E, Pérez-Villa F, Barrabes J. Analysis of myocardial oedema by magnetic resonante imaging early after coronary occlusion with or without reperfusion. *Cardiovasc Res* 1993; 27:1462-9.
- Gare M, Mraovic B, Kehl F, Kersten JR, Warltier DC, Pagel PS. Reactive oxygen species contribute to contractile dysfunction following rapid ventricular pacing in dogs. *Int J Cardiol* 2002; 83:125-131.
- Gallogly M y Mieyal J. Mechanisms of reversible protein glutathionylation in redox signalling and oxidative stress. *Curr Opin Pharmacol*. 2007; 7:381-391.
- Geft IL, Fishbein MC, Ninomiya K, Hashida J, Chaux E, Yano J, Y-Rit J, Genov T, Shell W, Ganz W. Intermittent brief periods of ischemia have acumulative effect and may cause myocardial necrosis. *Circulation* 1982; 66: 1.150-1.153.
- Gilbert DL. Perspective on the history of oxygen and life. In: Gilbert DL (ed). *Oxygen and the living process: An Inter-disciplinary Approach*. New york: Springer Verlag, 1981; pp 1-43.

- Goette A, Bukowska A, Dobrev D, Pfeiffenberger J, Morawietz H, Strugala D, Strugala D, Wiswedel I, Röhl FW, Wolke C, Bergmann S, Bramlage P, Ravens U, Lendeckel U. Acute atrial tachyarrhythmia induces angiotensin II type 1 receptor-mediated oxidative stress and microvascular flow abnormalities in the ventricles. *Eur Heart J* 2009; 30:1411-1420.
- Gorman J III, Gorman R, Plappert T, Jackson B, Hiramatsu Y, St. John-Sutton M, Edmunds L. Infarct size and location determine development of mitral regurgitation in sheep model. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1998; 115:615-622.
- Gossage AM, Braxton Hicks JA. On auricular fibrillation. *Q J Med* 1913; 6:435-40.
- Goto Y, Igarashi Y, Yamada O, Hiramori K, Suga H. Hyperkinesis without the Frank-Starling mechanism in a nonischemic regions of acutely ischemic excised canine heart. *Circulation* 1988; 77:468-477.
- Goto M, Liu Y, Yang X-M, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in myocardial preconditioning in rabbits hearts. *Circ Res.* 1995; 77:611-621.
- Gray R, Maddhai J, Berman D, Raymond M, Waxman A, Ganz W, Matloff J, Swan HJC. Scintigraphic and hemodynamic demonstration of transient left ventricular dysfunction immediately after uncomplicated coronary artery bypass grafting. *J Thorac Cardiovasc surg* 1979; 77:504-510.
- Graziewicz MA, Day BJ, Copeland WC. The mitochondrial DNA polymerase as a target of oxidative damage. *Nucleic Acids Res*, 2002; 30:2817-2824.
- Grenshaw B, Ward S, Granger C, Stebbins A, Topol EJ, Califf RM. Atrial fibrillation in the setting of acute myocardial infarction: the GUSTO experience. *Journal of American College of Cardiology* 1997; 30:406-13.
- Griffith, OW. Determination of glutathione disulfide using glutathione reductasa and 2-vinylpyridina. *Anal Biochem* 1980; 106:207-212.
- Grinwald P. Calcium uptake during postischemic reperfusion in the isolated rat heart: influence of extracellular sodium. *J Mol Cell Cardiol* 1982; 14:359-365.
- Gross GJ, O'Rourke ST, Pell LR, Warlier DC. Myocardial and endothelial dysfunction after multiple, brief coronary occlusions: role of oxygen radicals. *Am J Physiol* 1992; 263:1703-1709.

- Grossman W. Evaluation of systolic and diastolic function of the myocardium. En Baim D y Grossman W (Eds). *Cardiac catheterization, angiography and intervention*. 5th ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1996; p. 347.
- Grover GJ, Sleph PG, Dzwonezyk S. Role of myocardial ATP-sensitive potassium channels in mediating preconditioning in the dog heart and their possible interaction with adenosine A₁-receptors. *Circulation* 1992; 86:1310-1316.
- Gul M, Kutay FZ, Temocin S, Hanninen O. Cellular and clinical implications of glutathione. *Indian J Exp Biol* 2000; 38:625-634.
- Guo Y, Wu W, Qiu Y, Tang X, Yang Z, Bolli R. Demonstration of an early and a late phase of ischemic preconditioning in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 275:H1375-87.
- Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H. Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress & Chaperones* 2007; 12:245-254.
- Gutteridge J and Tickner T. The characterisation of TBA reactivity in human plasma and urine. *Anal Biochem* 1978; 91:250-257.
- Haber F, Weiss J. Über die Katalyse des Hydroperoxydes. *Naturwissenschaften*, 1932; 20:948-950.
- Hagar JM, Hale SL, Kloner RA. Effects of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res* 1991; 68:61-68.
- Haghighi K, Kolokhatis F, Pater L, Lynch R, Asahi M, Gramolini A, Fan G, Tsiapras D, Hahn H, Adamopoulos S, Liggett S, Dorn G, Kranias E. Human phospholamban null results in lethal dilated cardiomyopathy revealing a critical difference between mouse and human. *J Clin Invest* 2003; 111:869-876.
- Halliwell B, Gutteridge JM. *Free radicals in Biology and Medicine*, third edition. Oxford University Press, Midsomer Norton, Avon, England, 1999.
- Hanich RF, Levine JH, Prood C, Weiss JL, Callans DJ, Spear JF, Moore E. Electrophysiologic recovery in postischemic, stunned myocardium despite persistent systolic dysfunction. *Am Heart J* 1993; 125: 23-32.

- Hanley PJ, Ter Keurs H, Cannell M. Excitation-contraction coupling in the heart and the negative inotropic action of volatile anesthetics. *Anesthesiology* 2004; 101:999-1014.
- Hanson LE. Fifty years progress in swine nutrition. *J Animal Sci* 1958; 17:1029-1057.
- Harman D. Aging, a theory based on free radical and radiation chemistry. *J Gerontol* 1956; 11:298-300.
- Hattori S, Weintraub WS, Agrawal JB, Bodenheimer MM, Banka VS, Helfant RH. Contrasting ischemic contraction patterns by zone and layer in canine myocardium. *Am J Physiol* 1982; 243: 852-855.
- Haude M, Caspari G, Baumgart D, Ehring T, Schulz R, Roth T. X-ray densitometry for the measurement of regional myocardial perfusion. *Basic Res Cardiol* 2000; 95:261-70.
- Hausenloy DJ, Mwamure PK, Venugopal V, Harris J, Barnard M, Grundy E, Ashley E, Vichare S, Di Salvo C, Kolvekar S, Hayward M, Keogh B, MacAllister RJ, Yellon DM. Effect of remote ischemic preconditioning on myocardial injury in patients undergoing coronary artery bypass graft surgery: a randomized controlled trial. *Lancet* 2007; 370:575-379.
- Hearse DJ. Stunning: a radical review. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991;5:853-876.
- Heinke MY, Yao M, Chang D, Einstein R, Dos Remedios CG. Apoptosis of ventricular and atrial myocytes from pacing-induced canine heart failure. *Cardiovasc Res*. 2001; 49:127-134.
- Helmers C, Lundman T, Mogensen I, Orinius E, Sjögren A, Wester PO. Atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *Act Med Scand* 1973; 193:39-44.
- Hendrick DA, Smith AC, Kratz JM, Crawford FA, Spinale FG. The pig as a model of tachycardia and dilated cardiomyopathy. *Lab Anim Sci* 1990; 5:495-501.
- Hernández A, Cosin-Aguilar JA, Aguilar A, Díez JL. Effect of short-duration electrically induced tachycardia on regional myocardial contractility. *Med Sci Monit* 2008; 14:BR20-27.

- Hess ML, Okabe E, Poland J, Werner M, Stewart JR, Greenfield LJ. Glucose, insulin, potassium protection during the course of hypothermic global ischemia and reperfusion: a new proposed mechanism by the scavenging of free radicals. *J Cardiovasc Pharmacol* 1983; 5:35-43.
- Heusch G, Skyschally A, Schulz R. The in-situ pig heart with regional ischemia/reperfusion-Ready for translation. *J Moll Cell Cardiol* 2011; 50:951-963.
- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie J, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest* 1975; 56: 978-985.
- Heyndrickx GR, Baig H, Nellens P, Leusen I, Fishbein MC, Vatner SF. Depression of regional blood flow and wall thickening after brief coronary occlusion. *Am J Physiol* 1978; 234: H653-H659.
- Hill JL, Gettes LS. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K⁺ activity in swine. *Circulation* 1980; 61:768-78.
- Hoffman JIE. Determinants and predictors of transmural myocardial perfusion. *Circulation* 1978; 58:381-391.
- Hoffman JIE. Transmural myocardial perfusion. *Prog Cardiovas Dis* 1987; 29:429.
- Hoffman JIE, Spaan JAE. Pressure-flow relations in coronary circulation. *Physiol Rev* 1990; 70:331.
- Hogue CW Jr, Hyder ML. Atrial fibrillation after cardiac operation: risks, mechanisms and treatment. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:300-306.
- Hoit BD, Lew WY. Functional consequences of acute anterior vs. posterior wall ischemia in canine left ventricles. *Am J Physiol* 1988; 254:H1065-H1073.
- Homans DC, Sublett E, Dai X-Z, Bache Rj. Persistence of regional left ventricular dysfunction after exercise-induced myocardial ischemia. *J Clin Invest* 1986; 77:66-73.
- Homans D, Laxson D, Sublett E, Pavek T, Crampton M. Effect of exercise intensity and duration on regional function during and after exercise-induced ischemia. *Circulation* 1991; 83:2029-2037.
- Hongo M, Ryoke T, Ross Jr J. Animal models of heart failure: recent developments and perspectives. *Trend Cardiovasc Med* 1997; 7:161-167.

- HOPE: The Heart Outcomes Prevention Evaluation Study investigators. Vitamin E supplementation and cardiovascular events in high risk patients. *N Engl J Med* 2000; 342:154-160.
- Hoshida S, Zuzya T, Fuji H. Sublethal ischemia alters myocardial antioxidant activity in canine heart. *Am J Physiol* 1993; 33: H33-H39.
- Hosko M, Gross G, Warltier D. Technique for precise, graded arterial stenosis and occlusion. *Bas Res Cardiol* 1977; 72:651-659.
- Howard RJ, Moe GW, Armstrong PW. Sequential echocardiographic-Doppler assesment of left ventricular remodelling and mitral regurgitation during evolving experimental heart failure. *Cardiovasc Res* 1991; 25: 468-74.
- Hrbac J, Kohen R. Biological redox activity: Its importance, methods for its quantification and implication for health and disease. *Drug Develop Res* 2000; 50:516-527.
- Humphrey S, Thomson R, Gavin J. The effect of an isovolumic left ventricle on the coronary vascular competence during reflow after global ischemia in the rat heart. *Circ Res* 1981; 49:784-791.
- Ikonomidis JS, Tumati LC, Weisel RD, Mickle DAG, Li R-K. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res* 1994; 28:1285-1291.
- Inselmann G, Kohler K, Lange V, Silber R, Nellesen U. Lipid peroxidation and cardiac troponin-T release during routine cardiac surgery. *Cardiology* 1998; 89:124-129.
- Ito H. No-reflow phenomenon and prognosis in patients with acute myocardial infarction. *Nat Clin Pract Cardiovasc Med* 2006; 3:499-506.
- Jackson B, Gorman J III, Moainie S, Guy T, Narula N, Narula J, St John-Sutton M, Edmunds L, Gorman R. Extension of borderzone myocardium in postinfarction dilated cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol* 2002; 40:1160-1167.
- Jacobson MD. Reactive oxygen species and programmed cell death. *Trends Biochem. Sci.*, 1996; 243:81-119.
- Janero DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative injury. *Free Radic Biol* 1990; 9:515-540.
- Jennings RB, Sommers HM, Smyth G, Flack HA, Linn H. Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog. *Arch Pathol* 1960; 70:68-78.

- Jennings RB. Myocardial ischemia observations, definitions and speculations. *J Mol Cell Cardiol* 1970; 1:345-349
- Jennings RB, Reimer KA, Hill ML, Mayer SE. Total ischemia, in dogs hearts, in vitro, I: comparison of high energy phosphate production, utilization and depletion and of adenine nucleotide catabolism in total ischemia in vitro vs severe ischemia in vivo. *Circ Res* 1981; 49:892-900.
- Jennings RB, Schaper J, Hill ML, Steenbergen C Jr, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury: changes in cell volume, electrolytes, metabolites and ultrastructure. *Circ Res* 1985;56:262-278.
- Jennings RB, Steenbergen C Jr. Nucleotide metabolism and cellular damage in myocardial ischemia. *Annu Rev Physiol* 1985; 47:727-749.
- Jennings RB, Reimer KA, Steenberg C Jr. Myocardial ischemia revisited: the osmolar load, membrane damage and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol*. 1986; 18:769-780.
- Jennings RB, Murry CE, Steenberg C Jr, Reimer KA. Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation* 1990a; 82 (suppl):II-2-II-12.
- Jennings RB, Murry CE, Reimer KA. Myocardial effects of brief periods of ischemia followed by reperfusion. In: Kellerman JJ, Braunwald E (eds). *Advances in Cardiology* (Vol 37). Basel, Switzerland: Karger; 1990b:7-31.
- Jennings RB. Role of protein kinase C in preconditioning with ischemia against lethal cell injury. *Basic Res Cardiol*. 1997; 92 (suppl 2):40-42.
- Jennings RB, Sebbag L, Schwartz LM, Crago M, Reimer K. Metabolism of preconditionated myocardium: effect of loss and reinstatement of cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33:1571-1588.
- Jeroudi MO, Triana FJ, Patel BS, Bolli R. Effect of superoxide dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning". *Am J Physiol* 1990; 259:H889-H901.
- Jeroudi MO, Cheirif J, Habib G, Bolli R. Prolonged wall motion abnormalities after chest pain at rest in patients with unstable : a possible manifestation of myocardial stunning. *Am Heart J*. 1994; 127:1241-1250.
- Jezek J, Jaburek M, Zelenka J, Jezek P. Mitochondrial phospholipase A2 activated by reactive oxygen species in heart mitochondria induces mild uncoupling. *Physiol Res* 2010; 59:737-747.

- Jordaens L, Missault L, Germompere E, Callens B, Adang L, Vandenberghe J, Clement DL. Delayed restoration of atrial function after conversion of atrial flutter by pacing or electrical cardioversion. *Am J Cardiol* 1993; 71:63-67.
- Kaeffer N, Richard V, Thuillez C. Delayed coronary endothelial protection 24 hours after preconditioning: role of free radicals. *Circulation* 1997; 96:2311-6.
- Kajstura J, Zhang X, Liu Y, Szoke E, Cheng W. The cellular basis of pacing-induced dilated cardiomyopathy. Myocyte cell loss and myocyte cellular reactive hypertrophy. *Circulation* 1995; 92:2306-17.
- Kanaya N, Fujita S. The effects of isoflurane on regional myocardial contractility and metabolism in "stunned" myocardium in acutely instrumented dogs. *Anesth Analg* 1994; 79:447-454.
- Karmazyn M, Moffat MP. Role of Na⁺/H⁺ exchange in cardiac physiology and pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox. *Cardiovasc Res.* 1993; 27:915-927.
- Katz LN. The performance of the heart. *Circulation.* 1960; 21:483-98.
- Katz AM, Hecht HH. The early pump failure of the ischemic heart. *Am J Med* 1969; 47:497.
- Kaul S. Evaluating the "no-reflow" phenomenon with myocardial contrast echocardiography. *Basic Res Cardiol* 2006; 101:391-399.
- Kehl F, Krolikowski J, Mraovic B, Pagel P, Wartier D, Kersten J. Is isoflurane-induced preconditioning dose related? *Anesthesiology* 2002; 96:675-680.
- Kerber RE, Marcus ML, Wilson R, Ehrhardt J, Abboud FM. Effects of acute coronary occlusion on the motion and perfusion of the normal and ischemic interventricular septum: an experimental echocardiographic study. *Circulation* 1976; 54:828-835.
- Kevin LG, Farcasi NE, Stowe DF. Reactive oxygen species as mediators of cardiac injury and protection: the relevant to anesthesia practice. *Anesth Anal*, 2005; 101:1275-87.
- Khan IA. Transient atrial mechanical dysfunction (atrial stunning) after cardioversion of atrial fibrillation and flutter. *Am Heart J* 2002; 144:11-22.
- Khan IA. Atrial stunning: determinants and cellular mechanisms. *Am Heart J* 2003; 145:787-94.

- Kitakaze, M, Weisman H, Marban E. Contractile dysfunction and ATP depletion after transient calcium overload in perfused ferret hearts. *Circulation* 1988; 77:685–695.
- Kleaveland J, Kussmaul W, Vinciguerra T, Ditters R, Carabello B. Volume overload hypertrophy in a closed-chest model of mitral regurgitation. *Am J Physiol* 1988; 254:H1034-H1041.
- Kleber AG. Resting membrana potencial extracellular potassium activity, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res.* 1983; 52:442-50.
- Klocke FJ. Coronary blood flow in man. *Prog Cardiovasc Dis* 1976; 19:117-166.
- Kloner RA, Ellis SG, Lange R, Braunwald E. Studies of experimental coronary artery reperfusion: effects on infarct size, myocardial function, biochemistry, ultrastructure and microvascular damage. *Circulation* 1983;68 (suppl I):I-8-I-15.
- Kloner RA, Przyklenk K, Patel B. Altered myocardial states: the stunned and hibernating myocardium. *Am J Med* 1989; 86(suppl) 1A:14-22.
- Kloner RA, Allen J, Cox TA, Zheng Y, Ruiz C. Stunned left ventricular myocardium after exercise treadmill testing in coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 1991; 68:329-334.
- Kloner RA. Does reperfusion injury exist in humans? *J Am Coll Cardiol* 1993; 21:537-545.
- Kloner RA, Przyklenk K, Kay GL. Clinical evidence of stunned myocardium after coronary artery bypass surgery. *J Card Surg* 1994; 9(suppl):397-402.
- Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients? *J Am Coll Cardiol.* 1994; 24:1133-1142.
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning. An NHLBI Workshop. *Circulation* 1998; 97:1848-1867.
- Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 1. *Circulation* 2001a; 104:2981-2989.
- Kloner RA, Jennings RB. Consequences of brief ischemia: Stunning, preconditioning, and their clinical implications. Part 2. *Circulation* 2001b; 104:3158-3167.

- Knight CH, Fox K. From antianginal drugs to myocardial cytoprotective agents. *Am J Cardiol* 1995; 76:4B-7B.
- Kohen R, Gati I. Skin low molecular weight antioxidants and their role in aging and in oxidative stress. *Toxicology* 2000; 148:149-157.
- Kohen R and Nyska A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicologic Pathology* 2002; 30:620-650.
- Komamura K, Shannon RP, Pasipoularides A, Ihara T, Lader AS, Patrick TA. Alterations in left ventricular diastolic function in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *J Clin Invest* 1992; 89:1825-38.
- Koning MM, Gho BC, van Klairwater E, Opstal RL, Duncker DJ, Verdouw PD. Rapid ventricular pacing produces myocardial protection by non-ischemic activation of K_{ATP+} channels. *Circulation* 1996; 93:178-86.
- Koretsune Y and Marban E. Cell calcium in the pathophysiology of ventricular fibrillation and in the pathogenesis of postarrhythmic contractile dysfunction. *Circulation* 1989; 80:369-379.
- Kubota T, McTiernan C, Frye C, Slawson S, Lemster B, Koretsky A, Demetris A, Feldman A. Dilated cardiomyopathy in transgenic mice with cardiac-specific overexpression of tumor necrosis factor-(alpha). *Circ Res* 1997; 81:627-635.
- Kudo N, Barr AJ, Barr RL, Desai S, Lopaschuk G. High rates of fatty acid oxidation during reperfusion of ischemic hearts are associated with a decrease in malonyl-CoA levels due to an increase in 5'-AMP activated protein kinase inhibition of acetyl-CoA carboxylase. *J Biol Chem*. 1995; 270:17513-17520.
- Kusuoka H, Porterfield J, Weisman H, Weisfeldt M, Marban E. Pathophysiology and pathogenesis of stunned myocardium. Depressed Ca^{2+} activation of contraction as a consequence of reperfusion-induced cellular calcium overload in ferret hearts. *J Clin Invest* 1987; 79: 950-961.
- Kusuoka H, Marban E. Cellular mechanisms of myocardial stunning. *Annu Rev Physiol* 1992; 54: 243-256.

- Kusuoka H, Camilion de Hurtado M, Marban E. Role of Na⁺/Ca²⁺ exchange in the mechanism of stunning: protective effect of reperfusion with high-sodium solution. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21:240-248.
- Kuzuya T, Hoshida S, Yamashita N, H Fuji, H Oe, M Hori, T Kamada, M Tada. Delayed effects of sublethal ischemia on the acquisition of tolerance to ischemia. *Circ Res*. 1993; 72:1293-1299.
- Landoni G, Biondi-Zoccai G, Zangrillo A, Bignami E, D'Avolio S, Marchetti C. Desflurane and sevoflurane in cardiac surgery: a meta-analysis of randomized clinical trials. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 2007; 21:502-511.
- Landoni G, Fochi O, Tritapepe L, Guarracino F, Belloni I, Bignami E, Zangrillo A. Cardiac protection by volatile anesthetics. A review. *Minerva Anesthesiol* 2009; 75:269-273.
- Lange R, Ingwall JS, Hale SL, Allen KJ, Kloner RA. Effects of recurrent ischemia on myocardial high energy phosphate content in canine hearts. *Basic Res Cardiol*. 1984; 79:469-478.
- Langendorff O. Zur kenntniss des blutlaufs in den kranzgefässen des herzens. *Pflügers Arch Ges Physiol* 1899; 78:423.
- Lantos J, Temes G, Göbölös L, Jaberansari MT, Röth E. Is peripheral blood a reliable indicator of acute coronary oxidative stress following heart ischemia and reperfusion? *Med Sci Monit* 2001; 7:1166-1170.
- Larsen J, Aagaard S, Lie R, Sloth E, Hasenkam J. Sevoflurane improves myocardial ischaemic tolerance in a closed-chest porcine model. *Acta Anaesthesiol Scand* 2008; 52:1400-140.
- Lazzarino G, Raatikainen P, Nutinen M. Myocardial release of malondialdehyde and purine compounds during coronary by-pass surgery. *Circulation* 1994; 90:291-297.
- Lee DS, Yeo JS, Chung J-K, Lee MM, Lee MC. Transient prolonged stunning induced by dipyridamole and shown on 1- and 24-hour post stress ^{99m}Tc-MIBI gated SPECT. *J Nuclear Med* 2000; 41: 27-35.
- Lehninger, AL., Nelson, DL. Cox, MM. *Principios de Bioquímica (edición en Español)*. Ediciones Omega SA. 5ªed. 2009.

- Leibowitz JO. The history of coronary heart disease. London 1970, Wellcome Institute.
- Lemasters JJ, Bond JM, Chacon E, Harper IS, Kaplan SH, Ohata H, Trollinger DR, Herman B, Cascio WE.. The pH paradox in ischemia-reperfusion injury to cardiac myocytes. *EXS* 1996; 76:99-114.
- Levine RL, Stadtman ER. Oxidative modification of proteins during aging. *Exp Gerontol* 2001; 36:1495-1502.
- Levrant J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoeck TL, Schumacker PT. Cell death during ischemia: relation-ship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284:H549-58.
- Liakopoulos OJ, Tomioka H, Buckberg GD, Tan Z, Hristov N, Trummer G. Sequential deformation and physiological considerations in unipolar right or left ventricular pacing. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29S:S188-97.
- Liedtke A, DeMaison L, Eggleston A, Cohen L, Nellis S. Changes in substrate metabolism and effects of excess fatty acids in reperfused myocardium. *Circ Res* 1988; 62: 535-542.
- Liu GS, Thornton J, VanWinkle DM, et al. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A₁ adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation* 1991; 84: 350-356.
- Liu B, Clanachan AS, Schulz R, Lopaschuk GD. Cardiac efficiency is improved after ischemia by altering both the source and fate of protons. *Circ Res*. 1996; 79: 940–948.
- Lopaschuk GD, Collins-Nakai R, Olley PM, Montague TJ, McNeil G, Gayle M, Penkoske P, Finegan BA. Plasma fatty acid levels in infants and adults alter myocardial ischemia. *Am Heart J*. 1994; 128:61–67.
- Lopaschuk GD. Manipulation of free fatty acid oxidation in ischemic heart disease. *Medicographia*. 2003;25:334–340.
- Lord-Fontaine, S. and D.A. Averill-Bates. Heat shock inactivates cellular antioxidant defenses against hydrogen peroxide: Protection by glucose. *Free Radical Biol. Med.* 2002; 32:752-765.

- Lu H, Xu X, Zhang M, Cao R, Brakenhielm E, Li C, Lin H, Yao G, Sun H, Cao Y. Combinatorial protein therapy of angiogenic and arteriogenic factors remarkably improves collateralogenesis and cardiac function in pigs. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; 104:12140-12145.
- Lucats L, Chalvignac V, Bizé A, Monnet X, Zini R, Hittinger L, Berdeaux A, Ghaleh B. Rapid ventricular pacing induces delayed cardioprotection against myocardial stunning. *J Mol Cell Cardiol* 2005; 39:849-855.
- Macho P, Solis E, Sanchez G, Schwarze H, Domenech R. Mitochondrial ATP dependent potassium channels mediate non-ischemic preconditioning by tachycardia in dogs. *Mol Cell Biochem* 2001; 216:129-36.
- Mahaffey KW, Puma JA, Barbagelata A, DiCarli MF, Leeser MA, Browne KF, Eisenberg PR. Results of multicenter, randomized, placebo controlled trial: the acute myocardial infarction study of adenosine (AMISTAD) trial. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34:1711-1720.
- Manders WT, Vatner SF. Effects of sodium pentobarbital anesthesia on left ventricular function and distribution of cardiac output in dogs, with particular reference to the mechanism for tachycardia. *Circ Res* 1976; 39:512-517.
- Mann D, McMurray J, Packer M, Swedberg K, Borer J, Colucci W, Djian J, Drexler H, Feldman A, Kober L, Krum H, Liu P, Nieminen M, Tavazzi L. Targetered anticytoquine therapy in patients with chronic heart failure: results of the randomized etarcept worldwide evaluation (RENEWAL). *Circulation* 2004; 109:1594-1602.
- Manning AS, Hearse DJ. Reperfusion-induced arrhythmias: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 1984;16:497-518.
- Marban E, Kitakaze M, Koretsune Y, Yue D, Chacko V, Pike M. Quantification of [Ca²¹]i in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischemia and reperfusion. *Circ Res* 1990; 66:1255–1267.
- Marber MS, Latchman DS, Walker JM, Yellon DM. Cardiac stress protein elevation 24 hours after brief ischemia or heat stress is associated with resistance to myocardial infarction. *Circulation* 1993a; 88:1264-1272.

- Marber MS, Walker DM, Eveson DJ, Walker JM, Yellon DM. A single five-minute period of rapid atrial pacing fails to limit infarct size in the in situ rabbit heart. *Cardiovasc Res* 1993b; 27:597-601.
- Marín-García J, Goldenthal MJ, Moe GW. Abnormal cardiac and skeletal muscle mitochondrial function in pacing-induced cardiac failure. *Cardiovasc Res.* 2001; 52:103-110.
- Marín-García J, Goldenthal MJ. La mitocondria y el corazón. *Rev Esp Cardiol* 2002; 55:1293-1310.
- Maroko PR, Kjekshus JK, Sobel BE, Watanabe T, Covell JW, Ross J Jr, Braunwald E. Factors influencing infarct size following experimental coronary artery occlusions. *Circulation* 1971; 43: 67-82.
- Martí S, Pallarés V, Capdevila C, Hernández A, Portolés M, Cosín J. Precondicionamiento isquémico. ¿Es siempre un fenómeno beneficioso?. *Rev Esp Cardiol* 1999; 52:429-436.
- Martorana PA, Kettenbach B, Briepohl G, Linz W, Schölkens BA. Reduction of infarct size by local angiotensin converting enzyme inhibition is abolished by a bradykinin antagonist. *Eur J Pharmacol.* 1990; 182:395-396.
- Mason DT. Usefulness and limitations of the rate of rise on intraventricular pressure (dp/dt) in the evaluation of myocardial contractility in man. *Am J Cardiol* 1969; 23:516-527.
- Mason RP. In vitro and in vivo detection of free radicals metabolites with ESR. In: PUNCHARD NA, KELLY FJ (eds). *Free Radicals: A practical approach*. Oxford, England : IRL Press, 1996, pp 11-24.
- Matre K, Hexeberg E, Grong K, Lekuen J. Local myocardial function following coronary occlusion in cats. Effect on non-ischemic regions. *Clin Physiol* 1987; 7:511-523.
- Matsuzaki M, Gallagher K, Kemper W, White F, Ross Jr J. Sustained regional dysfunction produced by prolonged coronary stenosis: gradual recovery after reperfusion. *Circulation* 1983; 68:170-182.
- Mattioli AV, Tarabini CE, Vivoli D, Molinari R, Mattioli G. Restoration of atrial function after atrial fibrillation of different etiological origins. *Cardiology* 1996; 87:205-11.

- Mayer N, Zimpfer M, Steinbereithner K. Isoflurane impairs function of ischemic myocardium in acutely but not in chronically instrumented dogs. *Anesth Analg* 1991; 73:16-24.
- McCarthy P, Takagaki M, Ochiai Y, Young J, Tabata T, Shiota T, Qin J, Thomas J, Mortier T, Schroeder R, Schwiech C Jr, Fukumachi K. Device-based change in left ventricular shape: a new concept for the treatment of dilated cardiomyopathy. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001; 122:482-490.
- McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte. *J Biol Chem* 1969; 244:6049-6055.
- McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. *Fed Proc* 1987; 46:2402-2406.
- McCune S, Park S, Radin M, Jurin R. HHF/Mcc-facp rat model: a genetic model of congestive heart failure. In: Singal P, Dixon I, Beamish R, Dhalla R, eds. *Mechanisms of Heart Failure*. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer academic publishers; 1995:91-106.
- McDonough JL, Arrell DK, VanEyck JE. Troponin I degradation and covalent complex formation accompanies myocardial ischemia/reperfusion injury. *Circ Res* 1999; 84:9-20.
- Meral A, Tuncel P, Surmen-Gur E, Ozbek R, Ozturk E, Gunay U. Lipid peroxidation and antioxidant status in beta-thalassemia. *Pediatr Hematol Oncol* 2000; 687-693.
- Merin RG, Verdouw PD, De Jong JW. Myocardial functional and metabolic responses to ischemia in swine during halothane and fentanyl anesthesia. *Anesthesiology* 1982; 56:84-92.
- Michael L, Entman M, Hartley C, Youker K, Zhu J, Hall S, Hawkins H, Berens K, Ballantyne C. Myocardial ischemia and reperfusion: a murine model. *Am J Physiol* 1995; 269:H2147-H2154.
- Mihaljevic B, Katusin, Razem B, Razem D. The evaluation of the ferric thiocyanate assay for lipid hydroperoxides with special considerations of the mechanism aspects of the response. *Free Radic Biol Med* 1996; 21:53-63.
- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R, Tuteja N. Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* 2009; 15:RA209-219.

- Moe GW, Stopps TP, Howard RJ, Armstrong PW. Early recovery from heart failure: insights into the pathogenesis of experimental chronic pacing-induced heart failure. *J Lab Clin Med* 1988; 112:426-432.
- Moe GW, Stopps TP, Angus C, Forster C, De Bold A, Armstrong PW. Alterations in serum sodium in relation to atrial natriuretic factor and other neuroendocrine variables in experimental pacing-induced heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1989; 13:173-179.
- Moe GW, Angus C, Howard RJ, Parker TG, Armstrong PW. Evaluation of indices of left ventricular contractility and relaxation in evolving canine experimental heart failure. *Cardiovasc Res.* 1992;26:262-266.
- Molaug M, Stokland O, Ilebeck A, Lekven J, Kiil F. Myocardial function of the interventricular septum. Effects of right and left ventricular pressure loading before and after pericardiotomy in dogs. *Circ Res* 1981; 49: 52-61.
- Molloi S, Zhou Y, Kassab GS. Regional volumetric coronary blood flow measurement by digital angiography: in vivo validation. *Acad Radiol.* 2004; 11:757-676.
- Moon KW, Kim JH, Yoo KD, Youn HJ, Chung WS, Chae JS, Choi KB, Hong SJ. Effects of myocardial stunning on remote coronary flow reserve. *Korean Circulation J* 1998; 28:2002-2010.
- Moon MR, Luchette F, Gibson SW, Crews J, Sudarshan G, Hurst J, Davis K, Johannigman J, Frame S, Fischer J. Prospective, randomized comparison of epidural *versus* parenteral opioid analgesia in thoracic trauma. *Ann Surg* 1999; 229:684-691.
- Mor-Avi V, Caiani E, Collins K, Korcarz C, Bednarz J, Lang R. Combined assessment of myocardial perfusion and regional left ventricular function by analysis of contrast-enhanced power modulation images. *Circulation* 2001; 104:352-357.
- Moreu J, Macaya C. Fisiopatología del miocardio isquémico. Importancia de la frecuencia cardíaca. *Rev Esp Cardiol Supl.* 2007; 7:19D-25D.
- Morgan DE, Tomlinson CW, Quayumi AK, Toleikis PM, McConville B, Jamieson WR. Evaluation of ventricular contractility indexes in the dog with left ventricular dysfunction induced by rapid atrial pacing. *J Am Coll Cardiol* 1989; 14:496-498.

- Morillas PJ. *Citoprotección miocárdica: efecto de la trimetazidina en la isquemia miocárdica*. Directores: Juan Cosín Aguilar, Manuel Portolés Sanz. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, 2001.
- Mukherjee R, Brinsa T, Dowdy K, Scott A, Baskin J, Deschamps A, Lowry A, Escobar G, Lucas D, Yarbrough W, Zile M, Spinale F. Myocardial infarct expansion and matrix metalloproteinase inhibition. *Circulation* 2003; 107:618-625.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 14:1124-1136.
- Murry CE, Richard VJ, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: is the protective effect mediated by free-radical myocardial stunning? *Circulation* 1988; 78(suppl II):II-77. Abstract.
- Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings RB. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res* 1990; 66:913-931.
- Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley C, Roberts R. Enhancement of recovery of myocardial function by oxygen free-radical scavengers after reversible regional ischemia. *Circulation* 1985; 72:915-921.
- Nakamura R, Egashira K. An important role of oxygen free radical on left ventricular function and remodeling in a canine model of tachycardia-induced heart failure. *Circulation* 2000; 102:II-194.
- Näslund U, Häggmark S, Johansson G, Marklund SL, Reiz S. A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Hear J* 1992; 13:1282-1289.
- Nekolla S, Reder S, Saraste A, Higuchi T, Dzewas G, Preissel A. Evaluation of the novel myocardial perfusion positron-emission tomography tracer 18F-BMS-747158-02: comparison to 13N ammonia and validation with microspheres in a pig model. *Circulation* 2009; 119:2333-42.
- Nguyen T, Chagas A, Glantz S. Left ventricular adaptation to gradual renovascular hypertension in dogs. *Am J Physiol* 1993; 265:H22-H38.

- Nicklas JM, Becker LC, Bulkley BH. Effects of repeated brief coronary occlusion on regional left ventricular function and dimension in dogs. *Am J Cardiol* 1985; 56: 473-478.
- Nigam, S, Schewe, T. Phospholipase A2s and lipid peroxidation. *Biochim Biophys Acta* 2000, 1488:167-181.
- Nikolaidis LA, Hentosz T, Doverspike A, Huerbin R, Stolarski C, Shen YT, Shannon RP. Mechanisms whereby rapid RV pacing causes LV dysfunction: perfusion-contraction matching and NO. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 281:H2270-H2281.
- Ning XH, Zweng TN, Gallagher KP. Ejection and isovolumetric contraction-phase wall thickening in nonischemic myocardium during coronary occlusion. *Am J Physiol* 1990; 258:490-499.
- Nixon JV, Broen CN, Smitherman TC. Identification of transient and persistent segmental wall motion abnormalities in patients with unstable angina by two-dimensional echocardiography. *Circulation* 1982; 65:1497-1503.
- Noda K, Sasaguri M, Ideishi M, Ikeda M, Arakawa K. Role of locally formed bradykinin in the reduction of myocardial infarct size in dogs. *Circ Res.* 1993; 27:334-340.
- Nohl H y Hegner D. Do mitochondria produce oxygen radicals in vivo?. *Eur J Biochem*, 1978; 82:563-567.
- Noma S, Askenase A, Agrawal J, Helfant RH. The effects of changes in afterload on systolic bulging. *Circulation* 1988; 77:221-226.
- Nourooz-Zadeh J, Tajaddini-Sarmadi J, Wolff SP. Measurement of plasma hidroperoxide concentrations by the ferrous oxidation-xilenol orange assay in conjunction with triphenylphosphine. *Anal Biochem* 1994; 220:403-409.
- Oda T, Sadakata N, Komatsu N, Muramatsu T. Specific efflux of glutathione from the basolateral membrane domain in polarized MDCK cells during ricin-induced apoptosis. *J Biochem* 1999; 126:715-721.
- Ohno M, Cheng CP, Little WC. Mechanism of altered patterns of left ventricular filling during the development of congestive heart failure. *Circulation* 1994;89:2241-50.

- Ohtsuka S, Kakihana M, Doi T, Sugishita Y, Ito I. Effects of acutely impaired regional function on remote myocardial wall motion and blood flow in the canine left ventricle studied by coronary occlusion and hypoxic perfusion. *Cardiovasc Res* 1990; 24: 433-439.
- Okazaki Y, Kodama K, Sato H, Kitakaze M, Hirayama M, Hori M, Inoue M. Attenuation of increased regional myocardial oxygen consumption during exercise as a major cause of warm-up phenomenon. *J Am Coll Cardiol* 1993; 21:1597-1604.
- Oldroyd KG, Chopra M, Rankin AC, Belch J, Cobbe S. Lipid peroxidation during myocardial ischemia induced by pacing. *Br Heart J* 1990; 63:88-92.
- Oostenbrug GS, Mensink R, Bar F, Hornstra G. Lipid peroxidation-associated oxidative stress during percutaneous transluminal coronary angioplasty in humans. *Free Radical Biol* 1997; 22:129-136.
- Orias O. The dynamic changes in the ventricles following ligation of the ramus descendens anterior. *Am J Physiol*, 1932; 100:629-641.
- O'Rourke B, Kass D, Tomaselli G, Kääh S, Tuning R, Marbán E. Mechanisms of altered excitation-contraction coupling in canine tachycardia-induced heart failure. *Circ Res*. 1999; 84:562-570.
- Ottani F, Galvani M, Ferrini D, Sorbello F, Limonetti P, Pantoli D, Rusticali F. Prodromal angina limits infarct size: a role for ischemic preconditioning. *Circulation*. 1995; 91:291-297.
- Packer M. The neurohormonal hypothesis: a theory to explain the mechanism of disease progresión in heart failure. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:248-254.
- Pain T, Yang X-M, Critz CD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial K_{ATP} channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*. 2000; 87:460-466.
- Pallarés V. *Alteraciones en la función y ultraestructura miocárdica inducidas por isquemias repetidas de corta duración*. Directores: Juan Cosín Aguilar, Vicente López Merino. Tesis doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina de Valencia, 1996.

- Pallarés V, Hernández A, Cosín J, Portolés M, Capdevila C, Pomar F, Andrés F. Evolución a lo largo de 10 días de un modelo de miocardio aturdido mediante isquemias muy breves y repetidas. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50:254-259.
- Packer DL, Bardy GH, Worley SJ, Smith MS, Cobb FR, Coleman RE, Gallagher JJ, German LD. Tachycardia-induced cardiomyopathy: a reversible form of left ventricular dysfunction. *Am J Cardiol* 1986; 57: 563-570.
- Packer M, McMurray J, Massie B, Caspi A, Charlon V, Cohen-Solal A, Kiowski W, Kostuk W, Krum H, Levine B, Rizzon P, Soler J, Swedberg K, Anderson S, Demets D. Clinical effects of endothelin receptor antagonism with bosentan in patients with severe chronic heart failure: results of a pilot study. *J Card Fail* 2005; 11:12-20.
- Paradies G, Petrosillo G, Pistolese M, Di Venosa N, Federici A, Ruggiero FM. Decrease in mitochondrial complex I activity in ischemic/reperfused rat heart: involvement of reactive oxygen species and cardiolipin. *Circ Res* 2004; 94:53-59.
- Parks DA, Bulkey G, Granger D. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery* 1983; 94:428.
- Pashkow F, Holland R, Brooks H. Early changes in contractility and coronary blood flow in the normal areas of the ischemic porcine heart. *Am Heart J* 1977; 93:349-357.
- Patel B, Kloner RA, Przyklenk K, Braunwald E. Postischemic myocardial "stunning": a clinically relevant phenomenon. *Ann Intern Med* 1988; 108:626-629.
- Patten R, Aronovitz M, Deras-Mejia L, Pandian N, Hanak G, Smith J, Mendelsohn M, Konstam M. Ventricular remodeling in a mouse model of myocardial infarction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1998; 274:H1812-H1820.
- Peng CF, Davis JL, Murphy ML, Straub KD. Effects of reperfusion on myocardial wall thickness, oxidative phosphorylation, and Ca^{++} metabolism following total and partial myocardial ischemia. *Am Heart J* 1986; 112:1238-1244.
- Pfeffer M, Pfeffer J, Fishbein M, Fletcher P, Spadaro J, Kloner R, Braunwald E. Myocardial infarct size and ventricular function in rats. *Circ Res* 1981; 49:618-626.
- Pfeffer J, Pfeffer M, Braunwald E. Influence of chronic captopril on the infarcted left ventricle of the rat. *Circ Res* 1985; 57:84-95.

- Pfeffer M, Pfeffer J, Steinberg C, Finn P. Survival after an experimental myocardial infarction: beneficial effects of long-term therapy with captopril. *Circulation* 1985; 72:406-412.
- Phillips E, Levine SA. Auricular fibrillation without other evidence of heart disease: a cause of reversible heart failure. *Am J Med* 1949; 7:478-89.
- Ping P, Zhang J, Qiu Y, Tang XL, Manchikalapudi S, Cao X, Bolli R. Ischemic preconditioning induces selective translocation of PKC isoforms ϵ and η in the heart of conscious rabbits without subcellular redistribution of total PKC activity. *Circ Res* 1997; 81:404-414.
- Ping P, Takano H, Zhang J, Tang XL, Qiu Y, Li RC, Banerjee S, Dawn B, Bolli R. Isoform-selective activation of protein kinase C by nitric oxide in the heart of conscious rabbits. *Circ Res*. 1999; 84:587-604.
- Piper HM, García-Dorado D, Ovize M. A fresh look at reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1998; 38:291-300.
- Pizzetti F, Turazza FM, Franzosi MG, Barlera S, Ledda A, Maggioni AP. Incidence and prognostic significance of atrial fibrillation in acute myocardial infarction: The GISSI-3 data. *Heart* 2001; 86:527-32.
- Pleger S, Most P, Boucher M, Soltys S, Chuprun J, Pleger W, Gao E, Dasgupta A, Rengo G, Remppis A, Katus H, Ekhart A, Rabinowitz J, Koch W. Stable myocardial-specific AAV6-S100A1 gene therapy results in chronic functional heart failure rescue. *Circulation* 2007; 115:2506-2515.
- Pomar F, Cosín J, Portolés M, Faura M, Renau J, Hernández. Functional and ultrastructural alterations of canine myocardium subjected to very brief coronary occlusions. *Eur Heart J* 1995; 16:1.482-1.490.
- Pozzoli M, Cioffi G, Traversi E, Pinna G, Cobelli F, Tavazzi L. Predictors of primary atrial fibrillation and concomitant clinical and hemodynamic changes in patients with chronic heart failure: a prospective study in 344 patients with baseline sinus rhythm. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32:197-204.
- Preuss KC, Gross GJ, Brooks HL, Warltier DC. Time course of recovery of "stunned" myocardium following variable periods of ischemia in conscious and anesthetized dogs. *Am Heart J* 1987; 114: 696-703.

- Priebe HJ. Isoflurane causes more severe regional dysfunction than halothane in dogs with a critical coronary artery stenosis. *Anesthesiology* 1998; 69:72-83.
- Priestly J. Experiments and observations on different kinds of air. *Alembic club reprint #7, Vol II, section III, London 1775, pp168-169.*
- Prinzmetal M, Schwartz LL, Corday E, Spritaler R, Bergman HC, Kruger HE. Studies on the coronary circulation: loss of myocardial contractility after coronary artery occlusion. *Ann Int Med* 1949; 31:429-449.
- Prior RL, Cao G. In vivo total antioxidant capacity: comparison of different analytical methods. *Free Radic Biol Med* 1999; 27:1173-1181.
- Przyklenk K, Kloner RA. Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the "stunned myocardium". *Circ Res* 1986; 58:148-156.
- Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic preconditioning protects remote virgin myocardium from subsequent coronary occlusion. *Circulation* 1993; 87:893-899.
- Rajasekaran N, Conell P, Christians S, Yan LJ, Taylor P, Orosz A, Zhang XQ, Stevenson TJ, Peshock RM, Leopold J, Barry W, Loscalzo J, Odelberg S, Benjamin I. Human α B-Crystallin mutation causes oxido-reductive stress and protein aggregation cardiomyopathy in mice. *Cell* 2007; 130:427-439.
- Ramos R, Guisasola MC. 70kDa heat-shock proteins in surgical stress: thoracotomy vs. herniorrhaphy. *Cir Esp* 2010; 88:23-29.
- Rankin JS, McHale PA, Arentzen CE, Ling D, Greenfield JC Jr, Anderson RW. The three-dimensional dynamic geometry of the left ventricle in the conscious dog. *Circ Res* 1976; 39:304-313.
- Rathore S, Berger A, Weinfurt K, Schulman K, Oetgen W, Gersch B. Acute myocardial infarction complicated by atrial fibrillation in the Ederly. *Circulation* 2000; 101:969-74.
- Readfearn DP, Ratib K, Marshall HJ, Griffith MJ. Supraventricular tachycardia promotes release of troponin I in patients with normal coronary arteries. *Int J Cardiol* 2005; 102:521-522.

- Reimer K, Jennings RB. The "wave front phenomenon" of myocardial ischemic cell death, II: transmural progression of necrosis within the frame work of ischemic bed size (myocardium at risk) and collateral flow. *Lab Invest* 1979; 40:633-644.
- Reimer KA, Jennings RB. Total ischemia in dog hearts, *in vitro*. II. High energy phosphate depletion and associated defects in energy metabolism, cell volume regulation and sarcolemmal integrity. *Circ Res.* 1981; 49:901-911.
- Reimer K, Hill ML, Jennings RB. Prolonged depletion of ATP and of the adenine nucleotides pool due to delayed resynthesis of adenine nucleotides following reversible myocardial ischemic injury in dogs. *J Mol Cell Cardiol.* 1981;13:229-239.
- Reiter RJ, Guerrero JM, García JJ, Acuña-Castroviejo D. Reactive oxygen intermediates, molecular damage and aging. Relation to melatonin. *Ann N Y Acad Sci.* 1998; 854:410-424.
- Rigattieri S, Buffon A, Ramazzotti V, Mordente A, Crea F, Maseri A, Giardina B, Santini SA. Oxidative stress in ischemia-reperfusion injury: assessment by three independent biochemical markers. *Ital Heart J* 2000; 1:68-72.
- Rigaud M, Rocha P, Bosch J, Farcot JC, Bardet J, Bourdarias JP. Regional left ventricular function assessed by contrast angiography in acute myocardial infarction. *Circulation* 1979; 68:130-139.
- Rivera JM, Cosín J, Hernández A, Solaz J, Andrés F, Caffarena T, Graullera B. Diferencias regionales en la función contractil del subendocardio y el subepicardio del ventrículo izquierdo en el perro. *Rev Esp Cardiol* 1989a; 42:192-198.
- Rivera JM. *Estudio de la función miocárdica regional en situación basal y durante la isquemia de duración breve. Cardioprotección farmacológica.* Directores: Juan Cosín Aguilar, Vicente López Merino. Tesis Doctoral. Universidad de Valencia, Facultad de Medicina, 1989.
- Rivera JM, Cosín J, Hernández A, Solaz J, Andrés F. Función miocárdica segmentaria durante la isquemia transitoria. Influencia de la orientación fibrilar. El estrato y la zona en el miocardio del perro. *CV World Report* 1989b; 2:127-134.

- Rivero-Ayerza M, Reimer WS, Lenzen M, Theuns D, Jordaens L, Komajda M, Follath F, Swedberg K, Cleland J. New-onset atrial fibrillation is an independent predictor of in-hospital mortality in hospitalized heart failure patients: results of the EuroHeart Failure Survey. *Eur Heart J* 2008; 29:1618-1624.
- Robertson WS, Feigenbaum H, Armstrong WF, Dillon JC, O'Donnell J, McHenry PW. Exercise echocardiography: a clinically practical addition in the evaluation of coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1983; 2:1085-1091.
- Robertson JD, Chandra J, Gogvadze V, Orrenius S. Biological reactive intermediates and mechanisms of cell death. *Adv Exp Med Biol* 2001; 500:1-10.
- Rocha MM, Victor VM. Targeting antioxidants to mitochondria and cardiovascular diseases: the effect of mitoquinona. *Med Sci Monit*, 2007; 13:RA132-145.
- Rockam H, Ross R, Harris A, Knowlton K, Stienhelper M, Field L, Ross J, Chien K. Segregation of atrial-specific and inducible expression of an atrial natriuretic factor transgene in an *in vivo* murine model of cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:8277-8281.
- Rosenberg H, Davis M, James D, Pollock N, Stowell K. Malignant hyperthermia. *Orphanet J Rare Dis* 2007; 2:21.
- Ross J Jr. Dilated cardiomyopathy: concepts derived from gene deficient and transgenic animal models. *Circ J* 2002; 66:219-224.
- Rovetto MJ, Lambertson WF, Neely JR. Mechanisms of glycolytic inhibition in ischemic rat hearts. *Circ Res.* 1975; 37:742-751.
- Rushmer R, Franklin D, Ellis R. Left ventricular dimensions recorded by sonocardiometry. *Circ Res* 1956; 4:684-689.
- Russell RR, Bergeron R, Shulman GI, Young LH. Translocation of myocardial GLUT4 and increased glucose uptake through activation of AMPK by AICAR. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 1999; 277:H643-H649.
- Sabbah H, Stein P, Kono T, Gheorghide M, Levine T, Jafri S, Hawkins E, Goldstein S. A canine model of chronic heart failure produced by multiple sequential coronary microembolizations. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1991; 260:H1379-H1384.

- Sabbah H, Shimoyama H, Kono T, Gupta R, Sharov V, Scicli G, Levine T, Goldstein S. Effects of long-term monotherapy with enalapril, metoprolol and digoxin on the progresión of left ventricular dysfunction and dilatation in dogs with reduced ejection fraction. *Circulation* 1994; 89: 2852-2859.
- Sakai S, Miyauchi T, Kobayashi M, Yamaguchi I, Goto K, Sugishita Y. Inhibition of myocardial endothelin pathway improves long-term survival in heart failure. *Nature* 1996; 384:353-355.
- Sakata K, Kurihara H, Iwamori K, Maki A, Yoshino H, Yanagisawa A. Clinical and prognostic significance of atrial fibrillation in acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology* 1997; 80:1522-1527.
- Sambandam N, Lopaschuk GD. AMP-activated protein kinase (AMPK) control of fatty acid and glucose metabolism in the ischemic heart. *Prog Lipid Res* 2003; 42:238–256.
- Sanada S, Komuro I, Kitakaze M. Pathophysiology of myocardial reperfusion injury: preconditioning, postconditioning, and translational aspects of protective measures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2011; 301:H1723-741.
- Sarnoff SJ, Braunwald E, Welch GH, Case RB, Stainsby WN, Macrutz R. Hemodynamic determinants of oxygen consumption of the heart with special reference to tension-time index. *Am J Physiol.* 1958; 192:148-56.
- Sasayama S, Franklin D, Ross Jr J, Kemper W, McKnown D. Dynamic changes in left ventricular wall thickness and their use in analyzing cardiac function in the conscious dog. *Am J Cardiol* 1976; 38:870-879.
- Sawyer DT, Valentine JS. How super is superoxide? *Acc Chem Res* 1981; 14:393-400.
- Saxena A, Dinh DT, Smith J, Shardey G, Reid C, Newcomb A. Usefulness of postoperative atrial fibrillation as an independent predictor for worse early and late outcomes after isolated coronary artery bypass grafting. *Am J Cardiol* 2012; 109:219–225.
- Schaper W, Jageneau A, Xhonneux R. Development of collateral circulation in the pig and the dog heart. *Cardiologia* 1967; 51:321-335.
- Schaper W, Gorge G, Winkler B, Schaper J. The collateral circulation of the heart. *Prog Cardiovasc Dis.* 1988; 31:57-77.

- Schoonderwoerd BA, Crijns HJ, van Veldhuisen DJ, Boomssma F, van den Berg MP, Bel KJ, van Gelder IC. Atrial natriuretic peptides during experimental atrial tachycardia: role of developing tachymiocardiopathy. *J Cardiovasc Electrophysiol* 2004; 15:927-32.
- Schömig A. Catecholamines in myocardial ischemia. *Circulation* 1990; 82 (suppl II):II-13-II-22.
- Schömig A, Haass M, Richardt G. Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 1991;12 (suppl F): 38-47.
- Schultz JEJ, Rose E, Yao Z, Gross GJ. Evidence for involvement of opioid receptors in ischemic preconditioning in rat hearts. *Am J Physiol* 1995; 268:H2157-H2161.
- Schulz R, Rose J, Sakka S, Wallbridge D, Heusch G. Intraischemic preconditioning. Increased tolerance to sustained low-flow ischemia by a brief episode of no-flow ischemia without intermittent reperfusion. *Circ Res* 1995; 76:942-950.
- Schulz R, Gres P, Heusch G. Role of endogenous opioids in ischemic preconditioning but not in short-term hibernation in pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H2175-81.
- Schwartz LM, Jennings RB, Reimer KA. Premedication with the opioid analgesic butorphanol raises the threshold for ischemic preconditioning in dogs. *Basic Res Cardiol*. 1997; 92:106-114.
- Schroder E, Kieso RA, Laughlin D, Schroder M, Meng R, Kerber RE. Altered response of reperfused myocardium to repeated coronary occlusion in dogs. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10: 898 - 905.
- Segur JR, Galyean JR, Urschel CW, Sonnenblick EH. Experimental myocardial ischemia: dynamic alterations in ventricular contractility and relaxation with dissociation of speed and force in the isovolumic dog heart. *Circ Res*. 1976; 39:602-607.
- Seyle H, Bajusz E, Grasso S, Mendel P. Simple techniques for the surgical occlusion of coronary vessels in the rats. *Angiology* 1960; 11:398-407.
- Shachnow N, Spellman S, Rubin I. Persistent supraventricular tachycardia: case report with review of the literature. *Circulation* 1954; 10:232-236.
- Shadyro OI, Yurkova IL, Kisel MA. Radiation-induced peroxidation and fragmentation of lipids in a model membrane. *Int J Radiat* 2002; 78:211-217.

- Shannon RP, Komamura K, Stambler BS, Bigaud M, Manders WT, Vatner SF. Alteration in myocardial contractility in conscious dogs with dilated cardiomyopathy. *Am J Physiol* 1991; 260:H1903-11.
- Shannon RP, Komamura K, Shen YT, Bishop SP, Vatner SF. Impaired regional subendocardial coronary flow reserve in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 1993; 265:H801-H809.
- Sharma G, Varley K, Kim S, Barwinsky J, Cohen M, Dhalia N. Alterations in energy metabolism and ultrastructure upon reperfusion of the ischemic myocardium after coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1975; 36:234-243.
- Sheiban I, Tonni S, Marini A, et al. Clinical and therapeutic implications of chronic left ventricular dysfunction in coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1995; 75:23E-30E.
- Shen YT, Vatner SF. Mechanism of impaired myocardial function during progressive coronary stenosis in conscious pigs: hibernation versus stunning? *Circ Res* 1995; 73:479-488.
- Shen YT, Vatner SF. Differences in myocardial stunning following coronary artery occlusion in conscious dogs, pigs and baboons. *Am J Physiol* 1996; 270:H1312-H1322.
- Shen YT, Lynch J, Shannon P, Wiedmann R. A novel heart failure model induced by sequential coronary artery occlusions and tachycardia stress in awake pigs. *Am J Physiol* 1999; 277:H388-H398.
- Shimbane JS, Wood MA, Jensen DN, Ellenbogen K, Fitzpatrick A, Scheinman M. Tachycardia-induced cardiomyopathy: A review of animal models and clinical studies. *J Am Coll Cardiol* 1997;29:709-715.
- Shirato K, Ishikawa K, Kanazawa M, Nakajima T, Munakata K, Sakuma M. Effect of pericardium on regional myocardial systolic function in acute ischemia. *Tohoku J Exp Med* 1991; 165:271-282.
- Sies H, Bartoli G, Burk F, Waydhas C. Glutathione efflux from perfused rat liver after phenobarbital treatment during drug oxidations, and in selenium deficiency. *Eur J Biochem* 1978; 89:113-118.

- Simons, J.F., Ferro-Novick, S., Rose, M.D., and Helenius, A. BiP/Kar2p serves as a molecular chaperone during carboxypeptidase Y folding in yeast. *J. Cell Biol.* 1995; 130:41–49.
- Smits J, van Krimpen C, Schoemaker R, Cleutjens J, Daemen M. Angiotensin II receptor blockade alter myocardial infarction in rats: effects on haemodynamics, DNA synthesis and interstitial collagen content. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20:772-778.
- Solaz J, Cosín J, Hernández A, Andrés F, Graullera B, Diago JL. Cambios en la contractilidad regional miocárdica por sobreestimulación ventricular. *Latido* 1991; 3:36.
- Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion. *Biochem J*, 2005; 390:377-94.
- Solomon SB, Glantz SA. Regional ischemia increases sensitivity of left ventricular relaxation to volume in pigs. *Am J Physiol* 1999; 276: H1994-H2005.
- Speechly-Dick ME, Grover GJ, Yellon DM. Does ischemic preconditioning in the human involve protein kinase C and the ATP-dependent k^+ channel? Studies of contractile function after simulated ischemia in an atrial in vitro model. *Circ Res* 1995; 77:1030-1035.
- Spinale FG, Hendrick DA, Crawford FA, Smith AC, Hamada Y, Carabello B. Chronic supraventricular tachycardia causes biventricular failure and subendocardial injury. *Circulation* 1989; 80:II-250.
- Spinale FG, Hendrick DA, Crawford FA, Alison CS, Hamada Y, Carabello B. Chronic supraventricular tachycardia causes ventricular dysfunction and subendocardial injury in swine. *Am J Physiol.* 1990; 259:H218-H229.
- Spinale FG, Tomita M, Zellner JL, Cook JC, Crawford FA, Zile MR. Collagen remodeling and changes in LV function during development and recovery from supraventricular tachycardia. *Am J Physiol* 1991a; 261:H308-H318.
- Spinale FG, Zellener JL, Tomita M, Tempel G, Crawford F, Zile MR. Tachycardia-induced cardiomyopathy: effects on blood flow and capillary structure. *Am J Physiol* 1991b; 261:H140-H148.

- Spinale FG, Grine RC, Tempel GE, Crawford FA, Zile MR. Alterations in the myocardial capillary vasculature accompany tachycardia-induced cardiomyopathy. *Basic Res Cardiol* 1992; 87:65-79.
- Spinale FG, Ishira K, Zile M, DeFryte G, Crawford F, Carabello B. Structural basis for changes in left ventricular function and geometry because of chronic mitral regurgitation and after correction of volume overload. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1993; 106:1147-1157.
- Spinale FG, de Gasparo M, Whitebread S, Hebbar L, Clair M, Melton D, Krombach R, Mukherjee R, Iannini J. Modulation of the renin-angiotensin pathway through enzyme inhibition and specific receptor blockade in pacing-induced heart failure: I. Effects on left ventricular performance and neurohormonal systems. *Circulation* 1997; 96:2385-2396.
- St. Louis JD, Hughes GC, Kypson AP, DeGrado TR, Donovan, CL, Coleman RE, Yin B, Steenbergen C, Landolfo KP, Lowe JE. An experimental model of chronic myocardial hibernation. *Ann Thorac Surg* 2000; 69:1351-1357.
- Steenbergen C, Murphy E, Levy L, London RE. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in reperfused rat heart. *Circ Res* 1987; 60:700-707.
- Streeter DD Jr, Spotnitz HM, Patel DP, Ross J Jr, Sonnenblick EH. Fiber orientation in the canine left ventricle during diastole and systole. *Circ Res* 1969; 24:339-347.
- Stanley W, Morgan E, Huang H, McElfresh, Sterk J, Okere I, Chandler M, Cheng J, Dyck J, Lopaschuck G. Malonyl-Coa decarboxylase inhibition suppresses fatty acid oxidation and reduces lactate production during demand-induced ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289:H2304-H2309.
- Sun JZ, Kaur H, Halliwell B, Li X-Y, Bolli R. Use of aromatic hydroxylation of phenylalanine to measure production of hydroxyl radicals after myocardial ischemia in vivo: direct evidence for a pathogenic role of the hydroxyl radical in myocardial stunning. *Circ Res* 1993; 73:534-549.
- Suzuki Y, Yeung A, Ikeno F. The representative porcine model for human cardiovascular disease. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:1-10. Electronic paper.
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3022214/>>

- Tanaka R, Spinale FG, Crawford FA, Zile MR. Effect of chronic supraventricular tachycardia on left ventricular function and structure in new born pigs. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20:1650-1660.
- Takano H, Manchikalapudi S, Tang X-L, Qiu Y, Rizvi A, Jadoon A, Zhang Q, Bolli R. Nitric oxide synthase is the mediator of late preconditioning against myocardial infarction in conscious rabbits. *Circulation* 1998; 98:441-449.
- Takano H, Bolli R, Black RG, Kodani, E, Tang X-L, Yang Z, Bhattacharya S, Auchampach JA. A₁ or A₃ adenosine receptors induce late preconditioning against infarction in conscious rabbits by different mechanisms. *Circ Res.* 2001; 88:520-528.
- Tallaj J, Wei C, Hanks G, Holland M, Rynders P, Dillon A, Ardell J, Armour J, Lucchesi P, Dell'Italia L. Beta 1-adrenergic receptor blockade attenuates angiotensin II-mediated catecholamine release into the cardiac interstitium in mitral regurgitation. *Circulation* 2003; 108:225-230.
- Tatooles CJ, Randall WC. Local ventricular bulging after acute coronary occlusion. *Am J Physiol* 1961; 201: 451-456.
- Tavazzi B, Di Pierro D, Bartolini M. Lipid peroxidation, tissue necrosis and metabolic and mechanical recovery of isolated reperfused heart rat as a function of increasing ischemia. *Free Radic Res* 1998; 28:25-37.
- Téllez F, Carvajal K, García C, Vasquez C, Chávez E, Moreno-Sánchez R. Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y reperfusión en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex* 1996; 66:162-187.
- Tennant R, Wiggers CJ. The effect of coronary occlusion on myocardial contraction. *Am J Physiol*, 1935; 112:351-361.
- Theroux P, Franklind D, Ross J Jr, Kemper WS. Regional myocardial function during acute coronary artery occlusion and its modification by pharmacologic agents in the dog. *Circ Res* 1974; 35:896-908.
- Theroux P, Ross J Jr, Franklin D, Kemper WS, Sasayama S. Regional myocardial function in the conscious dog during acute coronary occlusion and responses to morphine, propranolol, nitroglycerin, and lidocaine. *Circulation* 1976; 53: 302-314.

- Theroux P, Ross J, Franklin D, Cowell JW, Bloor CM, Sasayama S. Regional myocardial function and dimensions early and late after myocardial infarction in the unanesthetized dog. *Circ Res* 1977; 40:158-165.
- Tomoike H, Franklin D, Ross J. Detection of myocardial ischemia by regional dysfunction during and after rapid pacing in conscious dogs. *Circulation* 1978; 58:48-56.
- Tomioka H, Liakopoulos OJ, Buckberg GD, Hristov N, Tan Z, Trummer G. The effect of ventricular sequential contraction on helical heart during pacing: high septal pacing versus biventricular pacing. *Eur J Cardiothorac Surg* 2006; 29 (suppl I):S198-206.
- Tong V, Teng X, Chang T, Abbott F. Valproic acid I: time course of lipid peroxidation biomarkers, liver toxicity, and valproic acid metabolite levels in rats. *Tox Sci* 2005; 86:427-435.
- Torrent-Guasp F, Kocica MJ, Corno AF, Komeda M, Carreras-Costa F, Flotats A, Cosin-Aguilar J, Wen H. Towards new understanding of the heart structure and function. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2005; 27:191-201.
- Transonic® T106/T206 Series. Manual's operator. < http://www.artisan-scientific.com/info/transonic_systems_t106_t206_operators_manual.pdf>.
- Triana JF, Li XY, Jamaluddin U, Thornby JI, Bolli R. Postischemic myocardial "stunning". Identification of major differences between the open-chest and the conscious dogs and the evaluation of the oxygen radical hypothesis in the conscious dog. *Circ Res* 1991; 69:731-747.
- Tripp HF, Lewis W, Veronee C, Damiano RJ, German LD, Lowe JE. Effects of acute tachycardia on left ventricular adenine nucleotide levels and subsequent tolerance to ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986; 92:931-935.
- Trotter EW, Grant CM. Thioredoxins are required for protection against a reductive stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* 2002; 46:869-878.
- Tsoukas A, Ikonomidis J, Cokkinos P, Nihoyannopoulos P. Significance on persistent left ventricular dysfunction during recovery after after dobutamine stress echocardiography. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30:621-626.

- Tsutsui H, Spinale F, Nagatsu M, Schmid P, Ishibara K, DeFreyte G, Cooper G, Carabello B. Effects of chronic beta-adrenergic blockade on the left ventricular and cardiocyte abnormalities of chronic canine mitral regurgitation. *J Clin Invest* 1994; 93:2639-2648.
- Tumbleson ME. *Swine in biomedical research*. New York and London: Plenum Press, 1986.
- Tyberg JV, Yeatman LA, Parmley WW, Urschel CW, Sonnenblick EH. Effects of hypoxia on mechanics of cardiac contraction. *Am J Physiol*, 1970; 218:1780-1788.
- Uchida Y, Yoshimoto N, Murau S. Cyclic fluctuations in coronary blood pressure and flow induced by coronary constriction. *Jpn Heart J* 1975; 16: 454-464.
- Vater ST, Heyndrickx GR, Fallon JT. Effects of brief periods of myocardial ischemia on regional myocardial function and creatinine kinase release in conscious dogs and baboons. *Can J Cardiol* 1986; suppl A:19-24.
- Vanoli E, Bacchini S, Panigada S, Pentimalli F, Admason P. Experimental models of heart failure. *Eur Heart J* 2004; 6:F7-F15.
- Vatner DF, Braunwald E. Cardiovascular control mechanisms in the conscious state. *N Engl J Med* 1975; 293:970-6.
- Vegh A, Szekeres L, Parratt JR. Transient ischaemia induced by rapid cardiac pacing results in myocardial preconditioning. *Cardiovasc Res*. 1991; 25:1051-1053.
- Verdouw P, van den Doel M, Zeeuw S, Duncker D. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998; 39:121-135.
- Vilahur G, Padro T, Badimon L. Atherosclerosis and thrombosis: insights from large animal models. *J Biomed Biotechnol* 2011; 2011:article id 907575.
- Villar F, Banegas JR, Donado J, Rodríguez F. Las enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en España: hechos y cifras. Informe SEA 2007. <http://www.searteriosclerosis.org/resources/archivosbd/clinica_investigacion/4d34a5f3ab9cb226e076bb3b11abf587.pdf>
- Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61:481-97.

- Von Sonntag C. *The chemicals basis of radiation biology*. London: Taylor & Francis, 1987. 515 p. ISBN 085066375X
- Wagner B, Buettner G, Burns P. Free radical-mediated lipid peroxidation in cells: oxidizability is a function of cell lipid bis-allylic hydrogen content. *Biochemistry* 1994; 33:4449.
- Wall TM, Sheehy R, Hartman JC. Role of bradycinina in myocardial preconditioning. *J Pharmacol Exp Ther*. 1994; 47:727-749.
- Walker DM, Walker JM, Pugsley WB, Pattison CW, Yellon DM. Preconditioning in isolated superfused human muscle. *J Mol Cell Cardiol*. 1995; 27:1349-1357.
- Wang Y, Benedict WJ, Hüser J, Samarel A, Blatter L, Lipsius S. Brief rapid pacing depresses contractile function via Ca²⁺/PKC-dependent signalling in cat ventricular myocytes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280:H90-H98.
- Weaver M, Pantely G, Bristow J, Ladley H. A quantitative study of the anatomy and distribution of coronary arteries in swine in comparison with other animals and man. *Cardiovasc Res* 1986; 20:907-917.
- Weber K, Janicki J, Pick R, Abrahams C, Shroff S, Bashey R, Chen R. Collagen in the hypertrofied, pressure-overload myocardium. *Circulation* 1987; 75:140-147.
- Wei K, Jyaweera A, Firoozan S, Linka A, Skyba D, Kaul S. Quantification of myocardial blood flow with ultrasound-induced destruction of microbubbles administered as a constant venous infusion. *Circulation* 1998; 97:473-483.
- Weinberg E, Schoen F, George D, Kagaya Y, Douglas P, Litwin S, Schunkert H, Benedict C, Lorell B. Angiotensin-converting enzyme inhibition prolongs survival and modifies the transition to heart failure in rats with pressure overload hypertrophy due to ascending aorta stenosis. *Circulation* 1994; 90:1410-1422.
- Weiner JM, Apstein CS, Arthur JH, Pirzada FA, Hood WB. Persistence of myocardial injury following brief periods of coronary occlusion. *Cardiovasc Res* 1976; 10: 678-686.
- Wells W, Xu D, Yang Y, Rocque P. Mammalian thioltransferase (glutaredoxin) and protein disulfide isomerase have dehydroascorbate reductase activity. *J Biol Chem*, 1990; 265:361-64.

- Whipple GH, Sheffield LT, Woodman EG, Theophilis C, Friedman S. Reversible congestive heart failure due to chronic rapid stimulation of the normal heart. *Proc N Engl Cardiovasc Soc* 1962; 20:39-40.
- White F, Roth D, Bloor C. The pig as a model for myocardial ischemia and exercise. *Lab Anim Sci* 1986; 36:351-356.
- White JL, Myers AK, Analouei A, Kim YD. Functional recovery of stunned myocardium is greater with halothane than fentanyl anaesthesia in dogs. *Br J Anaesth* 1994; 73:214-219.
- Wijns W, Serruys PW, Slager CJ, Grimm J, Kragenbuehl HP, Hugenholtz PG, Hess OM. Effect of coronary occlusion during percutaneous transluminal angioplasty in humans on left ventricular chamber stiffness and regional diastolic pressure radius relations. *J Am Coll Cardiol* 1986; 7:455-461.
- Wijns W, Vatner SF, Camici PG. Hibernating myocardium. *N Engl J Med*. 1998; 339:173-181.
- Williamson J, Safer B, Rich T, Schaffer S, Kobayashi K, Effects of acidosis on myocardial contractility and metabolism. *Acta Med Scand Suppl* 1976; 587:95-112.
- Winckler BS. In vitro oxidation of ascorbic acid and its prevention by GSH. *Biochim Biophys Acta*, 1987; 925:258-264.
- Wyatt HL, Forrester JS, DaLuz PL, Diamond GA, Chagrasulis R, Swan HJC. Functional abnormalities in nonoccluded regions of myocardium after experimental coronary occlusion. *Am J Cardiol* 1976; 37: 366-372.
- Wynsen J, Kenny D, Brooks H, Wartier D. Regional myocardial function after repetitive brief episodes of ischemia: effect of altering the duration of reperfusion period. *Am Heart J* 1991; 121:1331-1338.
- Yamamoto Y, Brodsky M, Baker J. Detection and characterization of lipid hydroperoxides at picomole levels. *Anal Biochem* 1987; 160:7-13.
- Yamamoto T, Tomo T, Okabe E, Namoto S, Suzuki K, Hirao Y. Glutathione depletion as a mechanism of 3,4-dideoxyglucosone-3-ene-induced cytotoxicity in human peritoneal mesothelial cells: role in biocompatibility of peritoneal dialysis fluids. *Nephrol Dial Transplant* 2009; 24:1436-1442.

- Yanasigawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent constrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 1988; 332:411-415.
- Yao Z, Cavero I, Gross GJ. Activation of cardiac K_{ATP} channels: an endogenous protective mechanism during repetitive ischemia. *Am J Physiol*. 1993; 264:H495-H504.
- Yellon DM, Alkhulaifi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993; 342:276-277.
- Yellon D, Dana A. The preconditioning phenomenon: a tool for the scientist or a clinical reality? *Circ Res* 2000; 87:543-550.
- Yellon D, Downey J. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev* 2003; 83:1113-1151.
- Young A, Orr R, Samill B, Dell'Italia L. Three-dimensional changes in left and right geometry in chronic mitral regurgitation. *Am J Physiol* 1996; 271:H2689-H2700.
- Yu, BP. Cellular defenses against damage from reactive oxygen species. *Physiol Rev*, 1994; 74:139-162.
- Zahn R, Schiele R, Schneider S, Gitt AK, Seidl K, Bossaller C et al, for the Myocardial Infarction Registry Study Group. Effect of preinfarction angina pectoris on outcome in patients with acute myocardial infarction treated with primary angioplasty. *Am J Cardiol* 2001; 87:1-6.
- Zatz M, Starling A. Calpains and disease. *N Engl J Med* 2005; 352:2413-2423.
- Zbinden G, Bagdon R. Isoproterenol-induced heart necrosis, an experimental model for the study of angina pectoris and myocardial infarct. *Rev Can Biol* 1963; 22:257-263.
- Zehender M, Faber T, Meinertz T, Just H. Clinical evidence for the fatal interaction of ventricular tachyarrhythmias, myocardial ischemia and sudden cardiac death. *Herz* 1995; 20:187-199.
- Zeng L, Hu Q, Wang X, Mansoor A, Lee J, Feygin J, Zhang G, Boozer S, Zhang J. Bioenergetic and functional consequences of bone marrow-derived multipotent progenitor cell transplantation in hearts with postinfarction left ventricular remodelling. *Circulation* 2007; 115:1866-1875.

- Zhang T, Maier L, Dalton N, Miyamoto S, Ross J, Bers D, Brown J. The (δ) C isoform of CaMKII is activated in cardiac hypertrophy and induces dilated cardiomyopathy and heart failure. *Circ Res* 2003; 92:912-919.
- Zhao M, Zhang H, Robinson TF, Factor SM, Sonnenblick EH, Eng C. Profound structural alterations of the extracellular collagen matrix in postischemic ("stunned") but viable myocardium. *J Am Coll Cardiol* 1987; 10:1322-1338.
- Zhao M, Sonnenblick EH, Zhang H, Eng C. Increase in myofilament separation in the stunned myocardium. *J Moll Cell Cardiol* 1992; 24: 1.143-1.154.
- Zhu W, Myers M, Hartley C, Roberts R, Bolli R. Validation of a single crystal for measurements of transmural and epicardial thickening. *Am J Physiol* 1986; 251:H1045-55.
- Zolotareva A, Kogan M. Production of experimental occlusive myocardial infarction in mice. *Cor Vasa* 1978; 20:308-314.
- Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfused heart: evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem* 1988; 263:1353-7.

The first part of the document discusses the importance of maintaining accurate records in a business setting. It highlights how proper record-keeping can help in decision-making, legal compliance, and financial management. The text emphasizes that records should be organized, up-to-date, and easily accessible.

Next, the document addresses the challenges of data management in the digital age. It notes that while digital storage offers convenience, it also introduces risks such as data loss, security breaches, and information overload. Solutions like cloud storage, encryption, and regular backups are suggested to mitigate these risks.

The third section focuses on the role of technology in streamlining business processes. It describes how automation and software tools can reduce manual errors, save time, and improve overall efficiency. Examples include using accounting software for invoicing and project management tools for task delegation.

Finally, the document concludes by stressing the need for continuous learning and adaptation. As technology and market conditions evolve, businesses must stay informed and be willing to adopt new practices to remain competitive and successful.