



HAL
open science

Evolución mecánico-energética del músculo cardíaco durante la isquemia y la reperfusión

Alejandro N. Mazzadi

► **To cite this version:**

Alejandro N. Mazzadi. Evolución mecánico-energética del músculo cardíaco durante la isquemia y la reperfusión. Life Sciences [q-bio]. Universidad de Buenos Aires, 1997. Español. NNT: . tel-00005447

HAL Id: tel-00005447

<https://theses.hal.science/tel-00005447>

Submitted on 23 Mar 2004

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES**

**EVOLUCION MECANICO-ENERGETICA DEL MUSCULO CARDIACO
DURANTE LA ISQUEMIA Y LA REPERFUSION**

**Tesis para optar al Doctorado de la Universidad de Buenos Aires
en Ciencias Biológicas**

ALEJANDRO NOEL MAZZADI

Director: Prof. Dr. Alberto Carlos Taquini.

Co-director: Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos

**Instituto de Investigaciones Cardiológicas
Facultad de Medicina (Universidad de Buenos Aires)**

Buenos Aires (Argentina), 1997.

**UNIVERSITY OF BUENOS AIRES
FACULTY OF SCIENCES**

**MECHANIC-ENERGETIC EVOLUTION OF CARDIAC MUSCLE
DURING ISCHEMIA AND REPERFUSION**

**Thesis to apply to the Ph. D. of University of Buenos Aires
in Biological Sciences**

ALEJANDRO NOEL MAZZADI

Director: Prof. Dr. Alberto Carlos Taquini.

Co-director: Dr. Jorge Emilio Ponce-Hornos

**Institute of Cardiological Research
Faculty of Medicine (University of Buenos Aires)**

Buenos Aires (Argentina), 1997.

Evolución mecánico-energética del músculo cardíaco durante la isquemia y la reperfusión.

Se estudió la producción de calor (**Ht**) y evolución mecánica en ventrículos de rata estimulados electricamente a 1.5 Hz, perfundidos según la Técnica de Langendorff y sometidos a 45 min de isquemia (**Isq**) y 45 min de reperfusión (**Rep**). La influencia de la temperatura se evaluó a 25, 30 y 35 °C. Los 4 componentes diferenciables del calor activo (H1, H2, H3 y H4) (Ponce-Hornos y col, Pflugers Arch-Eur J Physiol 429; 1995) se analizaron en contracciones aisladas en los 10 primeros min de Isch. Los músculos se montaron en un calorímetro (Ponce-Hornos y col, Am. J. of Physiol. 243; 1982) que permitió medir Ht y simultáneamente la presión desarrollada en condiciones isovolúmicas (**P**) y la presión de reposo (**PR**).

A partir de los estudios realizados fue posible descartar procesos que fueron postulados como responsables de la falla cardíaca isquémica e involucrar en medida apropiada a otros. Entre los primeros, fue posible descartar la caída del pH y los cambios en la energía libre del ATP como responsables en etapas muy tempranas. También pudo disociarse la caída de la P respecto de la desaparición de un componente mitocondrial Ca⁺⁺ dependiente (H4). Entre los segundos, se identificó un evento energético durante la Isch de alto valor predictivo de la disfunción mecánica y/o daño durante la Rep. También, los experimentos dan apoyo a los cambios en la PR como responsables de la abrupta caída en la P al inicio de la Isch. Además, fue posible vincular a la interacción actomiosínica con la mayor fracción de liberación de energía en el período inicial de la Rep. También se asoció la baja recuperación mecánica durante la Rep con altos valores relativos de calor independiente de tensión.

Palabras llave: músculo cardíaco - isquemia - reperfusión - microcalorimetría

Mechanic-energetic evolution of cardiac muscle during ischemia and reperfusion

Total heat production and mechanical evolution were studied in electrically stimulated (1.5 Hz) rat's ventricles perfused by Langendorff technique and subjected to ischemia (**Isch**) and reperfusion (**Rep**) (45 min both). Temperature effect was evaluated at 25, 30 and 35 °C. Four identified active heat components from a single contraction (H1, H2, H3 and H4) (Ponce-Hornos et al, Pflugers Arch-Eur J. Physiol 429;1995) were analyzed during the first 10 min of isch. Resting (**RP**) and developed pressure (**P**) and total heat production (**Ht**) were simultaneously measured on isovolumetric hearts placed in a calorimeter (Ponce-Hornos et al, Am J. of Physiol 243;1982).

From these results a fall in pH, as well as changes in ATP free energy, were discarded as possible causes of cardiac failure after early isch. Also, the fall in developed pressure was dissociated from the Ca-dependent mitochondrial component (H4). An energetic event was identified during the ischemic phase which was highly related with the mechanical failure during reperfusion. And the other hand, these experiments suggest that changes in RP are responsible for the brisk fall in P at the beginning of the isch. Even more, the main fraction of released energy during the beginning of Rep was associated to actomyosin interaction. Finally, the small mechanical recovery during Rep was related with high relative values of tension independent heat.

Key words: cardiac muscle - ischemia - reperfusion - microcalorimetry

Agradecimientos

- A mi director y co-director de Tesis, los Dres Alberto C. Taquini y Jorge E. Ponce-Hornos, quienes desde distintos enfoques y situaciones me brindaron su apoyo y conocimientos.

- A las Dras Patricia Bonazzola y Alicia Consolini, por su amistad e invaluable asistencia.

- A Eleonora, María Teresa, Natalia y Patricita, de las que recibí mucha colaboración.

- A Silvina, Carlitos y Catalino, por el aguante.

- A todos mis compañeros del Instituto de Investigaciones Cardiológicas (UBA).

Dedicado a la memoria del Dr. Carlos María Taquini

Lista de abreviaturas y símbolos

min: minuto

s: segundo

ms: milisegundo

°C: grado centígrado

Hz: hertz

mm: milímetro

mN: milinewton

g: gramo

mJ: milijoule

mW: miliwatt

uW: microwatt

mV: milivoltio

uV : microvoltios

t: tiempo

t_{50} : tiempo en el que se alcanza la mitad de un valor dado

tg: tangente

Q_{10} : índice de cambio de una variable con la temperatura

r: índice de correlación

pH: $-\log [H^+]$

ml: milímetro

mM: milimolar

uM: micromolar

mmol: milimol

umol: micromol

Ca⁺⁺: ión calcio

Mg⁺⁺: ión magnesio

Na⁺: ión sodio

K⁺: ión potasio

H⁺: ión hidrógeno

O₂: oxígeno molecular

CO₂: dióxido de carbono

RS: retículo sarcoplásmico

VI: ventrículo izquierdo

TnC: troponina C

FAE: fosfatos de alta energía

CrP: creatina fosfato

Pi: fósforo inorgánico

ATP: adenosina trifosfato

ADP: adenosina difosfato

RMN: resonancia magnética nuclear

Ht: potencia total liberada por un músculo contrayéndose

Hr: potencia liberada por un músculo en reposo

Ha: potencia liberada por la actividad contráctil del músculo

H1: componente de calor de una contracción asociado a la unión de calcio a sitios intracelulares

H2: componente de calor de una contracción asociado a la remoción de calcio y homeostasis iónica

H3: componente de calor de una contracción asociado a la actividad actomiosínica

H4: componente de calor de una contracción asociado a los movimientos mitocondriales de calcio

P: presión desarrollada

P_{max} : máxima presión desarrollada

PR: presión de reposo

+P: máxima velocidad de contracción

-P: máxima velocidad de relajación

tc1: tiempo desde el inicio de la contracción hasta +P

tc2: tiempo desde +P hasta P_{max}

tr1: tiempo desde P_{max} hasta -P

tr2: tiempo desde -P hasta el final del ciclo contráctil

Isq: isquemia

Rep: reperusión

Eco: economía para el desarrollo de presión evaluada como P_{max}/Ht

F_s: factor de calibración del calorímetro en condiciones de ausencia de perfusión

F_h: factor de calibración del calorímetro con perfusión

Codo: inflexión en la evolución de Ht durante la Isq

Per_{in}: período inicial en la evolución de Ht durante la Isq

Per_{tar}: período tardío en la evolución de Ht durante la Isq

P_{inf}: punto de inflexión en la evolución de la Eco

Val_{max}: valor alcanzado por Ht al inicio de la Rep

H_{estab}: valor medio alcanzado por Ht con posterioridad al Val_{max}

pico: valor alcanzado por la PR al inicio de la Rep

C1: componente rápido de la caída de la P_{max} durante la Isq

C2: componente lento de la caída de la P_{max} durante la Isq

C25: grupo de experimentos a 25 °C (bajo estimulación estacionaria)

C30: grupo de experimentos a 30 °C (bajo estimulación estacionaria)

C35: grupo de experimentos a 35 °C (bajo estimulación estacionaria)

INDICE GENERAL

<u>Introducción</u>	10- 39
A. Energética cardíaca	11- 26
1. Aspectos generales	11- 17
a) Evaluaciones energéticas del músculo cardíaco (enfoque mecánico)	12
b) Evaluaciones energéticas del músculo cardíaco (enfoque químico)	12-16
c) Evaluaciones energéticas del músculo cardíaco (enfoque biofísico)	16-17
2. Antecedentes históricos de los estudios miotérmicos	17- 18
3. Métodos miotérmicos	18 - 22
a) Método de la diferencia de temperatura arterio-venosa	19
b) Método de las termopilas	20 - 21
c) Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos.	21 - 22
4. Componentes energéticos del músculo cardíaco	22
a) Metabolismo basal	22 - 23
b) Metabolismo activo	24 - 26
b-1) Componentes del calor activo: estudios clásicos	25 - 26
B. Isquemia y reperfusión cardíacas	27 - 39
1. Aspectos generales	27 - 30
2. Eventos metabólicos durante la isquemia y reperfusión cardíacas	31 - 39
a) Fosfatos de alta energía durante la isquemia y reperfusión cardíacas	32 - 34
b) Acidosis durante la isquemia y reperfusión cardíacas	34 - 35
c) Control del Ca ⁺⁺ durante la isquemia y reperfusión cardíacas	35 - 37
3. Evaluaciones calorimétricas durante la isquemia y reperfusión cardíacas	37 - 39
<u>Objetivos</u>	40 - 42
<u>Materiales y Métodos</u>	43 - 58

1. Preparación biológica	44 - 45
2. Mediciones miotérmicas y mecánicas simultáneas	45 - 50
3. Soluciones	51
4. Estadística	51 - 52
5. Protocolos experimentales bajo estimulación estacionaria	52 - 53
6. Estudios del calor de reposo (Hr)	53 - 54
7. Estudio de las contracciones aisladas	55 - 58
<u>Resultados</u>	59 -99
1. Isquemia	61 - 87
a) Evolución mecánica durante la isquemia	61 - 71
b) Evolución miotérmica durante la isquemia	72 - 75
c) Evolución del calor de reposo (Hr) durante la isquemia	76 - 77
d) Interrelación mecánico-energética durante la isquemia	78 - 83
e) Contracciones aisladas durante la isquemia	84 - 87
2. Reperusión	88 -99
a) Evolución mecánica durante la reperusión	88 - 90
b) Evolución miotérmica durante la reperusión	90 -95
c) Interrelación mecánico-energética durante la reperusión	96-99
<u>Discusión</u>	100-119
1. Aspectos generales	101-102
2. Evolución mecánico-energética durante la isquemia en presencia de actividad contráctil.	102-110
3. Evolución mecánico-energética durante la isquemia en ausencia de actividad contráctil	110-116
4. Evolución mecánico-energética durante la reperusión	116-119
<u>Sumario</u>	120-124
<u>Bibliografía</u>	125-137

Introducción

A. ENERGETICA CARDIACA

1. Aspectos Generales

El tejido muscular posee componentes subcelulares que están específicamente organizados para convertir grandes cantidades de energía química en trabajo y calor. Las fuentes inmediatas de energía química en el metabolismo muscular son la hidrólisis de ATP y Creatina fosfato. Por su parte, la oxidación de sustratos como hidratos de carbono, ácidos grasos y lactato, es la encargada de mantener, en estado estacionario, los niveles de estos compuestos con enlaces fosfato de alta energía (1).

El músculo cardíaco, bajo condiciones normales de provisión de oxígeno, produce la mayor parte del ATP por fosforilación oxidativa. En efecto, los ácidos grasos no esterificados solo pueden ser utilizados para la generación de energía a través de procesos oxidativos aeróbicos, y lo mismo ocurre con las proteínas, via los aminoácidos. Asimismo, la mayor parte del piruvato proveniente de la oxidación de los hidratos de carbono ingresa al ciclo de los ácidos tricarbónicos (1). Una reducción en el aporte de oxígeno al miocardio induce una serie de profundas alteraciones (2). Entre ellas, las metabólicas desencadenan un gran número de eventos que, finalmente, determinan el grado de daño asociado a la privación de oxígeno. Por ejemplo, el metabolismo de los hidratos de carbono durante la hipoxia y la isquemia se encuentra alterado. Se observó una sustancial translocación de moléculas Glut 4 (el principal transportador de glucosa al corazón) hacia la membrana plasmática del miocito, lo que aumenta la captación de glucosa y el metabolismo de la misma (3). Además, existe un

aumento de la glucogenolisis y parte del piruvato es desviado hacia la producción de lactato (4). Junto con los cambios metabólicos desencadenados, debe tenerse en cuenta que la deficiencia en el aporte de oxígeno al miocardio afecta la producción de la energía necesaria no solo para mantener la actividad contráctil sino la viabilidad celular (2).

Debido a que el músculo cardíaco debe desarrollar una actividad ininterrumpida, la energía química utilizada durante el evento contráctil no puede ser recuperada aeróbicamente una vez finalizado el mismo. Como consecuencia, la restauración de los niveles de ATP y de Creatina fosfato consumidos debe realizarse rápidamente y en gran medida durante la misma contracción. Es decir, en el corazón existe una superposición temporal entre el consumo y la restauración de los niveles de energía química. Esta es una característica diferencial respecto del músculo esquelético, en el que se verifica una clara separación temporal entre los eventos ligados a la utilización de la energía química y aquéllos ligados su recuperación. Este hecho se hace más evidente a temperaturas inferiores a 20 °C (5;6;7).

El comportamiento del músculo cardíaco como transductor de energía puede ser analizado experimentalmente utilizando varios enfoques que, para su exposición, pueden agruparse en mecánicos, químicos y biofísicos.

a) Evaluación energética del músculo cardíaco según un enfoque mecánico: se basa en el estudio de mediciones mecánicas como fuerza o tensión desarrollada, integral presión-tiempo, velocidades de contracción y de relajación, velocidad de acortamiento etc. A este tipo de medición pueden agregarse los cálculos de trabajo externo realizado por el músculo en los casos en que corresponda (8;9;10).

b) Evaluación energética del músculo cardíaco según un enfoque químico: se basa fundamentalmente en la aplicación de mediciones químicas. Entre ellas las más destacables son: consumo de moléculas con enlace fosfato de alta energía como ATP y Creatina fosfato, consumo de oxígeno, consumo de glucosa y lactato, producción de ácido láctico etc (11;12;13).

Las mediciones de moléculas con enlace fosfato de alta energía mediante técnicas bioquímicas es un método extensamente empleado no solo para la evaluación de situaciones experimentales (14;15) sino también clínicas (16). También existe gran cantidad de trabajos en relación a la concentración de estas moléculas en modelos experimentales de isquemia y reperfusión cardíacas (17;18). Sin embargo, el carácter discontinuo de estas mediciones impide correlacionarlas con los eventos de rápida evolución temporal que ocurren en el músculo bajo dichas condiciones. Además, estas mediciones bioquímicas no pueden realizarse en el tejido intacto lo cual impide que, en forma simultánea, se realicen otro tipo de mediciones (por ejemplo, mecánicas o de intercambio iónico). Es decir, que se trata de un método invasivo y discontinuo. Por otro lado, la evaluación energética del músculo cardíaco a partir de los niveles tisulares de fosfatos de alta energía a veces resulta dificultosa. Esto se debe al hecho de que el ATP consumido por el miocardio es continuamente repuesto a partir de la glicólisis, la fosforilación oxidativa y la creatina fosfato (1). En consecuencia, la evaluación energética a partir de los niveles de ATP requiere la simultánea evaluación del estado de estos procesos.

El método usado para evaluar el consumo de oxígeno miocárdico involucra, al igual que para la determinación de la tasa de extracción de cualquier sustrato, la medición del flujo coronario y del contenido de oxígeno en el líquido de perfusión

arterial y venoso (19). La diferencia arterio-venosa en el contenido de oxígeno multiplicada por el flujo coronario da como resultado la tasa de consumo de oxígeno, la que usualmente es normalizada por el peso del ventrículo izquierdo. En el músculo cardíaco, la precarga determina el grado de estiramiento de la fibra, mientras que la poscarga se relaciona con la resistencia contra la cual el músculo debe realizar trabajo. Los primeros trabajos sobre consumo de oxígeno miocárdico fueron publicados en 1912 por E. Rhode y mostraron la relación existente entre el consumo de oxígeno y las condiciones de carga de presión (precarga y poscarga) en corazones perfundidos (20). Actualmente se acepta ampliamente que los principales factores que afectan el consumo de oxígeno miocárdico son no sólo las condiciones de carga sino también la frecuencia (21). En preparaciones tisulares aisladas y perfundidas, por lo tanto, el método se aplica manteniendo controladas la frecuencia de estimulación, el volumen diastólico final y el caudal de perfusión. En el corazón "in situ" se suma a estos factores la necesidad del control de la poscarga (22). La metodología de medición de consumo de oxígeno también se ha aplicado a células aisladas midiendo directamente la concentración de oxígeno en el líquido que baña las células (23). Lamentablemente, esta metodología - células aisladas - ha rendido valores basales o controles extremadamente dispersos que aparentemente estarían en relación con el grado de agitación del medio (24).

En relación al consumo de oxígeno como herramienta para evaluar energeticamente al músculo deben puntualizarse varios aspectos. En principio puede decirse que, aunque no es una medida directa de las transformaciones de energía en el miocardio, mantiene - bajo ciertas condiciones - una buena correlación con las mismas. Esta correlación es de fundamental importancia para la correcta evaluación

energética del músculo cardíaco y fué avalada por experimentos llevados a cabo por Drake y col (25). En 1982, estos investigadores observaron que, en corazones arterialmente perfundidos con lactato en el líquido de perfusión, la relación entre la diferencia arterio-venosa de lactato y la diferencia arterio-venosa de oxígeno era constante por encima de una concentración umbral de 4.5 mM de lactato. Dentro de este rango, el lactato tomado por el corazón representa más del 90% del requerimiento energético del mismo. En estos experimentos se usó lactato porque, de acuerdo a trabajos previos llevados a cabo por varios investigadores, se trata del combustible de preferencia del miocardio (26;27). La medición del consumo de oxígeno para evaluar energeticamente al músculo cardíaco presenta ciertas limitaciones, algunas de las cuales son: i) en tejidos perfundidos, el cálculo involucra el producto del flujo coronario por la diferencia arterio-venosa en la concentración de oxígeno. Pero hay circunstancias en las que existen desviaciones y este producto deja de ser válido. Tal es el caso de la hipoxaemia, en la que la relación del flujo coronario/consumo de oxígeno se incrementa alrededor de 5 veces con respecto a los valores controles (28;29). ii) El método carece de sentido en situaciones tales como la isquemia y la anoxia. iii) La evolución temporal de los eventos miocárdicos y de las reacciones químicas involucradas no es mimetizada por el consumo de oxígeno. Esto ocurre porque el consumo de oxígeno es una consecuencia de esos cambios y ocurre para reestablecer la situación energética previa al cambio. Es decir, el consumo de oxígeno es una manifestación que ocurre con posterioridad al desarrollo del evento en cuestión (30). En consecuencia, la medición del consumo de oxígeno no evalúa el comportamiento del evento y/o mecanismo involucrado sino su consecuencia sobre los

niveles de fosfatos de alta energía (y de ellos, sólo los que se recuperan por la vía aeróbica).

En relación a la extracción de lactato del medio de perfusión, la medición de la diferencia arterio-venosa de lactato muestra una importante dispersión. Por ejemplo, la relación entre la concentración arterial de lactato vs. la diferencia arterio-venosa del mismo muestra valores que oscilan entre 0.3 y 2.7 mmoles/l para una concentración de lactato arterial de 7 mmoles/l (31). Tales resultados experimentales obviamente dificultan una correcta evaluación energética del músculo cardíaco.

c) Evaluación energética del músculo cardíaco según un enfoque biofísico: implica en general mediciones como el seguimiento fluorométrico de cambios redox, Resonancia Magnética Nuclear (RMN) de compuestos de fosfato, cinética de intercambio iónico, métodos miotérmicos (32;33;34;35).

La RMN es una metodología ampliamente utilizada en los estudios biofísicos de la regulación contráctil. Debido a que este método no requiere biopsia muscular, es posible obtener medidas metabólicas y funcionales continuamente sobre la misma muestra. Provee información sobre las concentraciones citosólicas de ATP, CrP, Cr y Pi en músculos esqueléticos y cardíacos (36). Esta metodología ha permitido estimaciones de las concentraciones de estos metabolitos durante un ciclo cardíaco (37) y ha suministrado, además, información sobre la enzimología de la reacción de creatina quinasa (38). El uso de elementos de resonancia magnética de espín impar diferentes del fósforo, artificiales o naturales, también suministra información sobre las concentraciones intracelulares de varios iones de interés en el metabolismo cardíaco, como por ejemplo H^+ , Ca^{++} y Na^+ (39;40;41). Por otro lado, la metodología es capaz de brindar información sobre todos estos metabolitos en condiciones en las que el flujo

coronario esta disminuido o ausente. En efecto, puede aplicarse la RMN bajo condiciones de isquemia para obtener los valores de los contenidos de fosfatos de alta energía, H^+ , Ca^{++} , Na^+ y Mg^{++} (42;43;44;45).

Una crítica que se ha efectuado a la RMN es que tendría cierta fuente de error proveniente del movimiento del corazón en el campo magnético (46).

En la presente Tesis se usó un método miotérmico desarrollado en 1982 por Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer: la microcalorimetría para tejidos perfundidos (47). Por lo tanto en el presente Capítulo se desarrollaran mas "in extenso" los principales aspectos de los diferentes métodos miotérmicos.

2. Antecedentes históricos de los estudios miotérmicos

El uso de las técnicas miotérmicas data de más de un siglo atrás. Fue en 1848 que Hermann Helmholtz usando tres termocuplas en serie con un galvanómetro publicó los primeros experimentos relacionados con la producción de calor en músculo esquelético (49). Luego de esta publicación inicial transcurrieron quince años, hasta que en 1860 Adolf Fick retoma estos experimentos. Pero no fue hasta 1909 en que A.V. Hill comienza un estudio sistemático e integrado de la termodinámica de la contracción muscular esquelética. Este autor inicia sus investigaciones utilizando unas termopilas (gran número de termocuplas en serie) diseñadas por Blinx y que el mismo Hill mejoraría progresivamente tanto en rapidez de respuesta como en sensibilidad. Esta

metodología, con diferentes variantes continúa siendo aplicada en el estudio energético del músculo esquelético (49).

A pesar del éxito que la aplicación de la metodología miotérmica - desarrollada por A.V. Hill - tuvo en el estudio del músculo esquelético, los inconvenientes de su aplicación en el músculo cardíaco hicieron que hasta 1961 no se encuentre literatura miotérmica en esta preparación (50). Posteriormente, en 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguen aplicar por primera vez el método de las termopilas desarrollado por A.V. Hill en el músculo cardíaco, más específicamente al músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo (23). Si bien con estas termopilas podían realizarse estudios miotérmicos simultáneos con estudios mecánicos, el pequeño tamaño de la preparación que debía utilizarse impidió que se realizaran estudios iónico-cinéticos y/o metabólicos en forma simultánea. De hecho los estudios iónico-cinéticos y/o metabólicos fueron realizados por muchos años por otros grupos de investigadores haciendo más dificultosa la correlación e integración entre los resultados obtenidos. Mientras que las termopilas desarrolladas por Gibbs y col. fueron mejoradas en velocidad de respuesta y sensibilidad por el grupo de N.R. Alpert (51), las metodologías que intentaron el uso de preparaciones musculares más grandes (para realizar estudios metabólicos e iónico-cinéticos simultáneos) fueron en general de baja sensibilidad y lenta respuesta.

Para la misma época en que Alpert y col. publican el método de las termopilas, se desarrolló un método calorimétrico con una sensibilidad comparable a este y con suficiente velocidad de respuesta. Las ventajas más relevantes de este último método es que permite el estudio simultáneo de parámetros energéticos, contráctiles, iónico-cinéticos y metabólicos (47). Además, es independiente de la presencia de flujo al

tejido y del tamaño de la preparación biológica en un amplio rango (47). Este último método se ha aplicado en esta tesis para el estudio mecánico-energético del músculo cardíaco (ver Materiales y Métodos).

3. Metodos miotermicos

Hasta el presente, en el estudio energético del tejido muscular cardíaco se han utilizado fundamentalmente tres métodos miotérmicos: a. Método de las diferencias de temperatura arterio-venosa; b. Método de las termopilas y c. Método microcalorimétrico para tejidos perfundidos. A continuación se describirá brevemente cada uno de ellos y se expondrán las ventajas, desventajas y aplicabilidad de los mismos.

a) Metodo de las diferencias de temperatura arterio-venosa.

Este método utiliza la medición del flujo coronario y el gradiente térmico (dT) entre los fluidos arteriales y venosos (50;52;53;54). El método se basa en que el calor producido por el músculo cardíaco es proporcional a la diferencia de temperatura arterio-venosa (evaluada con termistores o termocuplas), tal que:

$$Q = T \cdot J_{a-v} \cdot c$$

Donde:

Q = flujo calórico

d T = diferencia de temperatura arterio-venosa

J_{a-v} = flujo arterio-venoso

c = calor específico de la solución de perfusión

Debido a que este método requiere una cantidad finita de flujo para obtener una medición, el calor producido en condiciones isquémicas (ausencia de flujo) no puede ser determinado. Por otra parte, en general esta metodología es de respuesta relativamente lenta con constantes de tiempo superiores a los 2,7 minutos y de

sensibilidad relativamente baja. La ventaja más notable es que al utilizar preparaciones musculares relativamente grandes (en general corazón entero) permite realizar estudios metabólicos simultáneos con métodos bioquímicos como por ejemplo medición de flujo glucolítico, producción de ácido láctico, etc. Además, dado que la perfusión se realiza por vía fisiológica, se evitan los problemas asociados con una limitada difusión de oxígeno hacia el tejido. Finalmente, en algunos casos las mediciones miotérmicas han podido realizarse simultáneamente con mediciones de consumo de oxígeno (por el método polarográfico), con lo que se pudieron obtener índices del equivalente calórico del consumo de oxígeno en músculo cardíaco (54;55).

b) Método de las termopilas

Este método termoeléctrico fue desarrollado y aplicado extensamente por A.V. Hill en el estudio energético del músculo esquelético (49). Hacia 1965, Ricchiuti y Gibbs consiguen desarrollar un sistema (posteriormente mejorado por Mulieri y colaboradores, 1977) (51) de termopilas que permiten medir producción de calor en preparaciones musculares cardíacas con características especiales (23;56). La preparación muscular a utilizar debe ser suficientemente delgada para posibilitar la adecuada difusión de oxígeno en el tejido y su forma debe ser tal que permita que la mayor parte de su superficie este en contacto con las uniones termosensibles (termocuplas ubicadas a lo largo del músculo y conectadas en serie). La preparación muscular más utilizada que cumple estas condiciones ha sido el músculo papilar de ventrículo derecho de corazón de conejo o el papilar de ventrículo izquierdo de corazón de rata. El calor producido por el músculo es medido como el producto entre la variación de temperatura, registrada por las termopilas, y el calor específico del

músculo. Los inconvenientes técnicos están relacionados, por un lado, con la elevada pérdida de calor que se produce, de aproximadamente 14% por segundo (constantes de tiempo del orden de 10 segundos) y consiguiente inestabilidad de la línea de base y, por otro lado, con los inconvenientes derivados del pequeño tamaño de las preparaciones utilizadas (masa promedio 5 mg) como, por ejemplo, el error asociado a la cantidad de solución adherida a la preparación que puede inducir una incertidumbre en la masa tisular a utilizar en los cálculos de hasta un 30%. A esto debe agregarse que el pequeño tamaño de la preparación hace extremadamente difícil realizar mediciones simultáneas de parámetros metabólicos o estudios de cinética iónica como en el método antes mencionado. Las ventajas más relevantes de esta metodología son su alta sensibilidad y rápida respuesta, características considerablemente superiores al método basado en diferencias de temperatura arterio-venosa.

c) Metodo microcalorimétrico para tejidos perfundidos

Una alternativa al método de las termopilas rápidas descrito en b., particularmente por su sensibilidad y capacidad de evaluar simultáneamente parámetros mecánicos, bioquímicos e iónico-cinéticos, es un método desarrollado hacia 1982 por Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer (47). El mismo se basa en la medición del flujo de calor desde la cámara interna del microcalorímetro en donde se encuentra la pieza muscular en estudio y las paredes externas del mismo en contacto con un baño mantenido a temperatura constante. La medición se lleva a cabo mediante el uso de dos juegos de 127 unidades termosensibles cada uno, conectadas en serie y ubicadas entre la cámara interna, en contacto con el músculo, y la pared externa del sistema, en contacto con el baño. Este método, al igual que aquél basado en la medición de diferencias de temperatura arterio-venosas, permite la utilización de

una gran variedad de preparaciones miocárdicas de tamaños diversos. Siendo usadas preparaciones perfundidas por vía fisiológica, se resuelve el inconveniente del espesor tisular como factor limitante de la difusión de oxígeno hacia el tejido. En cuanto a velocidad de respuesta, es mayor (constante de tiempo de 0,5 min) que la del método basado en la medición de diferencias de temperatura arterio-venosas (constante de tiempo de 2,7 min), pero menor que la del método de termopilas descrito en b. Su sensibilidad es comparable con este último y, además, permite la evaluación continua de actividad contráctil, parámetros metabólicos (mediante métodos bioquímicos), flujos iónicos, simultáneamente con las mediciones de producción de calor (12;57). Por otra parte, como estas mediciones son técnicamente independientes de la existencia de perfusión, el método es utilizable en ausencia de perfusión. Esto permite la continua evaluación de la producción de calor por parte del miocardio durante la isquemia y reperfusión, a la vez que simultáneamente pueden realizarse otras mediciones (por ejemplo, mecánicas). Cabe destacar que por su versatilidad, capacidad de respuesta y sensibilidad este método es el que se ha utilizado en la presente tesis, encontrándose detallado en la sección Materiales y Métodos.

4. Componentes energéticos del músculo cardíaco

Una forma de analizar el comportamiento energético del corazón es dividir el calor generado por el músculo en una fracción relacionada fundamentalmente con el estado de reposo mecánico (denominada calor basal) y otra que está asociada con la actividad mecánica (calor activo). La evaluación de ambos componentes se realiza estudiando calorimétricamente al músculo en actividad y en estado de reposo, tal que

la diferencia entre la producción de calor total y aquella que se obtiene durante el reposo es el calor activo.

a) Metabolismo basal

Aún cuando no se lo estimule, el músculo aislado debe conservar la integridad de su composición intracelular en contra de gradientes eléctricos y químicos. La producción de calor asociada a este metabolismo basal o de mantenimiento es una medida de la utilización y recuperación de la energía involucrada en el mantenimiento de la homeostasis celular. Si bien hasta el presente no se han podido establecer las bases fisiológicas de este calor de reposo, se ha postulado al transporte activo de Na^+ y K^+ como uno de los responsables del consumo basal de ATP en estas condiciones. De la aplicación de técnicas miotérmicas conjuntamente con métodos radioisotópicos se ha estimado que el transporte activo de Na^+ y K^+ participaría con aproximadamente 10-25% del calor producido durante el reposo mecánico (57;58;59). La postulada contribución del transporte activo de Na^+ y K^+ al metabolismo basal en el músculo cardíaco es consistente con: i) la reducción en el consumo de oxígeno cuando disminuye la concentración de Na^+ extracelular (60), ii) la caída de la producción de calor en reposo, con simultánea reducción en el influjo de K^+ sin alteración de la salida del mismo, cuando disminuye la concentración de Na^+ en el medio de perfusión (57) y iii) la elevación del consumo de oxígeno o de la producción de calor asociada al reposo mecánico por aumento en la concentración extracelular de K^+ (34;61). Por otro lado, existen evidencias que sugieren que hasta el 30% de los valores medidos de producción de calor en reposo estarían relacionados con el costo energético del recambio de proteínas (58;62).

El músculo cardíaco posee un metabolismo basal particularmente elevado cuando se lo compara con el músculo esquelético. Dependiendo de la especie, esta diferencia entre ambos tipos musculares es tal que el músculo cardíaco puede tener un metabolismo basal entre cinco y ocho veces más elevado que el correspondiente al músculo esquelético. Hasta el presente no se ha podido explicar esta diferencia y se ha especulado que un componente significativo del mismo podría reflejar una respuesta mitocondrial al continuo influjo pasivo de H^+ hacia su matriz. La evidencia es fundamentalmente circunstancial y se relacionaría con la diferencia en el contenido mitocondrial en ambos tipos musculares (músculo esquelético y cardíaco). Por otra parte, las diferencias observadas en el calor de reposo entre distintas especies se correlaciona con el volumen mitocondrial de sus corazones (61).

En resumen, si bien hasta el presente existen evidencias experimentales que sugieren la contribución de distintos procesos al metabolismo basal del músculo cardíaco, el total esclarecimiento de su origen es aún materia de especulación.

b) Metabolismo activo

Como ya se puntualizara, el músculo cardíaco aislado y perfundido responde a la estimulación eléctrica con una respuesta que, como consecuencia de la interacción entre las proteínas contráctiles, se manifiesta como desarrollo de fuerza. Cuando se permite que el músculo se acorte contra una carga, el desarrollo de fuerza hace posible la realización de trabajo mecánico externo. Ha sido establecido, desde los clásicos experimentos de Fenn (63;64) posteriormente confirmados por Hill (65) en músculo esquelético, que la energía total liberada en una contracción (en forma de calor y/o trabajo) no es constante y depende de la carga contra la cual el músculo realiza trabajo externo. Asimismo, en el músculo cardíaco se ha observado una dependencia de la

energía total liberada con la carga contra la cual el músculo realiza trabajo (contracciones isotónicas) (1) pero, a diferencia del músculo esquelético en el que la energía total liberada es mayor cuando el músculo se acorta contra una carga (realiza trabajo externo), en el músculo cardíaco la misma es máxima en condiciones en las que el músculo desarrolla fuerza pero no realiza trabajo externo (contracciones isométricas). En este último caso, la energía total durante el evento contráctil es liberada en forma de calor (58;66).

b-1) Componentes del calor activo: estudios clásicos.

La liberación de calor que acompaña al ciclo contracción-relajación, al que se ha llamado calor activo, es la manifestación térmica de los cambios químicos que ocurren durante el evento contráctil. Estos cambios involucran tanto la utilización como la recuperación (principalmente aeróbica) de la energía contenida en enlaces químicos. La separación de los componentes energéticos relacionados con el proceso de excitación-contracción-relajación en el músculo cardíaco puede realizarse según la actividad de los varios componentes enzimáticos involucrados en el ciclo cardíaco. Con este criterio, el proceso de excitación-contracción-relajación puede ser dividido en un componente contráctil y un componente no contráctil. El primero está relacionado con la utilización de energía química (en forma de ATP) a nivel de las proteínas contráctiles a través de las ATPasas de los miofilamentos. El componente no contráctil está asociado con la despolarización y activación de la fibra. Entre estos procesos se cuentan la liberación de calcio al sarcoplasma, su movimiento desde y hacia los sitios de unión miofibrilares y su retorno a los sitios de almacenamiento por los sistemas de transporte dependientes de ATP (bombas de Ca^{++} tanto de sarcolema como de retículo sarcoplásmico) y recuperación del gradiente electroquímico para Na^+ y K^+ (via la Na^+-K^+ ATPasa asociada a sarcolema)(67). La energía química utilizada por ambos componentes energéticos es recuperada aeróbicamente durante la misma contracción. Para la evaluación del componente no contráctil, cuya manifestación térmica es el denominado calor de activación o calor independiente de tensión, debe eliminarse (o al menos minimizarse) del proceso de excitación-contracción-relajación toda interacción entre miofilamentos. En el músculo esquelético esto se ha logrado por estiramiento de las fibras más allá de la longitud óptima (68). Esta sobreextensión de las fibras hasta

aproximadamente 3.5 μm elimina la superposición de los filamentos. En el músculo cardíaco este procedimiento no puede emplearse, ya que se daña el preparado. En consecuencia, la disminución de la interacción actina-miosina se ha intentado disminuyendo la tensión de reposo hasta que no se registre desarrollo de fuerza. Un método alternativo ha sido la utilización de medios hipertónicos en los que la interacción entre miofilamentos es mínima (69;70;71). En concentraciones de calcio fisiológicas los valores obtenidos por ambos métodos varían, según la especie estudiada, entre 1,6 y 2.6 $\text{mJ}\cdot\text{g}^{-1}$ de tejido húmedo (61;72). Su magnitud es afectada por cambios en la concentración extracelular de calcio y por agentes que alteran la contractilidad (69;73). Un problema que se planteó sobre el primer método citado fue que la entrada de Ca^{++} era dependiente del estiramiento al cual se somete al tejido (74), y por lo tanto el calor de activación obtenido debería ser menor al correspondiente a una contracción en longitud óptima. Para evitarlo se desarrolló el método de "quick release" (71), que permite el acortamiento de la longitud del tejido durante la iniciación de la contracción. De este modo, se evita la generación medible de fuerza pero partiendo de la longitud óptima durante la estimulación eléctrica. Con este último método se obtuvieron valores de calor independiente de tensión más altos que con la técnica de preacortamiento (3.46 vs. 2.06 $\text{mJ}\cdot\text{gr}^{-1}$ de tej.húmedo respectivamente) (71).

B. ISQUEMIA Y REPERFUSION CARDIACAS

1.- Aspectos Generales

El estudio de la Isquemia y Reperfusión cardíacas es de considerable interés tanto por los mecanismos fisiológicos involucrados como por su posible aplicación a la clínica. El número de trabajos publicados sobre el tema es grande y el interés por el mismo se ha incrementado aún más desde la aparición de protocolos experimentales relacionados con el llamado preconditionamiento cardíaco (75).

Sin embargo, pese a la trascendencia del tema, existen una serie de conceptos y usos experimentales no claramente definidos que, aunque diferentes tanto en su esencia como en su aplicación experimental, se emplean de manera indistinta. Esto ha producido una brecha en la interpretación de experimentos provenientes del área clínica y otros de la investigación básica agregando una dificultad adicional a un tema de por sí complejo. Por ejemplo, mientras que algunos autores definen la isquemia como la suspensión de flujo hacia un tejido (76;77), otros lo hacen como un desbalance entre la oferta y la demanda de oxígeno (29;78). Es decir que para los primeros el concepto involucra, además de un desbalance entre la oferta y la demanda de oxígeno, otra serie de factores.

En la investigación básica, los métodos experimentales para producir isquemia miocárdica son básicamente tres: a) por reducción o cese de flujo (79), que puede ser circunscripta a un área determinada (isquemia regional)(17) o a todo el corazón (isquemia global)(79) b) mediante una reducción (hipoxia)(80) o ausencia (anoxia)(47)

de oxígeno disuelto en el líquido de perfusión y c) por aumento en la frecuencia de contracción muscular (81). Obviamente, todos conducen a un desbalance entre la oferta y la demanda de oxígeno, pero las diferencias entre las consecuencias fisiológicas desencadenadas por cada uno de ellos son de importancia.

Cualquiera sea el método empleado para producir isquemia, ésta y la reperfusión conllevan una serie de profundos cambios bioquímicos, mecánicos, electrofisiológicos y estructurales (82;83).

La ausencia de flujo, por ejemplo, llevará a la anulación de la contracción cardíaca y por ende al decremento del consumo energético asociado a la misma. Sin embargo, el aporte de oxígeno y nutrientes (via el líquido de perfusión) será nulo y la falta de remoción producirá la acumulación, en el espacio extracelular, de metabolitos. La eliminación de éstos durante la reperfusión dará a la misma características diferenciales, con lo que estas sustancias incidirán no solo en la evolución de la isquemia sino también en el de la reperfusión.

El aumento en la frecuencia de contracción, por su parte, incrementa el trabajo cardíaco, el gasto y por ende la demanda de oxígeno (21). Simultáneamente, disminuye el pH intracelular (84), se incrementa la presión de perfusión y disminuye el flujo efectivo que irriga ciertas áreas tisulares. Esto es así porque la masa muscular ventricular izquierda se irriga esencialmente durante la diástole. Al aumentar la frecuencia disminuye la duración de la diástole y, por lo tanto, el tiempo total de perfusión al tejido. La suma de todos estos factores produce una isquemia de diferente grado de severidad.

La evaluación de los efectos intrínsecos de la isquemia y la reperfusión sobre el miocardio puede resultar extremadamente dificultosa dado que estos son multiformes

y tiempo dependientes. Además, en el corazón intacto aparecen variables adicionales a considerar. Tal es el caso del efecto sobre la variación en la distribución del flujo regional, el soporte extravascular (ya que cada contracción comprime los vasos del circuito coronario y aumenta la resistencia al flujo) y la influencia de factores humorales y neuronales (82;83).

Con el objeto de simplificar el estudio del tema, puede considerarse que el conjunto de factores involucrados incidirán, en última instancia, sobre tres aspectos: a) en la sobrevivencia tisular, modificando los niveles o extensión de la necrosis celular, b) en el ritmo cardíaco, aumentando la incidencia de arritmias y fibrilación y c) en la performance mecánica del músculo cardíaco, disminuyendo el desarrollo de tensión activa, alterando las velocidades con las que evolucionan las mismas e induciendo la aparición de contractura (82).

Otro aspecto a considerar al evaluar e interpretar los resultados de protocolos experimentales de isquemia y reperfusión cardíacas es que los mismos varían mucho en relación a la situación experimental inicial (preisquémica). Debe tenerse en cuenta que, en aquellos preparados perfundidos con solución Ringer no enriquecida con eritrocitos, la capacidad de transporte de oxígeno está disminuida (en relación a la sangre), por lo que deberán fijarse condiciones experimentales en las que la demanda energética del músculo sea menor en relación a los requerimientos "in vivo". La no observancia de este aspecto llevará al músculo perfundido a una vasodilatación coronaria extrema (que imposibilita la autorregulación del flujo coronario) y a una condición general de hipoxia que puede invalidar las conclusiones que surjan de los resultados obtenidos (85).

El intento de establecer condiciones experimentales próximas a las llamadas

"condiciones fisiológicas" puede conducir a preparaciones con severos desbalances entre la oferta y la demanda de oxígeno. Por ejemplo, líquidos de perfusión con concentraciones de calcio iguales a las plasmáticas (1.35 mM en la rata) resultan en corazones sujetos a actividades de Ca^{++} (y por ende a estados inotrópicos) que estarían por encima de la media "in vivo". En efecto, la actividad iónica en general, y del calcio en particular, varía notablemente en relación al tipo y cantidad de los otros iones con los que está en solución (86). Por ejemplo, en una solución acuosa de Cl_2Ca 10^{-3} molal el coeficiente de actividad del Ca^{++} cae un tercio por el solo agregado de Cl_2Ca hasta 10^{-2} molal, mientras que en la misma solución la presencia de 10^{-2} molal de NaCl reduce la actividad del Ca^{++} desde 7.89 a 6.3×10^{-4} molal. Debe pues tenerse en consideración que es la actividad del Ca^{++} y no su concentración la que incide sobre la contractilidad miocárdica, y que esta varía apreciablemente en diferentes medios de solución (86).

También es usual que, en un intento de incrementar el aporte de oxígeno al tejido, se aumente excesivamente el caudal de perfusión (y concomitantemente la presión de perfusión). Esto, sumado al hecho de que los líquidos de perfusión en general contienen bajas concentraciones de proteínas, conduce a la formación de edema.

En síntesis, para establecer una situación experimental óptima para el estudio de la isquemia y reperfusión cardíacas deben fijarse condiciones iniciales (preisquémicas) que tengan en cuenta no solo el aporte de oxígeno al tejido sino también el grado de requerimiento del mismo. El caudal de perfusión y el agregado de eritrocitos, por ejemplo, incidirán en el primer aspecto, mientras que la frecuencia de contracción, la concentración de Ca^{++} , la temperatura de trabajo y la tensión sobre las paredes del miocardio lo harán en el segundo. A estas se agregan otras variables a considerar para

preservar el estatus metabólico del músculo cardíaco, tales como la presión de perfusión y las concentraciones de sustancias oncoticamente activas.

2.- Eventos metabólicos durante la isquemia y la reperfusión cardíacas

Las primeras manifestaciones del miocardio ante un episodio isquémico son extremadamente heterogéneas. Inequívocamente ocurre un descenso en la presión parcial de oxígeno tisular, una deprivación de sustratos que aportan energía química y una progresiva disminución hasta el cese de la remoción de los metabolitos cardíacos. En situaciones "in vivo", también se encuentran agregación de elementos figurados (plaquetas, neutrófilos, etc) y activación de la cascada coaguladora (87;88).

La respuesta de los miocitos a la isquemia es multiforme. En efecto, dado que el pH y los fosfatos de alta energía participan virtualmente en todas las vías metabólicas, las alteraciones de estos factores durante la isquemia modifican el conjunto del metabolismo celular. Como consecuencia de ello, el funcionamiento mecánico y eléctrico del corazón es afectado en su totalidad (87;88).

Como regla general, puede asumirse que todos los cambios en la homeostasis celular derivados de un proceso isquémico son dependientes de la severidad y del tiempo de duración del evento. Si bien el valor del período crítico depende de la temperatura, la frecuencia etc, la prolongación de la isquemia causa un daño irreversible que lleva a la aparición de tejido necrótico (2). Para unas dadas condiciones de temperatura, frecuencia etc., un determinado tiempo de isquemia ("breve") producirá un daño reversible con una disfunción mecánica transitoria que se

normaliza durante la reperfusión. Para las mismas condiciones, tiempos de isquemia mas prolongados ("intermedios") conducirán a un estado diferenciado llamado "miocardio atontado". Esta entidad fisiopatológica consiste en una disminución del estado contráctil durante el período de reperfusión, el cual retorna a la normalidad en función del tiempo. Estos corazones no presentan las alteraciones histopatológicas que caracterizan a la injuria irreversible (89;90).

En resumen, la severidad y la duración de la isquemia inciden sobre la profundidad de los cambios a nivel del metabolismo celular, a la vez que tienen un correlato en el desempeño mecánico y eléctrico del miocardio.

A continuación, se describirá brevemente algunas de las alteraciones mas estudiadas y consideradas prioritarias en la evolución de la isquemia y reperfusión cardíacas.

a) Fosfatos de alta energía durante la isquemia y reperfusión

El establecimiento de la isquemia hace que la glucólisis anaeróbica sea la principal fuente de síntesis de nuevos fosfatos de alta energía, a partir de glucógeno como sustrato (91). Sin embargo, aun la máxima velocidad de producción de fosfatos de alta energía (**FAE**) en condiciones anaeróbicas resulta insuficiente para el mantenimiento del metabolismo celular, lo que conduce a una declinación progresiva de las reservas celulares de FAE, específicamente adenosina trifosfato (**ATP**) y creatina fosfato (**CrP**)(79). Muchos procesos celulares y reacciones contribuyen a esta declinación del ATP y CrP. Por ejemplo, el ciclado continuo del Ca^{++} por enzimas (en el sarcolema, retículo sarcoplásmico y miofibrillas), la actividad permanente de ATPasas de transporte como la Na^+/K^+ ATPasa y una gran variedad de reacciones enzimáticas (2). Estudios recientes indican que esta disminución en los niveles de FAE durante la

isquemia estaría aún más incrementada. Esto se debería a que la mayor causa de degradación de ATP en esta situación es el gasto aumentado del mismo por la enzima ATPasa mitocondrial (FOF1 ATPasa)(92). Esta enzima no es otra que la ATP sintetasa mitocondrial funcionando de manera inversa. Con todo, el gasto incrementado de ATP se vería de alguna manera limitado por la presencia de una proteína de bajo peso molecular presente en la matriz mitocondrial llamada IFI. Esta proteína, en condiciones de acidosis como la que ocurre durante la isquemia, se une a la ATPasa mitocondrial disminuyendo su actividad (93).

Trabajos realizados con corazones perfundidos de rata a 37°C, sin estimulación externa, y sometidos a 35 min de isquemia (94) muestran que la concentración inicial de ATP tisular ($19,3 \pm 2,6$ $\mu\text{mol/g}$ tej. seco) se reduce en un 40 % a los 8 min y se hace indetectable a los 20 min. El seguimiento con ^{31}P -NMR durante la isquemia muestra que el descenso en los niveles de ATP tiene un carácter bifásico: declina progresivamente durante los primeros 6-8 min hasta alcanzar valores del 40% del control, entre los 9-14 min hay un plateau y finalmente una caída abrupta de 1-2 min de duración hasta alcanzar valores indetectables (94).

La CrP sufre una reducción aún mas acelerada cayendo en 2 min al 50% de sus valores pre isquémicos y anulándose en 4 min (94).

Paralelamente, se produce un rápido incremento en las concentraciones tisulares de ADP, con un comportamiento inversamente proporcional a la caída en la concentración de CrP (95).

El Pi, por su parte, aumenta paulatinamente con un $t_{1/2}$ de alrededor de 12 min y alcanza, a los 22 min, valores cercanos al 350% de los preisquémicos (94).

Previsiblemente, la temperatura con la que cursa la isquemia es un factor

determinante en la evolución temporal de los FAE. Por ejemplo, trabajos realizados a 4 °C en corazones de ratas sujetos a 12 horas de isquemia indican que las concentraciones de ATP y CrP tisulares (medidas con RMN) tardan en caer 4 h y 1 h respectivamente (95). Es decir, que la reducción de la temperatura produce una importante caída en la velocidad de consumo de FAE por parte del músculo.

Todos estos efectos sobre los FAE inducidos por la isquemia son total o parcialmente reversibles si a la misma le sigue la reperfusión tisular. De hecho, en corazones de ratas perfundidos a 37°C y estimulados eléctricamente a 5 Hz (96), la reperfusión eleva los niveles de ATP a niveles cercanos al 40% de los preisquémicos. Estos valores se mantienen constantes a lo largo de los 30 min de reperfusión. En cambio, la reinstauración del flujo rápidamente eleva la CrP a sus valores controles y disminuye los niveles de Pi, aunque éstos se mantengan alrededor de 2 veces más altos que los preisquémicos (96).

b) Acidosis durante la isquemia y reperfusión

La suspensión del flujo genera una disminución del pH debido a diversos factores. Entre ellos, se verifica una acumulación inicial de CO₂ (97), aumento en la relación coenzimas reducidas / coenzimas oxidadas (ej: NADH/NAD)(98;99), formación de ácidos fijos (ej: ácido láctico)(91) y producción de fosfatos inorgánicos. En procesos isquémicos "moderados" el pH extracelular puede disminuir antes que el pH intracelular, pero en las isquemias "severas" (a mayores temperaturas, concentraciones de Ca⁺⁺ etc) ambos caen con la misma evolución temporal (100).

Los efectos descritos de la caída del pH son múltiples. La acidosis altera el metabolismo oxidativo (101) y daña a los miocitos (102), a la vez que la homeostasis iónica sufre grandes alteraciones. En muchos tipos celulares, la regulación del pHi se

vincula con el intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$ (103;104). En miocitos, el mecanismo no sería importante en la regulación del pH en condiciones normales (105), pero podría participar activamente en este sentido en condiciones de isquemia y acidosis intracelular. La ganancia intracelular de Na^+ que ocurre durante la isquemia (83;106) se explicaría entonces, al menos en parte, por un incremento en la actividad del intercambiador $\text{Na}^+\text{-H}^+$, sumado a la disminución en el funcionamiento de la bomba sodio/potasio (105). También el disminuído pH_i con el que cursan los primeros minutos de reperfusión podría explicar la ganancia adicional de Na^+ intracelular que se produce en este período, en el que la actividad de la Na^+/K^+ ATPasa se ve favorecida debido al rápido incremento de CrP y ATP. En efecto, para explicar este incremento Lazdunski y col. (105) propusieron que la reperfusión podría estimular el intercambio $\text{Na}^+\text{-H}^+$ debido a que en los primeros minutos el pH_i continúa disminuido mientras que el lavado del espacio extracelular normaliza el pH extracelular creando un gradiente de H^+ que favorece el influjo de Na^+ . Por otra parte, en músculos cardíacos sujetos a isquemia y acidosis se reportó una disminución en la velocidad con que declinan los cambios transitorios de Ca^{++} intracelular (107;108). Esta declinación progresiva puede ser atribuida a una remoción lenta por parte del retículo sarcoplásmico (**RS**) y posiblemente por el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ que se ven afectados por la disminución del pH_i y la acumulación de Mg^{++} que se producen durante la isquemia (109;110). La reducida tasa de acumulación de Ca^{++} por el efecto de la acidosis puede llevar a una reducción en el contenido de Ca^{++} del RS. Por otro lado, recientes trabajos sugieren que la liberación de Ca^{++} a través de los canales sensibles a rianodina puede estar disminuída por el efecto conjunto de la disminución del pH y el aumento en la concentración intracelular de Mg^{++} secundarias a la isquemia (111).

La reperfusión eleva los niveles de pH_i hasta que alcanzan valores cercanos a los preisquémicos en apenas 2 o 3 min, y puede decirse que restaura los valores normales de pH_i dentro de los 5 min, incluso luego de prolongados períodos de isquemia (112).

c) Control del Ca^{++} durante la isquemia y la reperfusión

Si bien es aceptado que la concentración intracelular de Ca^{++} es baja, su valor real, y consecuentemente sus modificaciones, permanecen sin una definición real. Esto se debe, entre otros motivos, a la compartimentalización intracelular de este ión, la que toma cada vez mas relevancia, así como a la incapacidad actual de poder definir aspectos tales como los valores de fuerza iónica intracelulares. La concentración de Ca^{++} libre citosólico puede relacionarse con cambios en la homeostasis del ión a nivel de sus depósitos intracelulares, cambios en el ingreso de Ca^{++} desde el espacio extracelular o alteraciones en la afinidad de moléculas capaces de unirse a él (30;87). Dentro del miocito, el RS y la mitocondria pueden tanto liberar como secuestrar Ca^{++} . El intercambio entre los medios extra e intracelular puede darse a través de los canales lentos de Ca^{++} (ingreso), la Ca^{++} ATPasa del sarcolema (extracción), el intercambiador Na^+-Ca^{++} (que puede funcionar en ambas direcciones) o a través de cambios en la permeabilidad del sarcolema (por defectos estructurales y/o funcionales)(30;87). A su vez las miofibrillas, la calmodulina, los fosfolípidos sarcolemales y los fosfatos inorgánicos en suspensión - entre otros - son capaces de unirse reversiblemente al Ca^{++} y variar sus concentraciones libres citosólicas (113). La isquemia, al cambiar el pH intracelular, los niveles de FAE y las concentraciones de varios iones implicados en la homeostásis celular, altera prácticamente todos los mecanismos involucrados en el manejo del Ca^{++} (30;87).

La isquemia miocárdica induce un aumento moderado y progresivo en la

concentración de Ca^{++} intracelular, según se desprende de experimentos llevados a cabo con RMN y con fluoruro BAPTA, un marcador específico para medir Ca^{++} intracelular (114). Los diferentes grados de sobrecarga intracelular de Ca^{++} se han asociado a los diferentes niveles de disfunción contráctil postisquémica y daño tisular (113;115).

Entre los mecanismos involucrados en la sobrecarga de Ca^{++} que hasta el momento han sido postulados podemos citar: i) la inhibición de las bombas sarcolemales ATP dependientes para la extrusión de Ca^{++} , como consecuencia de la depleción de FAE (116;117). ii) La remoción disminuída por parte del RS del Ca^{++} citosólico debido a la elevación intracelular de H^+ y Mg^{++} (110;118). iii) Un aumento en el intercambio Na^+ - Ca^{++} secundario a una sobrecarga de Na^+ intracelular debido al intercambio Na^+ - H^+ (119). iv) Desplazamiento de Ca^{++} de su sitios intracelulares de "binding" por efecto de la acidosis (107). v) defectos estructurales que permitirían un ingreso pasivo de Ca^{++} a través del sarcolema (120;121;122). Estas alteraciones en la estructura de la bicapa lipídica serían secundarias a una depleción de ATP que modificaría profundamente la topología de los fosfolípidos sarcolemales (122;123;124) e incluso el complejo citoesqueleto-sarcolema (125). Además, paralelamente con este proceso, el aumento del Ca^{++} intracelular por otras vías podría activar rutas metabólicas que llevan a la ruptura de la membrana plasmática (126;127).

Durante la reperfusión se produce un importante incremento del flujo de Ca^{++} al miocito (128;129). Si bien los mecanismos subyacentes no están aclarados, la imposibilidad de los bloqueantes cálcicos para evitar este ingreso sugiere que el mismo no se debe a los canales lentos de Ca^{++} (128;130). De la misma manera, los flujos pasivos de Ca^{++} a través de la membrana no parecen ser importantes en esta

sobrecarga durante la reperfusión(131).

3- Evaluaciones calorimétricas durante la Isquemia y Reperfusión

El hecho de que la aplicación extensiva de la metodología miotérmica a problemas de índole fisiológico en el músculo cardíaco sea relativamente reciente explica el escaso número de trabajos elaborados en el área fisiopatológica, particularmente en lo que respecta a la isquemia y reperfusión cardíacas. A esto debe sumarse el hecho que no todos los métodos calorimétricos utilizados para la evaluación energética del músculo cardíaco permiten estudiar la evolución de la producción de calor en corazones arterialmente perfundidos sometidos a isquemia y reperfusión. En efecto, el método basado en la evaluación de las diferencias de temperatura arterio-venosas (54) no permite, obviamente, abordar situaciones experimentales que involucren la suspensión de la perfusión tisular. Por otro lado, el método de las termopilas (49;56) limita el tipo de preparación muscular con las que es posible trabajar a aquellas que son suficientemente delgadas (normalmente músculos papilares). En este tipo de preparación experimental se establecen gradientes de difusión (por ejemplo de oxígeno)(132) entre el músculo y el baño que lo rodea, es decir que el aporte de oxígeno y nutrientes no se realiza a través del lecho vascular y no puede hablarse de isquemia entendida como la suspensión de flujo. El desarrollo de un método microcalorimétrico para tejidos perfundidos, que evalúa la producción de calor del músculo independientemente de la temperatura de trabajo y/o de la presencia de perfusión (47), permite abordar el estudio de la producción de calor en corazones arterialmente perfundidos sujetos a suspensión de la perfusión. Si bien en relación a esta metodología aplicada a este modelo experimental no hay bibliografía publicada, si

la hay en preparados de septum de conejo bajo anoxia (47), una situación parcialmente vinculada a la isquemia. Estos trabajos evidencian las alteraciones que, bajo estas condiciones, se producen en el comportamiento energético de los mecanismos no dependientes de la generación de fuerza, entre los que el transporte activo desempeña un papel crítico. En la recuperación post-anóxica o post-hipóxica severa, el músculo responde con un incremento en la utilización de energía que supera los niveles pre-hipóxicos, aún con un desarrollo de fuerza significativamente disminuido (47).

Finalmente, las evidencias indican que los mecanismos responsables de la homeostasis iónica se relacionan estrechamente con aquéllos vinculados a la generación de fuerza, y que ambos son causa y/o dependen del recambio de energía (133;134). En consecuencia, deben considerarse integrada y simultáneamente al evaluar la traducción mecánico-energética del músculo cardíaco. Esto, relevante de por sí en condiciones fisiológicas, cobra más importancia aún durante la isquemia. Durante esta condición patológica es el balance del sistema energético el que se encuentra alterado y, en consecuencia, se ven comprometidos los mecanismos de los que depende de la recuperación celular.

Objetivos

La finalidad última de este trabajo de tesis es contribuir a la caracterización de la sucesión de eventos que ocurren durante la isquemia y reperfusión cardíacas. Para ello, se estudió la evolución mecánico-energética del músculo cardíaco de rata sometido a las mencionadas condiciones.

Dada la complejidad y superposición temporal de los cambios involucrados, una posibilidad para su comprensión es la conveniente reducción de las variables intervinientes. Para ello se trabajó con corazones de rata retroperfundidos de acuerdo a la Técnica de Langendorff, a los que se les eliminó las aurículas y se los estimuló eléctricamente. Esta preparación permite el adecuado control de variables tales como el flujo de perfusión, la temperatura, el medio extracelular, la frecuencia de estimulación, las condiciones de carga y otras.

Entre los diferentes métodos para producir isquemia, se optó por la isquemia global con interrupción absoluta de flujo, que permite conocer con exactitud el área afectada por la suspensión del flujo.

Para la evaluación del estado energético del músculo cardíaco durante la isquemia y reperfusión se estudió la liberación de calor por parte del mismo (calorimetría de flujo). Los enfoques clásicos para la evaluación energética del miocardio se basan en técnicas de medición de consumo de oxígeno, parámetros mecánicos, fosfatos de alta energía tisulares, flujos glicolíticos y liberación de calor (mioenergéticas). Los experimentos basados en la liberación de calor son de particular importancia por permitir una evaluación continua de los procesos y porque se correlacionan temporalmente con los eventos mecánicos observados. De hecho, en el presente trabajo se cuantificó y diferenció, mediante estudios miotérmicos, los 4

componentes energéticos diferenciables que se manifiestan durante la contracción aislada.

Específicamente se analizó el efecto que, sobre los ventrículos latiendo en estado estacionario, produce una isquemia y posterior reperfusión (ambas de 45 minutos) a diferentes temperaturas. Se estudió el comportamiento de la producción de calor en relación a la generación de presión, analizando los cambios en la economía para la generación de presión (como la relación entre la máxima presión desarrollada y el calor total liberado). Se evaluó diferencialmente el comportamiento de la liberación de calor y sus inflexiones, incluyendo un análisis de componentes en presencia de fuerza, así como la evolución de los correlatos mecánicos.

Materiales y Métodos

1. Preparación biológica

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar (320-380 g) que fueron heparinizadas (1500 Unidades FEU.kg⁻¹) y sacrificadas con una sobredosis de pentobarbital (100 mg.kg⁻¹) administrada por vía intraperitoneal. El corazón se retiró rápidamente del animal por toracotomía y se sumergió en solución de Krebs (0.5 mM de Ca⁺⁺) a temperatura ambiente. Luego el músculo fue inmediatamente canulado vía aorta y perfundido en forma retrógrada por el método de Langendorff (135). Para evitar el automatismo y tener absoluto control de la frecuencia de contracción, se retiraron cuidadosamente las aurículas y se practicó una pequeña incisión sobre la base del septum, con lo que a 25 °C el músculo permanecía en reposo o con una frecuencia de contracción espontánea menor a 0.3 Hz. En todos los casos el tiempo transcurrido desde la toracotomía hasta el comienzo de la perfusión fue inferior a los tres minutos. Desde el momento de la canulación el músculo se colocó dentro de un soporte de Kelf en forma de anillo, construido especialmente para adaptarse a la cámara interna del calorímetro. Seguidamente se introdujo en el ventrículo izquierdo un globo de látex de volumen regulable, conectado a través de una cánula a un transductor de presión Statham tipo P23 Db, cerrando dicho ventrículo por medio de una sutura.

Luego de concluida esta operación, el músculo incluido en el soporte fue introducido en un calorímetro como el que se muestra en la Figura 1 y se le conectaron los electrodos de estimulación. La frecuencia de estimulación se controló mediante un estimulador Grass SD 9.

Los músculos fueron perfundidos dentro del sistema calorimétrico a $6.0 \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ con una solución de Krebs a diferentes temperaturas de acuerdo al protocolo experimental realizado.

Al finalizar cada experimento se removió el tejido del calorímetro y se le extrajo el agua superficial con papeles de filtro. Luego se pesó en un recipiente previamente tarado y secado a $110 \text{ }^\circ\text{C}$ hasta peso constante a fin de obtener el porcentaje de agua tisular.

2. Mediciones miotérmicas y mecánicas simultáneas

Las mediciones miotérmicas se realizaron utilizando el sistema calorimétrico mostrado en la figura 1. Si bien los detalles de la construcción y métodos de calibración del sistema calorimétrico han sido publicados "in extenso", estos se presentarán a continuación en forma resumida (12;47;57).

El calorímetro que se muestra en la Figura 1 está confeccionado en cobre. Ha sido mejorado con respecto al original en sensibilidad y velocidad de respuesta. Utiliza dos juegos de unidades termosensibles (Cambion-Cambridge Thermoionic) cada una con 127 unidades conectadas en serie y ubicadas entre la cámara interna y la gran masa de cobre. El calorímetro se sumerge en un baño termostatzado que es controlado por un baño de agua (frío-calor) que regula en $\pm 0.003 \text{ }^\circ\text{C}$, y en el cual se mantiene en equilibrio térmico la solución de perfusión. El músculo, perfundido con la solución térmicamente equilibrada y montado en el soporte de Kel-F, se coloca en la cámara interna del calorímetro. La producción de calor se evalúa entonces por la diferencia de temperatura entre las paredes internas (en contacto con el músculo) y externas (en

contacto con el baño termostático) del calorímetro. La señal de las unidades termosensibles fue convenientemente amplificada y registrada sobre un polígrafo Grass modelo 7H. El hecho de que las mediciones de flujo de calor entre el baño y la cámara interna sean diferenciales hace que la respuesta calorimétrica para una

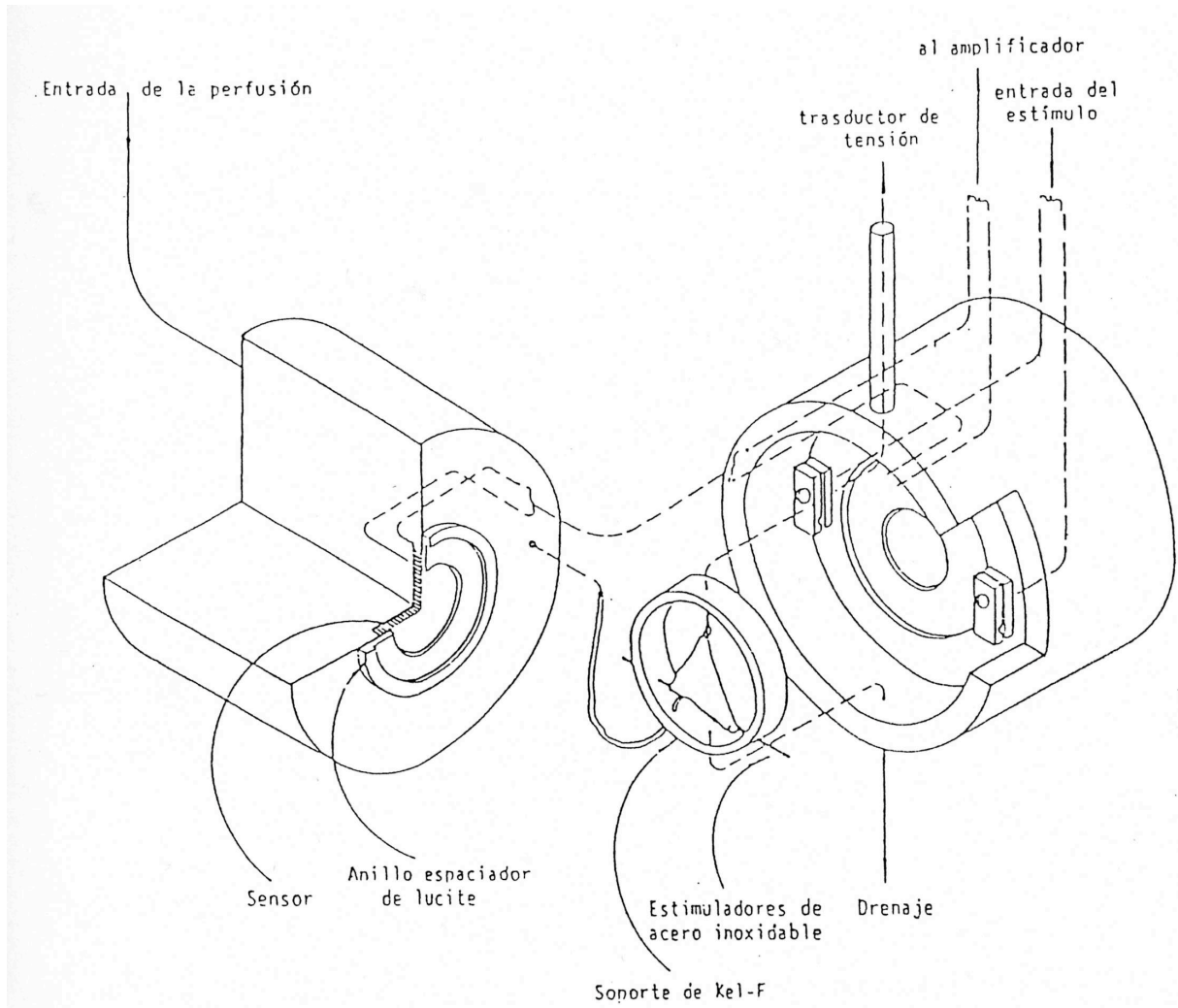


Figura 1: Diagrama del cuerpo calorimétrico. El calorímetro, una vez cerrado, se sumerge en un baño termostático que por simplicidad del dibujo no se muestra en el diagrama.

cantidad fija de calor, sea independiente de la temperatura a la que se realizan las mediciones.

Cuando cantidades conocidas de calor son aplicadas a la cámara interna del calorímetro, las unidades termosensibles responden en proporción a la potencia aplicada. Si la adición de energía es mantenida, el flujo de calor alcanza un nuevo estado estacionario visualizado como un "plateau" en el registro. En el rango de perfusión utilizada en las distintas preparaciones, la respuesta calorimétrica alcanzó un "plateau" dentro de los dos minutos (constante de velocidad $\sim 0.03 \text{ s}^{-1}$).

La calibración del calorímetro se llevó a cabo por dos métodos. Por pasaje de una onda de 2.1 kHz a través del músculo por medio de los electrodos de estimulación según el método descrito por Ponce-Hornos, Ricchiuti y Langer (47) y por pasaje de una corriente continua a través de una resistencia de valor conocido y calculando la potencia por la relación I^2R , donde I es la corriente y R la resistencia. Los valores obtenidos por ambos métodos fueron coincidentes. Se utilizó rutinariamente el primero de ellos porque permite realizar calibraciones en cualquier momento durante el experimento, aún teniendo al músculo bajo estimulación (47). Estas calibraciones permiten obtener factores (factores de conversión) que permiten convertir deflexiones obtenidas en el polígrafo en potencias conocidas (es decir, en liberación de calor por unidad de tiempo). Una misma cantidad de calor liberada en la cámara del calorímetro producirá una distinta deflexión de la aguja del polígrafo según haya o no perfusión al sistema. De esta manera, se obtienen factores de conversión obtenidos en presencia de perfusión (factores "húmedos", F_h) y en ausencia de la misma (factores "secos", F_s). Sin embargo, la suspensión de la perfusión no produce el cambio inmediato desde el F_h al F_s . Por ese motivo se estudió la variación del factor de calibración en función del

tiempo de interrupción de la perfusión. Para ello, en una serie de 5 experimentos se interrumpió la perfusión en presencia y en ausencia de una potencia conocida aplicada en el interior del calorímetro. De la diferencia punto a punto entre ambas señales calorimétricas resultó el cambio de la señal de la potencia debida solamente al cambio del factor de calibración. De estas calibraciones se dedujo la siguiente fórmula que refleja la evolución temporal del cambio de un factor a otro:

$$F_s(t) = F_h(e) * \{ 1 - 0.56 * [1 - \exp(-0.0195 * t)] \}$$

donde:

t = tiempo

$F_h(e)$ = f_h estable, luego de un t "infinito" de iniciada la perfusión

Por otra parte, la perfusión entra al calorímetro con una cantidad finita de energía dada por el producto entre la presión de perfusión y el flujo. Esta energía es disipada como calor en la cámara interna del calorímetro por lo que esta contribución debe sustraerse a las mediciones calorimétricas. La misma se evaluó como (47):

$$H_{pp} = 0.0022 \cdot PP \cdot V + 0.009$$

donde:

H_{pp} = cantidad de calor medido dependiente de la presión y del flujo (mW)

PP = presión de perfusión (en mm de Hg)

V = flujo ($\text{ml} \cdot \text{min}^{-1}$)

La presión de perfusión a la entrada del calorímetro (justo antes de la cánula de perfusión) se registró durante todo el experimento utilizando un transductor de presión Statham P23 Db cuya señal fue recogida en uno de los cuatro canales del polígrafo

Grass 7H. El flujo se mantuvo constante durante cada experimento mediante una bomba peristáltica Gilson Minipuls 2.

La generación de presión en la cavidad ventricular se registró también a través de un transductor de presión idéntico al utilizado para la presión de perfusión, que fue conectado a uno de los canales del polígrafo. El cuarto canal se utilizó para derivar la señal recibida por este transductor. Tanto las mediciones mecánicas como energéticas presentadas en este trabajo fueron realizadas a un volumen intraventricular óptimo para la generación de fuerza, que se determinó al comienzo de cada experimento.

El calor liberado por cada contracción o calor activo ($H'a$) se evaluó por la diferencia entre el calor producido durante la estimulación bajo estado estacionario (H_t) y el producido en ausencia de estimulación (H_r). Luego esta diferencia se dividió por la frecuencia (f) a la que el músculo fue estimulado:

$$(H_t - H_r) / f = H_a / f = H'a$$

En resumen, este método permite un completo control de un importante número de parámetros como frecuencia de estimulación, temperatura de trabajo, composición del líquido de perfusión, caudal de perfusión etc.

Por otra parte, es posible registrar continua y simultáneamente: a) presión de reposo (**PR**), b) máxima presión desarrollada (**Pmax**), c) velocidad máxima de contracción (**+P**), d) velocidad máxima de relajación (**-P**), e) presión de perfusión (**PP**), f) producción de calor total (**Ht**), g) producción de calor asociada al reposo mecánico (**Hr**). Además de estos parámetros mecánicos y energéticos se evaluaron tiempos característicos del evento contráctil (figura 2): desde el inicio de la contracción hasta la máxima velocidad de contracción (**tc1**), desde +P hasta que la presión generada se hace máxima (**tc2**), desde este punto hasta la máxima velocidad de relajación (**tr1**), y

finalmente desde -P hasta el fin de la contracción (**tr2**). Resulta entonces que el tiempo hasta que se produce la tensión pico (**tTP**) es la suma de tc1 y tc2 y que tiempo total de relajación (**tR**) la suma de tr1 y tr2.

Se calcularon también las relaciones +P/P y -P/P como índices de las capacidades de contracción y relajación del tejido independientes de los cambios producidos en la presión desarrollada.

Los registros mecánicos para determinar los tiempos de contracción de latidos individuales fueron realizados a una velocidad de papel de 50 mm.s⁻¹.

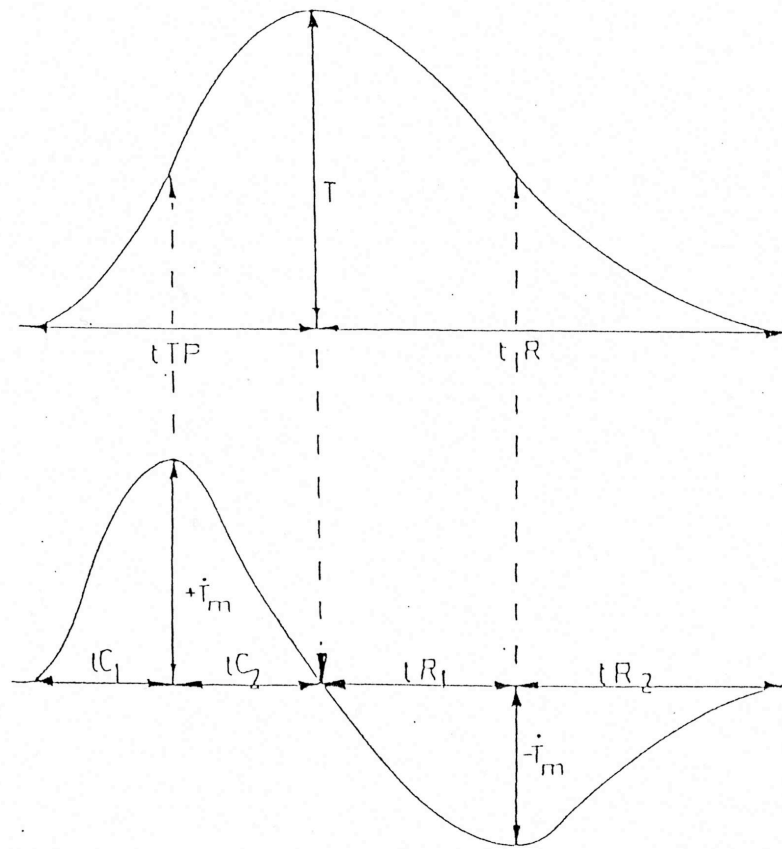


Figura 2: Representación esquemática de un trazado de tensión isométrica (parte superior) y su primera derivada (parte inferior). La representación es equivalente a la que se obtiene de un trazado de desarrollo de presión en condiciones isométricas. En la figura se indican los parámetros mecánicos evaluados. T: máxima tensión desarrollada; +T: máxima velocidad de desarrollo de la fuerza; -T: máxima velocidad de relajación; tTP: tiempo a la tensión pico, que incluye tC1 y tC2; tR: tiempo de relajación, que abarca tR1 y tR2.

3. Soluciones

La solución que se utilizó para la perfusión en condición control contenía (en mmoles/l): NaCl 128.3; KCl 6.0; CaCl₂ 0.8; SO₄Mg 1.05; NaHCO₃ 25; NaH₂PO₄ 0.35 y glucosa 11. El estudio del calor de reposo (Hr) y las contracciones aisladas durante la isquemia se realizó con una solución de perfusión similar pero con una cantidad menor

de CaCl_2 (0.5 mM). Todas las soluciones fueron continuamente burbujeadas con una mezcla gaseosa que contenía 95% de O_2 y 5% de CO_2 (Ph 7.3 - 7.4).

La perfusión con BDM, un inhibidor de la actividad actomiosínica, se realizó con el mismo líquido de perfusión descripto.

Para la concentración de calcio de 0.8 mmoles/l se calculó que la actividad de Ca^{++} se encuentra entre 0.205 y 0.225. El calculo se realizó utilizando el programa IONMIX (86).

4. Estadística

Se utilizó el criterio de cuadrados mínimos tanto para los ajustes de los puntos obtenidos a partir de los registros calorimétricos temporales como para las regresiones entre dos parámetros experimentales. Para los ajustes no lineales se utilizó un programa basado en el algoritmo de Marquardt (CRISP software). Las rachas surgidas de los ajustes se estudiaron por medio de un test de signos (136) y las comparaciones entre ajustes obtenidos con diferente número de componentes se hicieron por un test de Fisher (136).

Para las comparaciones de tipo apareado se utilizó un test de "t" para muestras apareadas. Para las comparaciones no apareadas entre grupos se utilizó Anova de 1 factor. En todos los casos se consideró significativo el nivel de $p < 0.05$. Todos los resultados se expresan en forma de media \pm error estándar (**ES**).

Los resultados calorimétricos se expresan por gramo de tejido seco salvo que se indique lo contrario.

Los resultados mecánicos se expresan en miliNewton por milímetro cuadrado (mN/mm²).

5. Protocolos experimentales bajo estimulación estacionaria

Antes de montar el músculo en la cámara del calorímetro, se obtuvieron registros de las variaciones de calor que producen en la misma el inicio y la suspensión de la perfusión (líneas de base). Los valores obtenidos fueron, en la etapa de reducción de los datos, sustraídos de aquellos tomados durante la reperfusión e isquemia cardíacas.

Una vez montado el músculo en la cámara calorimétrica se lo llevó a la longitud óptima para la generación de presión, aumentando paulatinamente el volumen del balón de latex inserto en el ventrículo izquierdo (VI). Luego se esperó un mínimo de una hora para empezar con el experimento, que es el tiempo que asegura la reestabilización del sistema. Durante todo este lapso se perfundió con una solución que contenía 0.5 mM de Ca⁺⁺. Luego de este período, se cambió el líquido de perfusión por uno que contenía 0.8 mM de Ca⁺⁺. En aquellos corazones que se encontraban en arresto mecánico, se determinó entonces el Hr y luego se inició la estimulación eléctrica con pulsos cuadrados de 5 ms a 1.5 Hz. Se utilizó un voltaje de estimulación 20% superior al voltaje umbral, por lo que la estimulación usualmente resultó de 5V.

Cuando la producción de calor y los parámetros mecánicos llegaron a un estado estacionario (a la frecuencia de estimulación de 1.5 Hz) se obtuvieron trazados mecánicos a alta velocidad (50 mm/s). De este modo fué posible registrar el desarrollo de presión de un latido individual. Una vez registrados los parámetros mecánicos y

miotérmicos en el estado estacionario (situación preisquémica) se procedió a la suspensión total del flujo para producir isquemia (**Isq**) global sobre el músculo. El reinicio del flujo sobre el corazón da lugar a la reperfusión (**Rep**). Durante todo el tiempo que dura el experimento se realizan registros de la actividad mecánica y de producción de calor por parte del músculo.

De acuerdo a la preparación antes descrita, se estudió mecánico-energéticamente la Isq y Rep (45 minutos cada una) en los siguientes grupos experimentales:

Grupo 35 (**C35**): miocardios de rata a los que se les practicó Isq y Rep a 35 °C.

Grupo 30 (**C30**): miocardios de rata a los que se les practicó Isq y Rep a 30 °C.

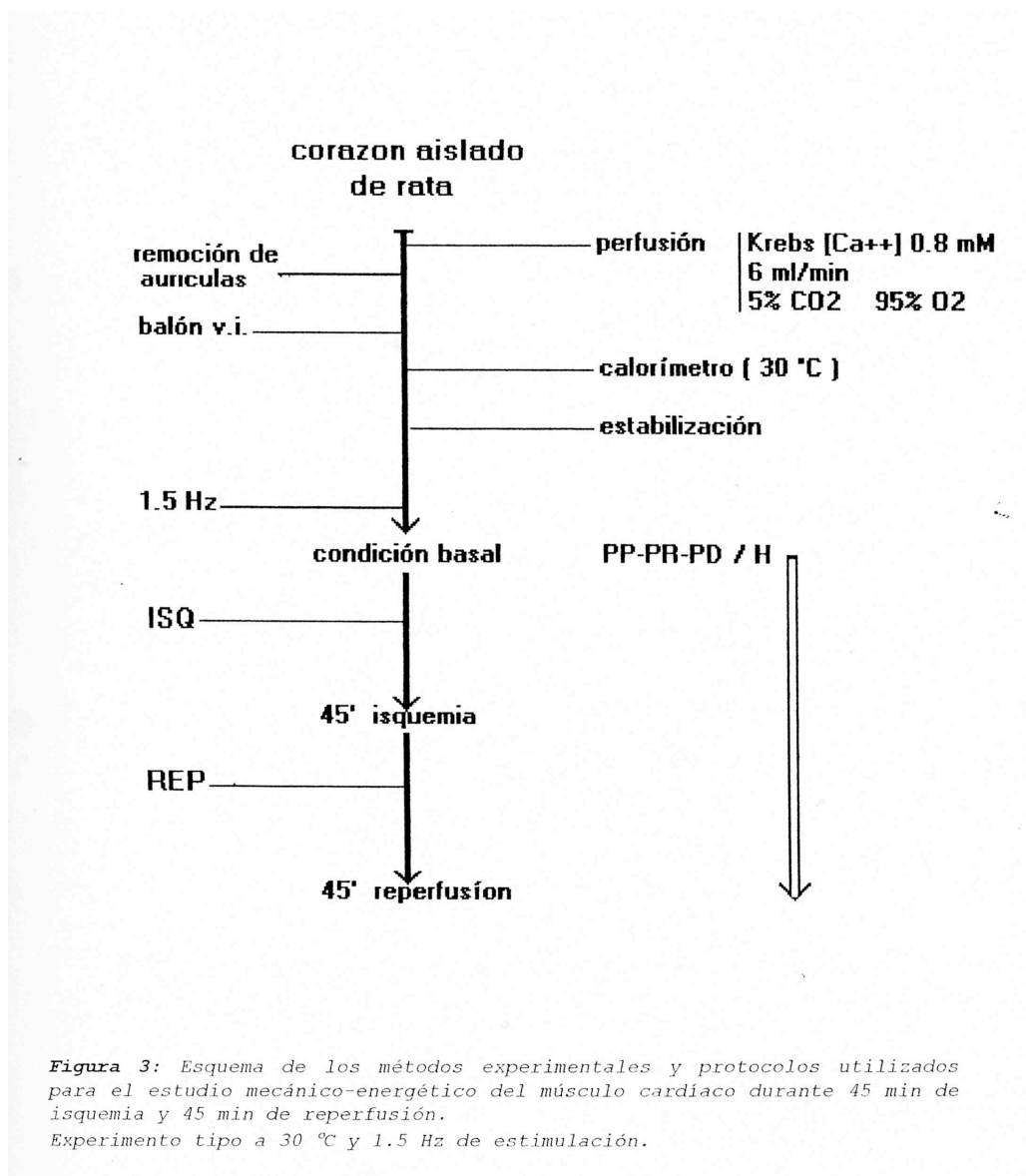
Grupo 25 (**C25**): miocardios de rata a los que se les practicó Isq y Rep a 25 °C.

Un esquema de los métodos experimentales y protocolos utilizados (se tomo como referencia un protocolo a 30 °C) puede verse en la Fig.3.

6. Estudio del calor de reposo (Hr)

Para estudiar la evaluación del calor de reposo (Hr) durante la isquemia se siguieron los mismos pasos iniciales que en condiciones de estimulación estacionaria a 1.5 Hz. Una vez que el músculo fue llevado a su longitud óptima, se suspendió la estimulación eléctrica y se dejó estabilizar el preparado durante 30 min. Se perfundió durante todo el tiempo con una solución Krebs a 25 °C conteniendo 0.5 mM de Ca⁺⁺ y, alcanzados parámetros mecánicos y miotérmicos estables, se suspendió la perfusión. En estos casos el período de isquemia analizado fué de 20 min.

Con el objeto de estudiar la fase inicial de la reperfusión, se realizó una serie de experimentos en ausencia de estimulación eléctrica. Se siguieron los mismos pasos iniciales que para el estudio del Hr, pero los músculos fueron perfundidos durante los 15 min previos a la Isq y 45 min de Rep con un Krebs conteniendo 10 mM de BDM (2,3-Butanedione Monooxima) marca Sigma. Esta droga actúa inhibiendo la interacción actomiosínica.



7.- Estudio de contracciones aisladas

El efecto de la isquemia sobre las contracciones aisladas se estudió en 5 músculos. Pasado un período inicial de estabilización de 30-40 min sin estimulación eléctrica, en Krebs-6 mM K y 0.5 mM Cl_2Ca perfundido a razón de 6 ml/min, el músculo se estimuló a 0.167 Hz con pulsos de aproximadamente 5 V-5 ms y se llevó a longitud óptima. Alcanzado el estado estacionario, se suspendió la estimulación y se esperó 30 min hasta el establecimiento de un estado de reposo estable. En estas condiciones se midió el calor de reposo (*Hr*). A continuación se efectuaron latidos aislados con pausas entre latidos de al menos 5-10 minutos. Los registros miotérmicos de un latido se efectuaron a alta sensibilidad (mínima señal registrada de 40 μV y un ruido eléctrico de 1 μV a máxima ganancia) y velocidad de papel (25 a 50 mm/s) a fin de captar las oscilaciones en el flujo de calor.

Una vez realizadas varias contracciones aisladas en presencia de perfusión (controles) y determinado el calor de reposo control (*Hr*) se inició la isquemia interrumpiendo la perfusión. Se registró el cambio de la señal calorimétrica y se efectuaron 2 contracciones aisladas en los 10 primeros min de isquemia.

A partir de la diferencia entre la señal calorimétrica producida por el músculo al cortar la perfusión y la producida por el corte de perfusión en ausencia de músculo, y teniendo en cuenta el factor de calibración calorimétrico, se obtuvo el calor de reposo (en mW/g) durante la isquemia. El calor total liberado por latido (en mJ) se midió como el área bajo la curva de flujo de calor encima de la línea de base correspondiente al reposo mecánico.

La digitalización de la señal calorimétrica se efectuó ya sea manualmente o por adquisición mediante un convertidor A/D (Data Translation DT 2808), a frecuencia de 25 puntos. s^{-1} durante los primeros 10 s y de 2.5 puntos. s^{-1} durante el resto del registro.

Las curvas digitalizadas a mano se corrigieron por curvatura del registro del polígrafo y se interpolaron los puntos de la línea de base de acuerdo a los trazados de calor de reposo (en contracciones aisladas). Cuando ajustes no lineales con diferente número de componentes fueron aplicados a una misma curva de flujo de calor vs. tiempo, y los coeficientes de correlación fueron comparables, la bondad del ajuste se evaluó mediante la prueba Fisher para las respectivas varianzas (136).

Las respuestas miotérmicas obtenidas con latidos aislados pudieron ser ajustadas a una combinación lineal de funciones del tipo dado por la Ec. 1 (134). El análisis asume que todos los componentes de generación de calor se inician simultáneamente a tiempo cero. El método ajusta simultáneamente "n" componentes cuya función de ajuste está basada en una ecuación de tipo difusional para lámina plana con retardo exponencial en la detección por parte de las unidades termosensibles (143) (Ec.1):

$$\dot{H}_t = \dot{H}_o \cdot (1-D) \cdot e^{-(t.t)} \quad (1)$$

donde, para simplificar la ecuación, D representa la función difusional:

$$D = \sum_{i=0}^{\infty} [A_i \cdot e^{-\beta \cdot t} \cdot 8 \cdot p^{-2} \cdot S \cdot A_i \cdot e^{-a_i \cdot t}]$$

donde:

$$A_0 = (m \cdot 4 \cdot p^{-2} \cdot \beta^{-1})^{0.5} \cdot \text{tg}[(m \cdot 4 \cdot p^{-2} \cdot \beta^{-1})^{0.5}]$$

m = constante de velocidad de enfriamiento de las unidades termosensibles

β = constante de retardo en la difusión

$$A_i = 1 / \{(2 \cdot i + 1)^2 \cdot [1 - (2 \cdot i + 1)^2 \cdot m \cdot \beta^{-1}]\}$$

$$a_i = (2 \cdot i + 1)^2 \cdot m$$

y t es un parámetro de ajuste.

Para un tiempo prolongado de estimulación (estado estacionario) H_t tiende a H_o , que es la potencia constantemente aplicada (47). Los valores de β y m variaron principalmente con el flujo de perfusión (rango de 0.02 a 0.04 s^{-1} para m y 0.3 a 0.6 s^{-1} para β) siendo ambos reproducibles para una dada condición.

Los registros de calor de latidos aislados fueron ajustados a una combinación lineal de 3 o 4 componentes. El número mínimo de componentes de cada registro se estableció por aplicación de la prueba de Fisher a los ajustes con distinto número de componentes. La liberación de calor de un latido aislado control pudo dividirse en cuatro componentes (134). Los registros miotérmicos de los latidos aislados isquémicos se ajustaron a 4 o a 3 componentes, dependiendo del tiempo de isquemia. Los parámetros m y β fueron estimados en cada músculo ajustando los enfriamientos calorimétricos posteriores a la aplicación mantenida de una onda sinusoidal de alta frecuencia (que no estimula al músculo). Los diversos m ajustados sobre el músculo resultaron similares al determinado por calibración de las unidades termosensibles con resistencia eléctrica ($0.030 \pm 0.002 s^{-1}$). La curva total del registro miotérmico de un latido aislado se ajustó hasta el comienzo del enfriamiento final.

Los componentes energéticos del registro miotérmico de un latido fueron denominados H1, H2, H3 y H4 de acuerdo a la secuencia en sus tiempos de evolución máxima (t_p) (Fig.4). Las energías de cada componente se calcularon a partir de la integral de la curva de generación de los mismos hasta el t_p , más la integral de su correspondiente enfriamiento calorimétrico (134).

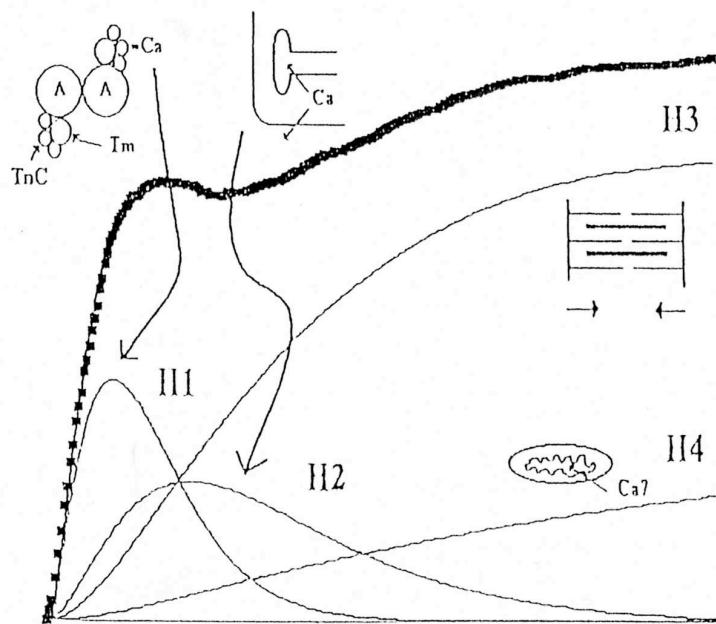


Figura 4: Respuesta miotérmica digitalizada correspondiente a una contracción aislada, ajustada a una combinación lineal de 4 funciones de tipo difusional; en condiciones normales de perfusión, los componentes así definidos pudieron relacionarse con eventos celulares que ocurren durante la contracción: H1 (primer componente): unión de calcio a sitios intracelulares como la Troponina C (Tn C); H2 (segundo componente): remoción del calcio citosólico y mantenimiento de la homeostasis iónica; H3 (tercer componente) : ciclaje actomiosínico; H4 (cuarto componente) : actividad mitocondrial calcio dependiente.

Resultados

Con el objeto de simplificar la exposición y análisis de los procesos observados, los resultados se expondrán en forma secuencial en dos partes. Aquellos correspondientes a los eventos que ocurren durante la isquemia estarán agrupados en la Parte A (Isquemia). Los resultados asociados a la reperfusión se incluirán en la Parte B (Reperfusión).

Un registro digitalizado del proceso completo, es decir, la respuesta miotérmica ante el corte de perfusión y posterior reinicio del flujo de perfusión, se representa en la Fig. 5.

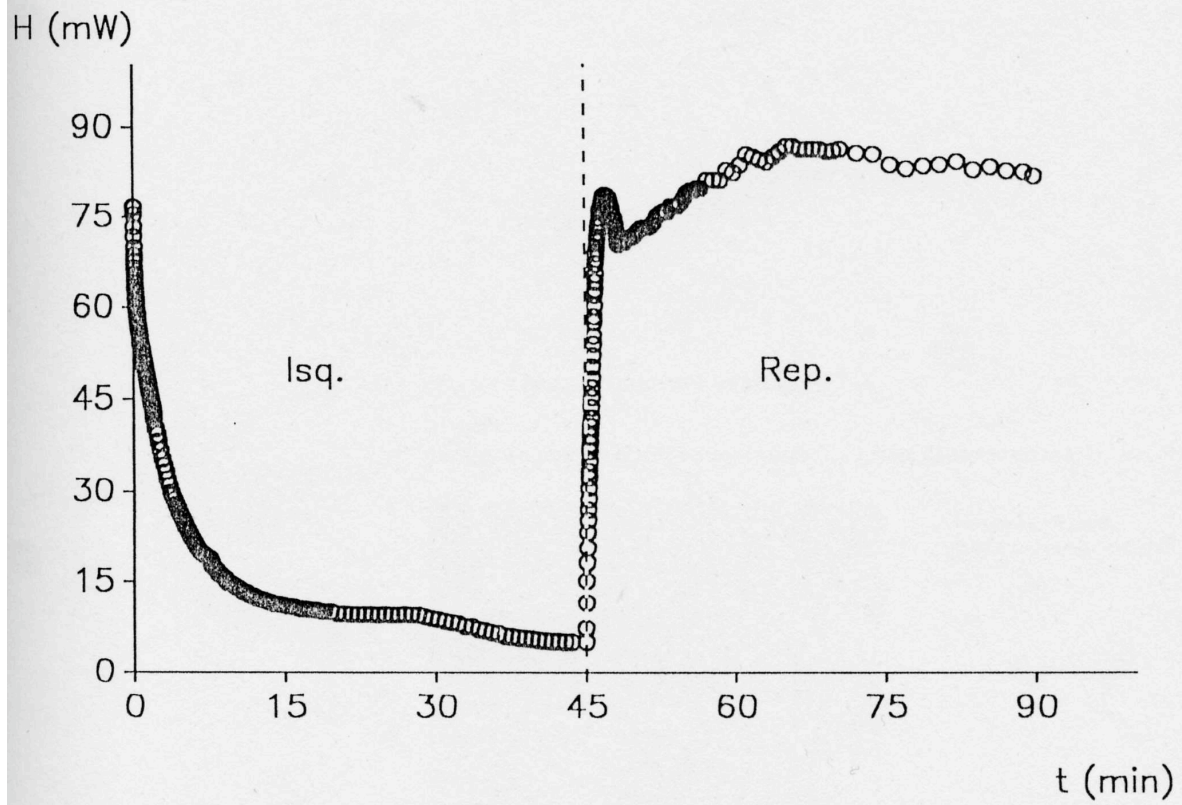


Figura 5: Evolución temporal de la producción de calor (H) de un músculo cardíaco durante 45 min de isquemia y 45 min de reperfusión en un experimento realizado a 30 °C. Isq.: isquemia. Rep.: reperfusión.

1. Isquemia

a) Evolución mecánica durante la isquemia

En la Tabla I se muestran los parámetros mecánicos promedio para los distintos grupos, previo al inicio de la isquemia (preisquémicos).

Los valores preisquémicos de +P fueron: $328 \pm 23 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para C25, y $365 \pm 21 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y $408 \pm 21 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para C30 y C35 respectivamente. Los valores de -P fueron de $167 \pm 11 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para C25, y $262 \pm 59 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ y $360 \pm 18 \text{ mN} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ para C30 y C35 respectivamente. La -P se incrementó con la temperatura, mostrando la activación que se produce en los mecanismos intervinientes en la relajación con la temperatura. La correlación lineal entre ambos parámetros fué: pendiente = $19.3 \text{ mN} / \text{mm}^2 \cdot \text{s}^2 \cdot ^\circ\text{C}$; ordenada al origen = $-317 \text{ mN} / \text{mm}^2 \cdot \text{s}$; $r = 0.867$; $p < 0.01$. La relación +P/-P también mostró una correlación significativa con la temperatura: ordenada al origen = 3.25; pendiente = $-0.06 / ^\circ\text{C}$; $r = -0.642$ ($p < 0.05$).

En la Tabla I, obsérvese la disminución de la Pmax con la temperatura. La Fig.6 muestra la correlación existente entre el aumento de la temperatura y la disminución de la Pmax.

Grupo	Pmax (mN/mm ²)	PR (mN/mm ²)	PP (mN/mm ²)	+P/-P
C25 (n=6)	32 ± 2	10 ± 1	20 ± 2	1.7 ± 0.1
C30 (n=5)	30 ± 3	9 ± 1	16 ± 1	1.5 ± 0.3
C35 (n=4)	24 ± 1	8 ± 1	16 ± 2	1.1 ± 0.1

Tabla I. Parámetros mecánicos preisquémicos a diferentes condiciones experimentales.

Valores promedios ± ES de la máxima presión desarrollada en condiciones isométricas por el ventrículo izquierdo (Pmax), la presión de reposo (PR), la presión de perfusión (PP) y la relación (+P/ -P) entre la máxima velocidad de contracción (+P) y la máxima velocidad de relajación (-P).

En la Tabla II se resumen los valores preisquémicos de los tiempos en los que se dividió el evento contráctil (ver Materiales y Métodos). Nótese los efectos del incremento de la temperatura en la evolución temporal de la contracción. Estos efectos son: una disminución del tiempo de relajación con un acortamiento en los tiempos en que se producen la máxima presión desarrollada y la máxima velocidad de contracción.

Grupo	t _{TP} (ms)	t _{ct} (ms)	t _R (ms)
C25 (n=6)	164 ± 8 #	90 ± 5	379 ± 28 *
C30 (n=5)	137 ± 9	82 ± 14	241 ± 17 **
C35 (n=4)	116 ± 9	69 ± 6	126 ± 2

Tabla II. Parámetros temporales preisquémicos a diferentes condiciones experimentales.

Valores promedios ± ES de los parámetros temporales de los diferentes eventos en los que se dividió la contracción (ver Métodos). T_{TP}, tiempo a la tensión pico; t_{ct}, tiempo hasta la máxima velocidad de contracción; t_R, tiempo de relajación; ms, milisegundos.

* p < 0.05 vs. C 30 y C35

** p < 0.05 vs. C25 y C35

p < 0.05 vs. C35

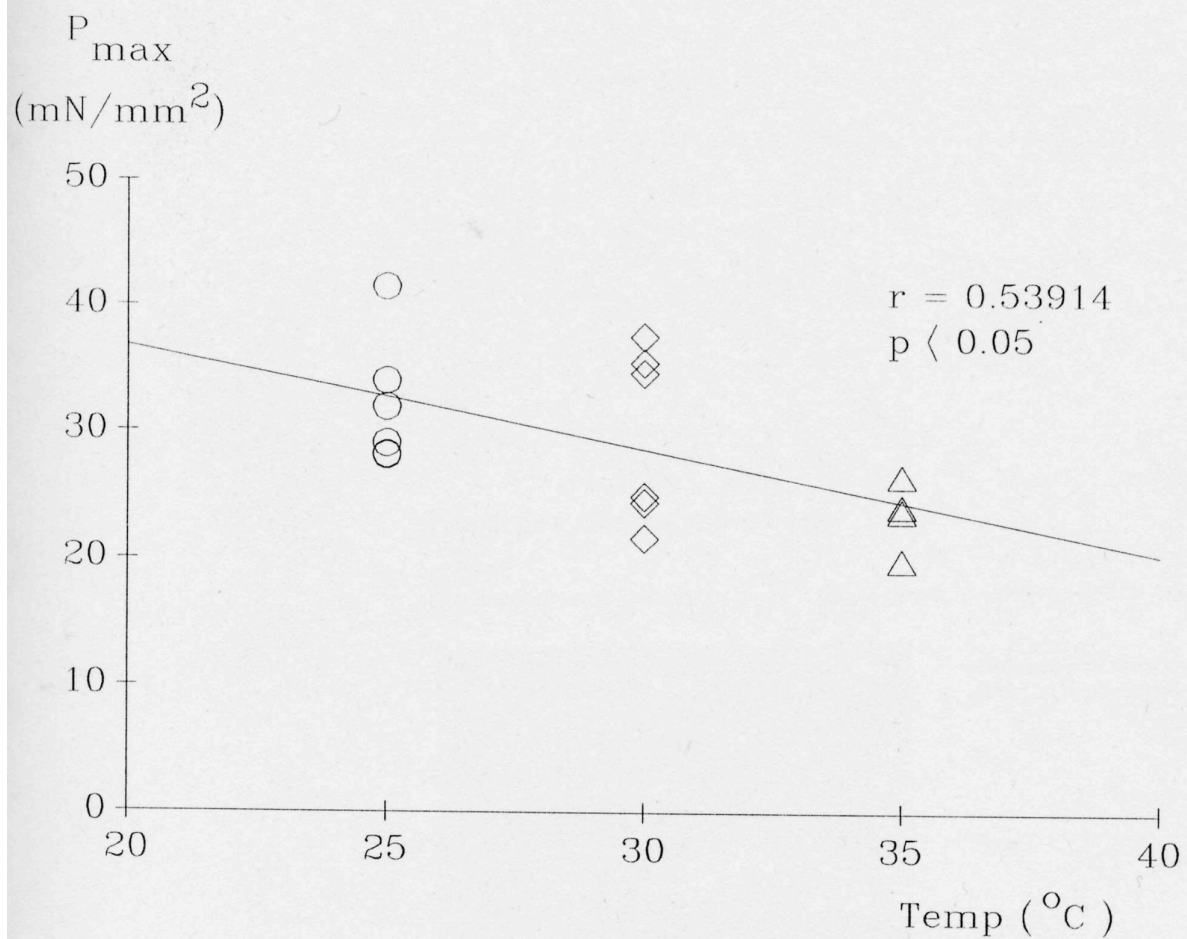


Figura 6: Máxima presión desarrollada (P_{max}) en función de las temperaturas de trabajo de los distintos grupos. La correlación entre ambos parámetros dió como resultado: Ordenada al origen: 53.3 mN/mm²; pendiente: -0.82 mN/mm²*°C. Nótese la disminución de la P_{max} con el aumento de la temperatura. (o): grupo C25; (◊): grupo C30; (Δ): grupo C35.

La suspensión de la perfusión produjo una rápida caída en la PP con un t_{50} de 0.8 ± 0.1 s que no fue diferente estadísticamente entre los distintos grupos. Un aspecto experimental que debe ser recordado aquí es que la estimulación eléctrica a 1.5 Hz con pulsos de 5 V y 5 ms de duración no fue suspendida durante el período isquémico. Esto es importante ya que implica que los mecanismos asociados a la excitación muscular permanecen activos. En consecuencia, existe una fracción de energía liberada asociada a los mismos. Como resultado de la aplicación de la isquemia global, los músculos disminuyeron el desarrollo de P hasta su desaparición. El tiempo hasta la desaparición del registro de la P es variable y la cinética de la caída de la Pmax fue estudiada en todos los grupos. Debe hacerse notar que para el análisis de la P la amplificación de registro fue incrementándose a medida que la P disminuía. La desaparición de la misma se verificó a una multiplicación 20 veces mayor que la utilizada para el registro de la condición control.

La evolución de la Pmax durante la isquemia pudo ser representada por la suma de 2 funciones exponenciales del tipo:

$$F(t) = A_r * \exp(-\beta_r * t) + A_l * \exp(-\beta_l * t) \quad (\text{Ec.1})$$

donde:

t = tiempo

A_r = factor preexponencial de la componente "rápida"

β_r = cte de velocidad de la componente "rápida"

A_l = factor preexponencial de la componente "lenta"

β_l = cte de velocidad de la componente "lenta"

La Fig. 7 muestra la evolución de la Pmax durante la isquemia de un experimento tipo a 25 °C, y su ajuste a la suma de 2 funciones exponenciales. Las constantes de tiempo de estas funciones difirieron marcadamente (alrededor de 5 veces mayor una

que la otra), por lo que nos referiremos a la existencia de una función exponencial "rápida" y una función exponencial "lenta".

Como se ha discutido previamente (ver Introducción), los eventos que ocurren durante la isquemia son dependientes de la temperatura. Se aplicó la Ec.1 a todos los experimentos realizados a distintas temperaturas.

En la tabla III se muestran los valores medios de las constantes de velocidad resultantes del ajuste no lineal de los datos experimentales a una ecuación del tipo de la Ec.1. Se observa que existe un incremento de las constantes de velocidad "lentas" (β_1) con la temperatura de trabajo. Los β_r , por su parte, no fueron influenciados por la temperatura.

Del estudio de la relación entre las constantes de velocidad "lentas" y la temperatura, se obtuvo un comportamiento lineal entre ambas variables, lo que se muestra en la Fig. 8. A partir de la recta calculada se obtiene el coeficiente Q_{10} para el cambio de β_1 en función de la temperatura, según la ecuación (24):

$$Q_{10} = \text{antilog} (10/(T_1 - T_2) * \log K_1/k_2)$$

donde:

T_1 y T_2 son las temperaturas usadas

K_1 y K_2 son los valores de los parámetros estudiados a las temperaturas T_1 y T_2

Dicho Q_{10} resultó ser de 1.43, valor que es bajo para procesos de tipo metabólico.

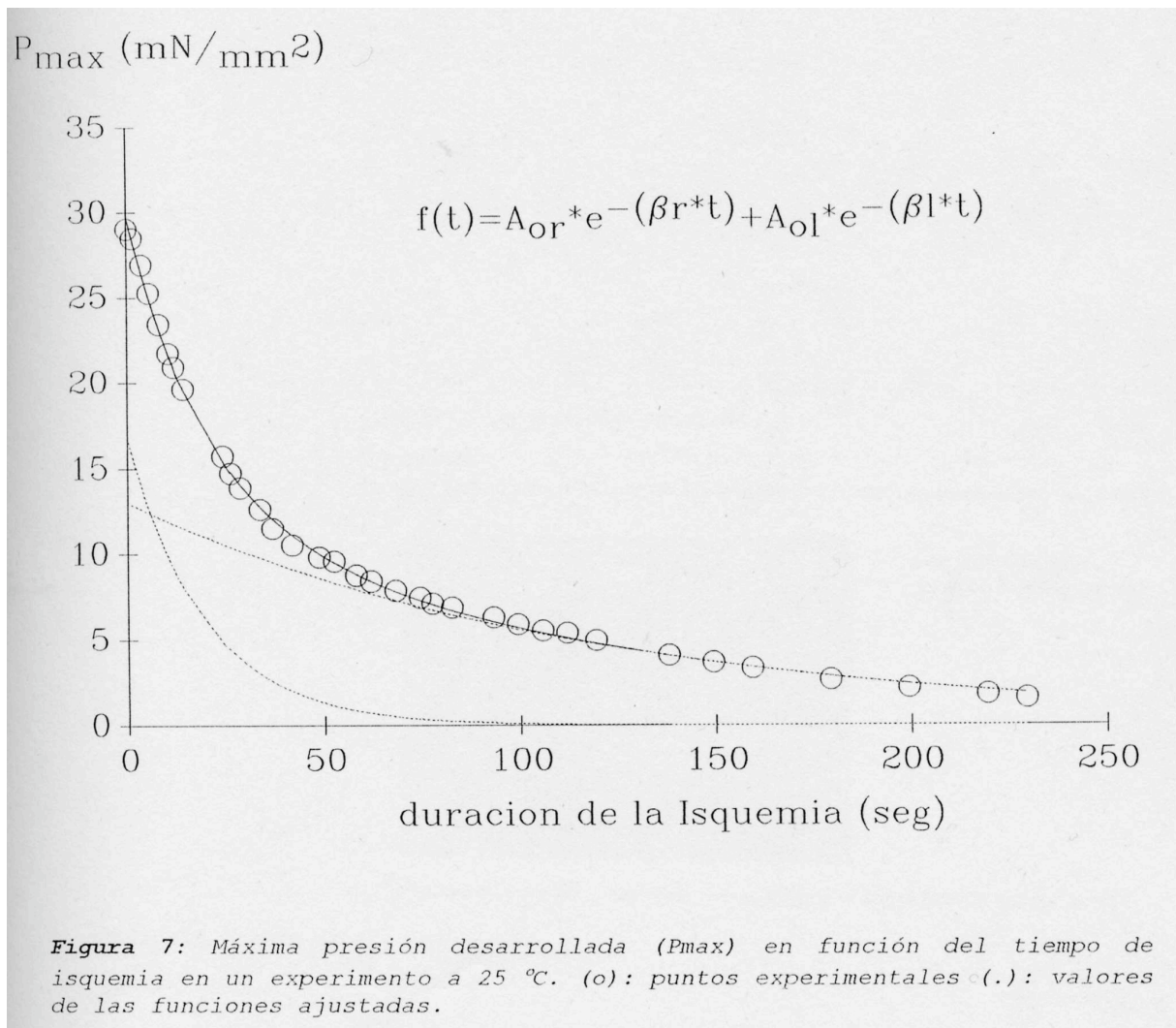
Dado que la P_{max} durante la isquemia responde a una ecuación del tipo de la Ec.1, los procesos involucrados pueden estudiarse como regidos por 2 componentes cuyos valores a $t=0$ se evalúan a partir de los productos:

$$\beta_r * A_{r/f} (C1)(\text{componente "rápido"})$$

y

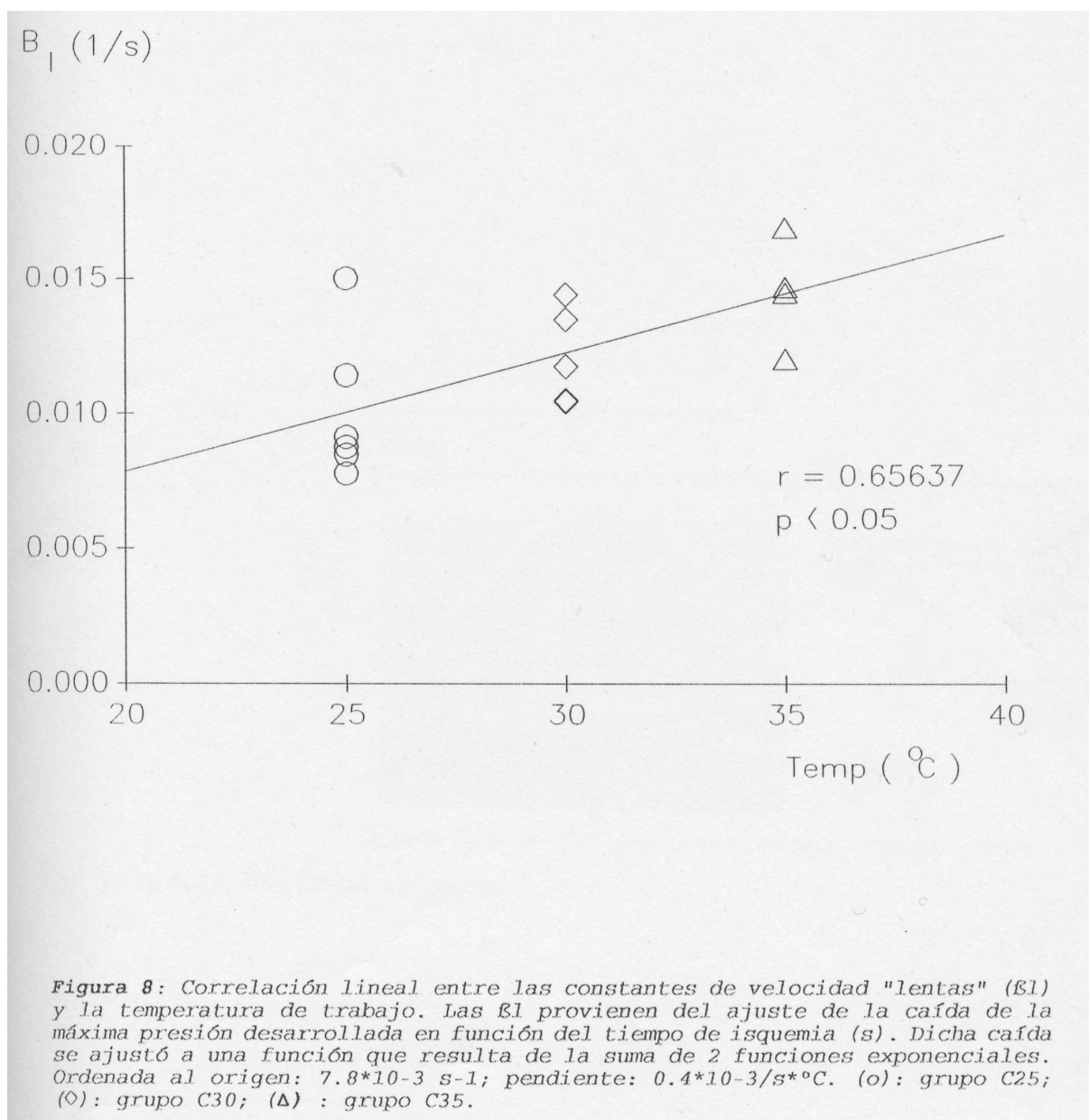
$$\beta_1 * A_{l/f} (C2)(\text{componente "lento"})$$

donde f es la frecuencia de estimulación.



Grupo	τ_l (s ⁻¹)	τ_r (s ⁻¹)
C25 (n=6)	$(10.1 \pm 1.1) \times 10^{-3}$	$(50.6 \pm 7.0) \times 10^{-3}$
C30 (n=5)	$(12.1 \pm 0.8) \times 10^{-3}$	$(58.8 \pm 11.8) \times 10^{-3}$
C35 (n=4)	$(14.5 \pm 0.1) \times 10^{-3}$	$(157.2 \pm 61.1) \times 10^{-3}$

Tabla II. Constantes de velocidad de la disminución de la P_{max} (máxima presión desarrollada) durante la isquemia. Valores promedios \pm ES de las constantes de velocidad “lentas” (τ_l) y “rápidas” (τ_r) correspondientes a una función del tipo suma de dos funciones exponenciales.



Puede entonces interpretarse a C1 y C2 (componentes "rápidos" y "lentos" respectivamente) como una medida de la contribución de cada componente en el desarrollo de la Pmax en un latido en condiciones control (137).

La tabla IV muestra los valores medios de C1 y C2 para los distintos grupos. Nótese que, en cada grupo, C1 y C2 difieren marcadamente ($p < 0.01$).

La Fig. 9 muestra, mediante un gráfico de barras, las medias de los productos C1 y C2 a las diferentes temperaturas.

La evolución de la PR muestra que esta experimenta profundos cambios a lo largo de los 45 min de isquemia. Su estudio permite distinguir de 3 a 4 fases, dependiendo de la temperatura de trabajo. Tanto el número de fases como la magnitud de los cambios observados y la duración de algunos de ellos mostraron variaciones con la temperatura (Fig. 10). En general para todas las temperaturas estudiadas se registra: a) una fase inicial de caída relativamente rápida (**fase 1**) b) una fase de mantenimiento de los valores de PR alcanzados al final de la fase 1 (**fase 2**) y c) un período de rápido aumento hasta alcanzar un valor máximo (**fase 3**). Si bien a 25 °C no se observa, a 30 y 35 °C se registra una fase de caída con respecto al valor máximo alcanzado durante la fase 3 (**fase 4**). Esta caída es más notoria a mayores temperaturas (ver Fig. 10, B y C). El incremento de la temperatura no modificó ni la magnitud (ver Tabla V) ni el tiempo de ocurrencia de la fase 1, que finalizó en 44 ± 6 s en todos los grupos. Además, a temperaturas mayores se acortó el tiempo en que la PR se mantiene estable (fase 2), aumentaron los máximos valores porcentuales de PR alcanzados durante la fase 3 y se acortó el tiempo en que se alcanzan los mismos (ver Tabla V).

Grupo	C1 (mN/mm ²)	C2 (mN/mm ²)
C25 (n=6)	0.52 ± 0.04 #	0.11 ± 0.02
C30 (n=5)	0.61 ± 0.18 #	0.13 ± 0.02
C35 (n=4)	0.69 ± 0.09 #	0.15 ± 0.03

Tabla IV. Componentes “rápidas” y “lentas” de la caída de la P_{max} durante la isquemia.

Valores promedios ± ES de los productos “rápidos” y “lentos” (C1 y C2) calculados como $\frac{1}{f} \times Ar/f$ y $\frac{1}{f} \times Al/f$ respectivamente.

p<0.05 vs C2

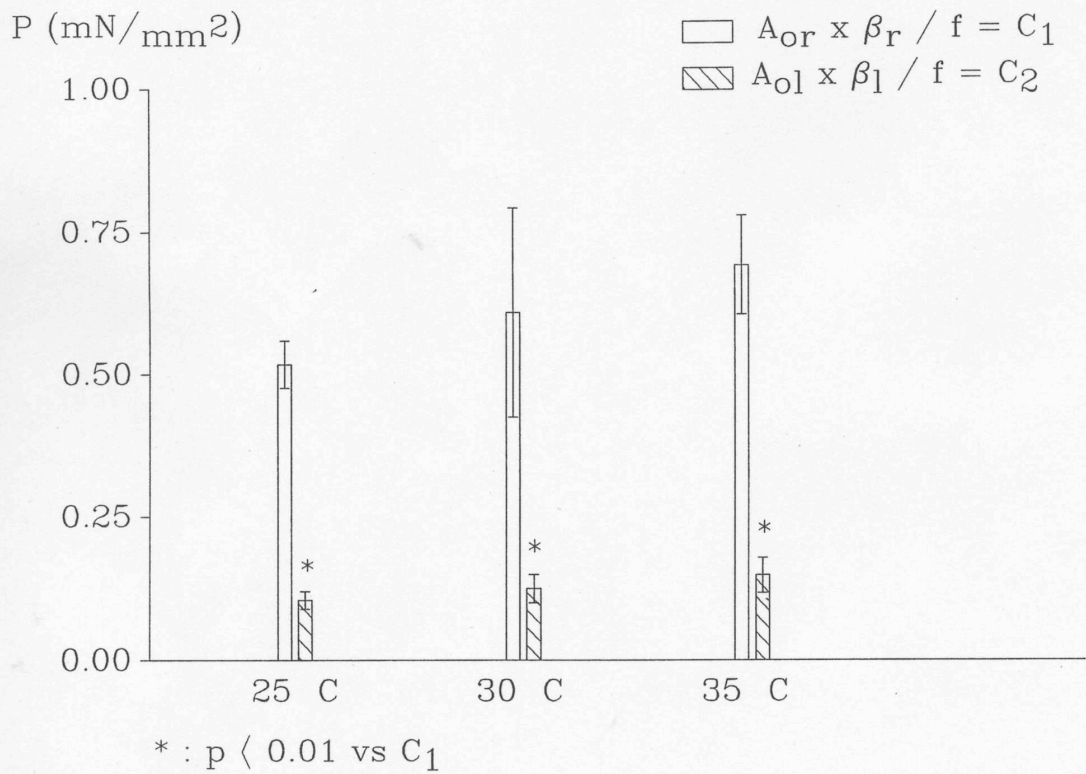


Figura 9: Componentes "rápidas" (C_1) y "lentas" (C_2) de caída de la máxima presión desarrollada (P_{max}) durante la isquemia a 25, 30 y 35 °C. A_r , A_l , β_r y β_l : parámetros obtenidos de ajustar la P_{max} en función del tiempo de isquemia a la suma de 2 funciones exponenciales. f : frecuencia de estimulación (1.5 Hz).

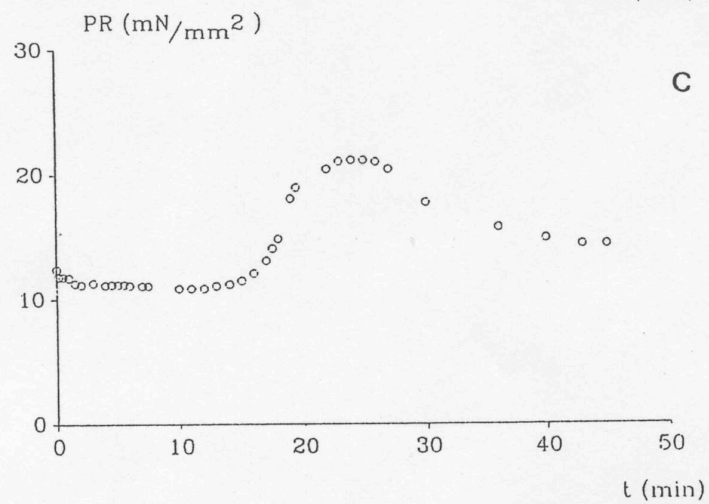
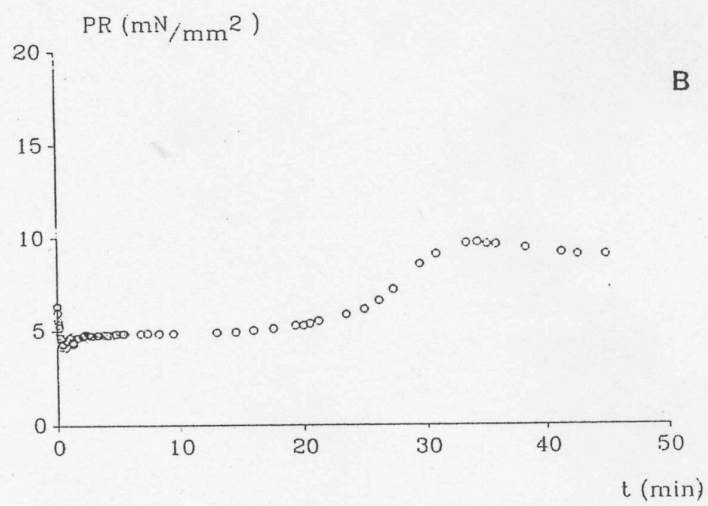
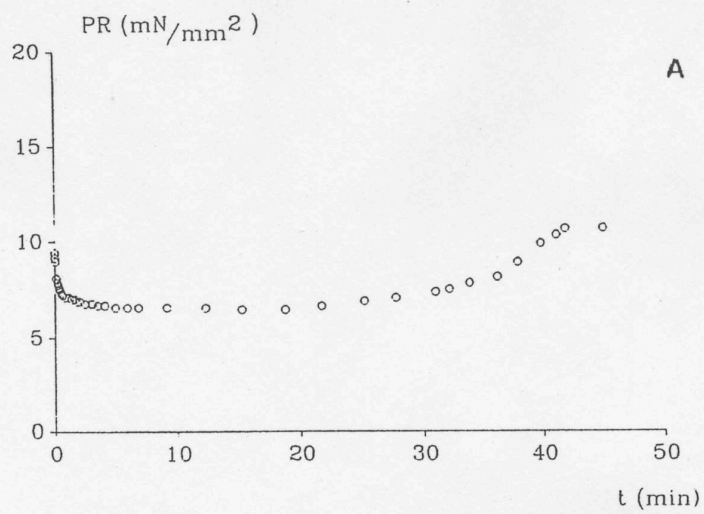


Figura 10: Evolución de la presión de reposo (PR) en función del tiempo de isquemia en experimentos a 25, 30 y 35 °C (A, B y C respectivamente). Obsérvese, en B y C, la disminución de la PR durante los últimos minutos de isquemia (fase 4 de la evolución de la PR durante la isquemia).

Grupo	% caída Fase 1 (%)	T _{fin} Fase 2 (min)	t _{PRMAX} Fase 3 (min)	%cambio Fase 3 (min)	%caída Fase 4 (min)
C25 (n=6)	-24.4 ± 5.1	30.3 ± 3.0 *	45.0 ± 0.0	59.7 ± 7.2 *	0.0 ± 0.0 *
C30 (n=5)	-36.0 ± 3.6	22.7 ± 1.6 #	36.1 ± 1.5 #	129.2 ± 40.6 #	-5.5 ± 1.1 #
C35 (n=4)	-40.0 ± 8.8	13.8 ± 0.5	24.4 ± 0.5	141.7 ± 35.5	-36.1 ± 7.1

Tabla V. Parámetros característicos de la evolución de la PR durante la isquemia.

Valores promedios ± ES de los parámetros que caracterizan la presión de reposo (PR) bajo diferentes condiciones experimentales.

% caída fase 1: porcentaje de cambio inicial respecto de los valores preisquémicos.

T_{fin} Fase2: tiempo al que finaliza la fase 2.

t_{PRMAX} Fase3: tiempo al que se produce el máximo valor de PR durante la fase 3.

%cambio Fase3: porcentaje de cambio de la PR respecto de sus valores al iniciarse la fase 3.

%caída Fase4: porcentaje de caída de la PR durante la fase 4 en relación al máximo valor al la fase 3.

* p<0.05 vs C30 y C35

p<0.05 vs C35

b) Evolución miotérmica durante la isquemia

La producción de calor total de los músculos previa al inicio de la isquemia (H_{in}) fue de 116.4 ± 13.5 mW/g, 101.7 ± 10.6 mW/g y 80.8 ± 9.4 mW/g a 25, 30 y 35 °C respectivamente. El estudio de la evolución de la producción de calor inicial con la temperatura determinó que existe una relación estadísticamente significativa entre ambos parámetros: $r = -0.535$ ($p < 0.05$); pendiente = -3.5 mW/°C; ordenada al origen = 206 mW. Esta disminución en el H_{in} con la temperatura estaría asociada con la caída en la P_{max} (y por ende en el calor activo, H_a) que se registra a las temperaturas de trabajo más elevadas (ver Tabla I y Fig. 6).

La isquemia produce una marcada caída en la producción de calor cuya evolución a lo largo de los 45 min es compleja (Figs 11 y 12). En todas las condiciones experimentales estudiadas, existe un período inicial de disminución abrupta en la producción de calor (Per_{in}). Durante este período en menos de 8 min se produce el 80% de la caída en la producción de calor durante la isquemia. Posteriormente, este período se continúa con otro de caída más moderada y lenta en la producción de calor (Per_{tar}). Las Figs. 11 y 12 muestran la evolución temporal de los registros miotérmicos digitalizados en experimentos individuales a 25 °C (Fig. 11) y a 30 y 35 °C (Fig. 12, A y B respectivamente). Los registros miotérmicos muestran que, en los grupos C30 y C35, siempre existe una inflexión durante el Per_{tar} , indicada por un aumento en la velocidad de caída de la producción de calor total. Dicho cambio en la velocidad fue llamado **codo** y presenta tiempos de ocurrencia característicos para cada grupo. En C25 solo 2 de los 6 experimentos analizados presentaron codo. En el tiempo entre la finalización del Per_{in} y la aparición del codo, los músculos son capaces de mantener su producción

de calor relativamente estable (o con una pendiente de caída mucho menor que la del Per_{in} y moderadamente menor que la posterior al codo). La no aparición de codo en C25 (o su aparición tardía) es congruente con la capacidad de estos músculos de mantener su producción de calor relativamente estable durante todo el tiempo posterior al Per_{in} (ver Fig. 11).

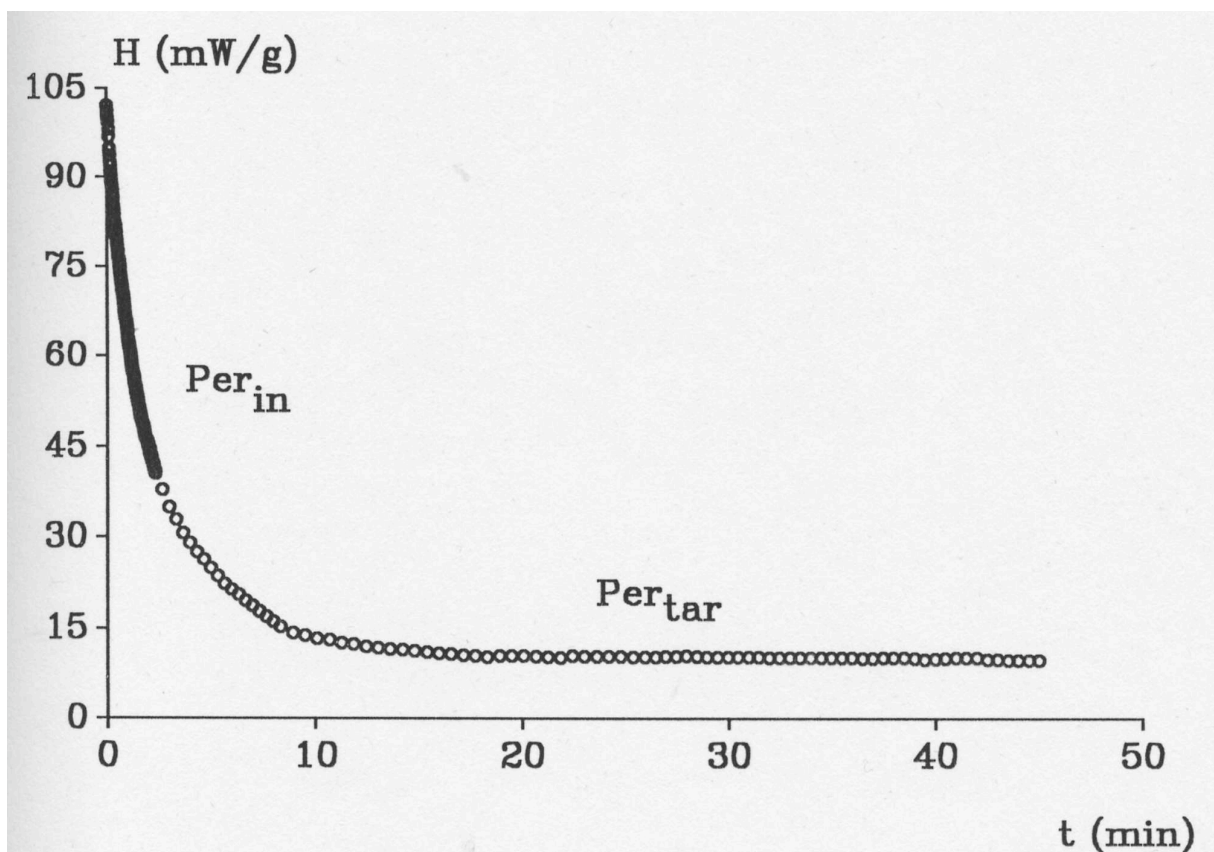


Figura 11: Evolución de la producción de calor (H) durante la isquemia a 25 °C. Per_{in} : período inicial en la evolución de H en el que se produce un 80% de la caída en aproximadamente 8 min; Per_{tar} : período tardío en la evolución de H en el que el flujo de calor se mantiene relativamente constante.

La aparición del codo se vincula a un incremento en la velocidad de caída de la producción de calor, que es mayor con el aumento de la temperatura de trabajo (ver Tabla VI). Mientras que esta caída se continua hasta los 45 min de isquemia en el

grupo C30, en C35 la velocidad disminuye paulatinamente hasta que se alcanza un valor de Ht relativamente estable.

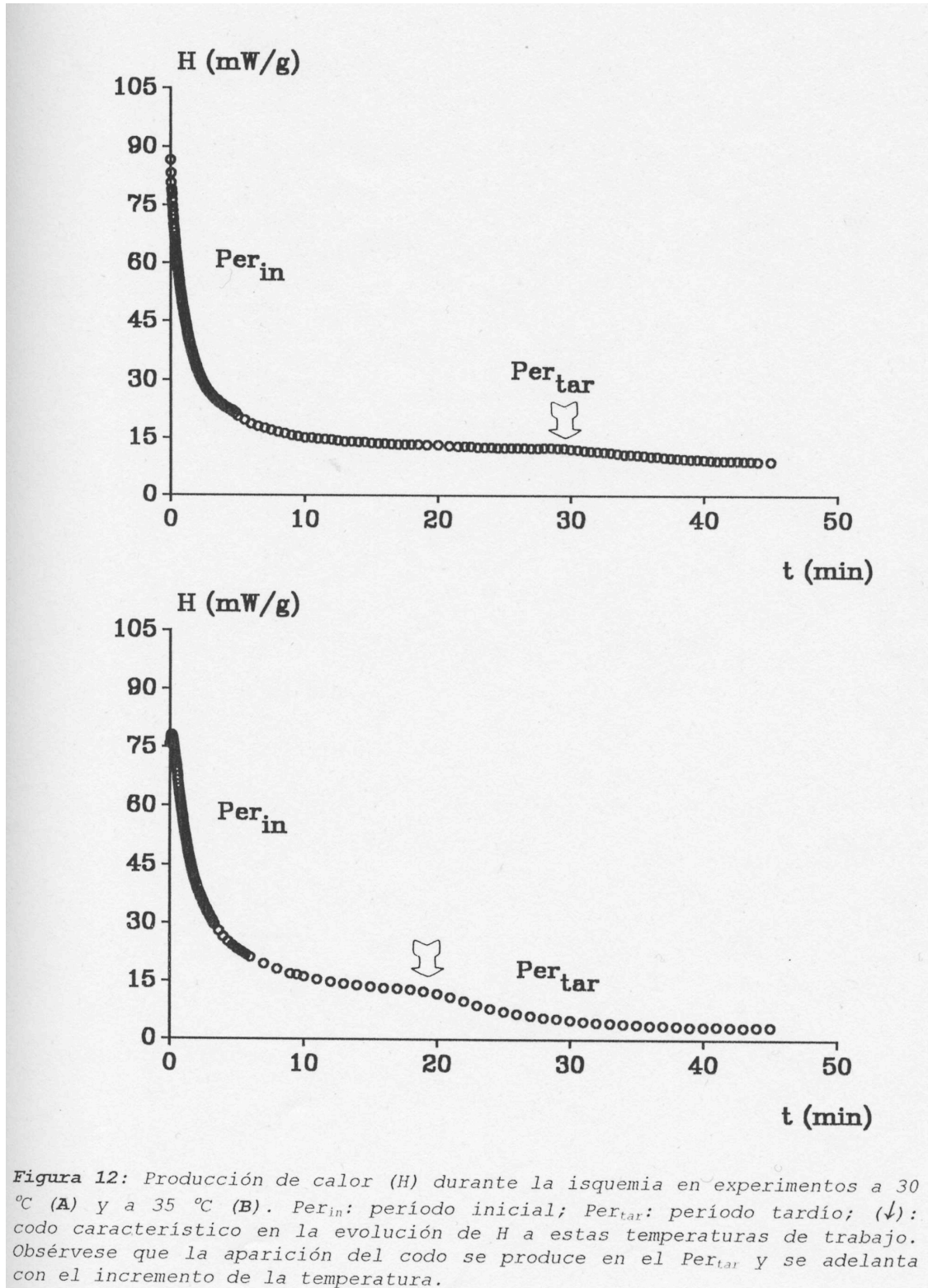


Figura 12: Producción de calor (H) durante la isquemia en experimentos a 30 °C (A) y a 35 °C (B). Per_{in}: período inicial; Per_{tar}: período tardío; (↓): codo característico en la evolución de H a estas temperaturas de trabajo. Obsérvese que la aparición del codo se produce en el Per_{tar} y se adelanta con el incremento de la temperatura.

La Tabla VI muestra los valores representativos de la evolución de la producción de calor total durante la isquemia en los diferentes experimentos.

Tabla VI. Parámetros característicos de la producción de calor (H) del músculo cardíaco durante la isquemia.

Grupo	%Tot. caída H (%)	%caída H a codo (%)	%caída H post codo (%)	t codo (min)	Veloc.post codo (uW/s)
C25					
C1	-78,9	-----	-----	-----	-----
C2	-90,5	-90,3	-0,2	42,5	-1,4
C3	-94,3	-93,3	-1	39	-3,0
C4	-93,4	-----	-----	-----	-----
C6	-90,7	-----	-----	-----	-----
X _{med} ±ES	-89,5±2,8	-91,8±1,5	-0,6±0,4	40,7±1,7	-2,2±0,6
C30					
2	-82,2	-78,9	-3,2	28,0	-5,3
3	-98,6	-96,5	-2,1	28,3	-3,1
4	-93,5	-87,7	-5,8	28,2	-4,8
5	-89,7	-85,7	-4,0	29,5	-7,6
6	-86,0	-79,7	-6,3	28,5	-4,7
7	-90,5	-84,6	-5,9	29,0	-1,7
X _{med} ±ES	-89,4±2,7	-85,1±3,1	-4,3±0,8**	28,6±0,2**	-4,5±0,8**
C35					
Q2	-97,5	-86,2	-11,3	18,0	-7,7
Q3	-95,7	-83,7	-12,0	19,0	-7,7
Q4	-96,1	-89,4	-6,7	18,0	-4,7
Q5	-97,7	-84,7	-13,0	17,0	-9,4
X _{med} ±ES	-96,7±0,5	-86,0±1,2	-10,8±1,4*	18,0±0,4*	-7,4±1,0*

Datos individuales y medias ± ES.

% Tot. caída H: porcentaje total de disminución de H a los 45 min. de isquemia en relación a los valores de H preisquémicos (Hin).

%caída H a codo: porcentaje de caída de H hasta la aparición del codo en relación a H in.

% caída H post codo: porcentaje de caída de h desde el codo hasta los 45 min de isquemia en relación a H in.

t codo: tiempo de aparición del codo.

Veloc.post codo: velocidad con la que cae H luego de la aparición del codo.

*p<0,05 vs C30 y C25.

**p<0,05 vs C25

c) Evolución del calor de reposo (Hr) durante la isquemia

Como se indicó en la Introducción, el Ht puede ser dividido en diferentes fracciones vinculadas con el metabolismo asociado a la contracción (calor activo, Ha) o con el metabolismo basal (calor de reposo, Hr). En consecuencia, la caída del Ht durante la intervención isquémica podría deberse a la modificación de una, algunas o todas esas fracciones. Más aún, la posibilidad de una modificación mas acentuada en una fracción que en otra debía ser evaluada. Con ese objeto se estudió la evolución temporal del calor de reposo (Hr) durante la isquemia en 5 músculos sin estimulación eléctrica. Para evitar el automatismo, los músculos fueron perfundidos a 25 °C con una solución Krebs conteniendo 0.5 mM de Ca⁺⁺. Luego de un período de estabilización de 1 h se les practicó una isquemia de 20 min durante los cuales se registró la evolución del calor liberado. Los corazones disminuyeron su Hr desde un valor preisquémico de 22.6 ± 2.8 mW/g a 8.9 ± 1.7 mW/g a los 20 min de isquemia (p<0.01). Como se observa en la Fig. 13 , luego de un período aproximado de 1 min la producción de calor disminuye. Esta disminución puede ser descripta en el tiempo por una función del tipo:

$$F(t) = A_r * e^{(-0.0089*t)} + A_l * e^{(-0.00026*t)} \quad (\text{Ec. 2})$$

donde:

A_r = factor preexponencial del término exponencial "rápido"

A_l = factor preexponencial del término exponencial "lento"

t = tiempo de isquemia

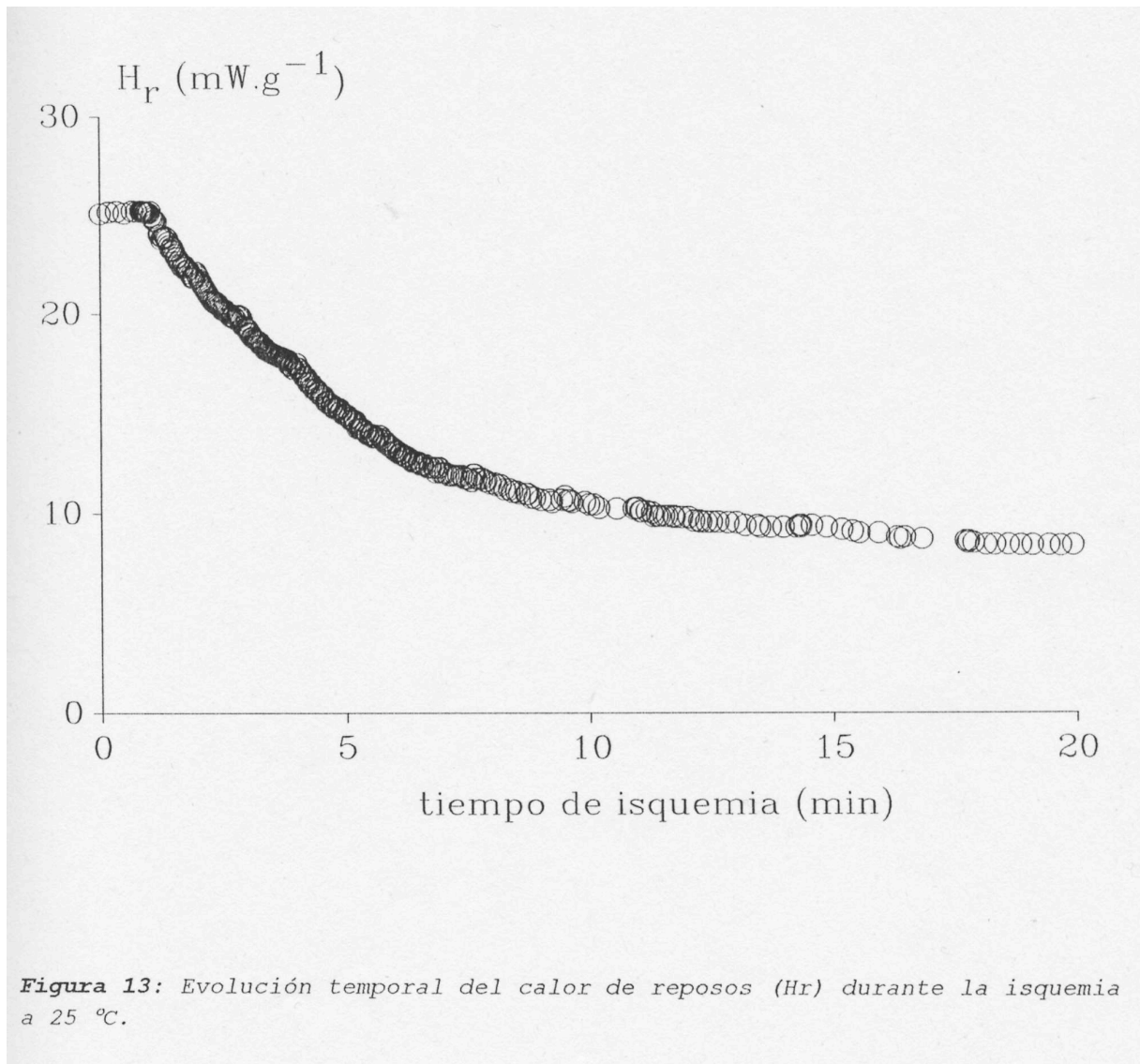


Figura 13: Evolución temporal del calor de reposos (H_r) durante la isquemia a 25 °C.

d) Interrelación mecánico-energética durante la isquemia

El análisis de la economía muscular para el desarrollo de presión (**Eco**) es de interés en la medida que brinda información acerca de la "eficiencia" con la que el músculo desarrolla presión isométrica. Este índice econométrico puede estudiarse como el cociente entre la Pmax y el calor total producido por una contracción (Ht/frecuencia) en cada instante. Para el cálculo de la Eco se consideró la densidad del músculo igual a 1.03 g/cm³. En el presente trabajo el análisis de la Eco se realizó para los tiempos de isquemia en los que la Pmax era mayor que 1 mN/mm².

Los valores de Eco preisquémicos no fueron estadísticamente diferentes entre los grupos, siendo de 0.216 ± 0.030 para C25, y de 0.212 ± 0.026 y 0.195 ± 0.019 para C30 y C35 respectivamente.

Dado que la Pmax se anula durante la isquemia con mayor velocidad que la caída de la producción de calor, también la Eco tiende a anularse. Esta anulación se produce a tiempos de isquemia variables y el análisis de la curva mostró que su evolución hasta hacerse 0 es compleja. A modo de ejemplo, dicha evolución temporal en un experimento a 30 °C esta representada en la Fig. 14. Obsérvese que la rápida caída inicial da lugar con el tiempo a un descenso mas moderado, que se continúa hasta la aparición de una inflexión (**P_{inf}**) en que se incrementa la velocidad de caída de la Eco. Dicho incremento se refleja en las diferentes pendientes de las rectas tangentes a la curva antes y después del P_{inf} (ver Fig. 14).

Este punto de inflexión apareció entre los 90 y 100 s a 25 °C, entre los 75 y 100 s a 30 °C y entre los 55 y 85 s a 35 °C. Se observa que existe una superposición en los rangos temporales de aparición del P_{inf} a las distintas temperaturas de trabajo. El estudio de la correlación entre el tiempo de aparición del P_{inf} y el porcentaje de

recuperación de la Pmax durante la reperfusión indicó que no existe una relación estadísticamente significativa entre ambos parámetros.

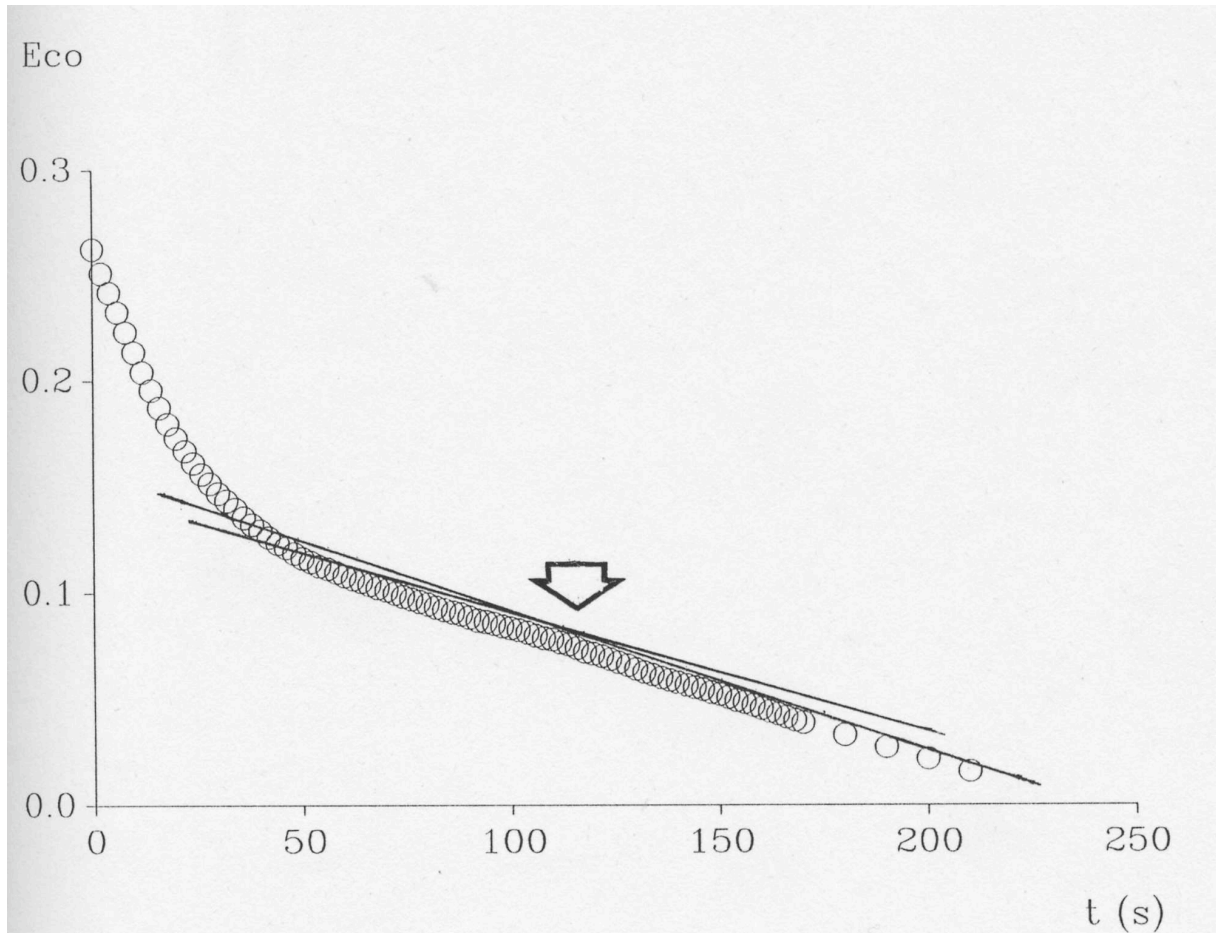


Figura 14: Evolución de la economía para el desarrollo de presión (E_{co}) en un experimento a 25 °C durante la isquemia. A todas las temperaturas de trabajo aparece un punto de inflexión (P_{inf}) (\downarrow) a partir del cual se incrementa la velocidad de caída de la E_{co} .

Si se analizan conjuntamente la evolución del calor liberado y la presión de reposo en los grupos sometidos a isquemia, se observa la repetición de una secuencia temporal característica de la sucesión de eventos. Dicha secuencia es:

1ro) el inicio de la fase 3 de la PR caracterizado por un rápido incremento en los valores de ésta,

2do) la aparición del codo en la evolución de la producción de calor y

3ro) el inicio de la caída de la PR en la fase 4 (en C30 y C35) cuando aún no se ha estabilizado la caída de H que se produce a partir del codo (solo observable en C35).

La tabla VII muestra, para cada experimento, los tiempos característicos de ocurrencia del codo y del inicio de la fase 3 de la PR, así como la diferencia entre ambos.

En la Fig. 15 se grafica la evolución conjunta de los parámetros mecánicos y miotérmicos en un experimento a 30 °C.

La Fig. 16 muestra la evolución de la PR y la producción de calor a partir del décimo minuto de iniciada la isquemia en un experimento a 35 °C. Nótese la secuencia temporal antes citada.

Tabla VII. Tiempos de ocurrencia del inicio de la contractura y de la aparición del codo en la producción de calor.

Grupo	t _{in} Fase 3 (min)	Δ (min)	t _{codo} (min)
C25			
C2	33,3	9,2	42,5
C3	33,3	5,7	39,0
X _{med} ±ES	33,3±0*#	7,4±1,8	40,75±1,8#
C30			
2	17,0	11,0	28,0
3	23,9	4,4	28,3
4	23,8	4,4	28,2
5	27,5	2,0	29,5
6	22,9	5,6	28,5
7	20,0	9,0	29,0
X _{med} ±ES	22,5±1,5*°	6,05±1,4	28,6±0,2°
C35			
Q2	13,1	4,9	18,0
Q3	13,1	6,0	19,0
Q4	14,0	4,0	18,0
Q5	15,0	2,0	17,0
X _{med} ±ES	13,8±0,5*	4,2±0,8	18±0,4

Datos individuales y medias ± ES de los tiempos de ocurrencia del inicio de la fase 3 en la presión de reposo (t_{in} Fase 3) (inicio de la contractura) y de la aparición del codo (t_{codo}) en la producción de calor durante la isquemia.

No se incluye en la tabla los t_{in} Fase 3 de los experimentos a 25°C que no presentaron codo.

*p<0,05 vs t_{codo} del mismo grupo.

#p<0,05 vs C30 y C35.

°p<0,05 vs C35.

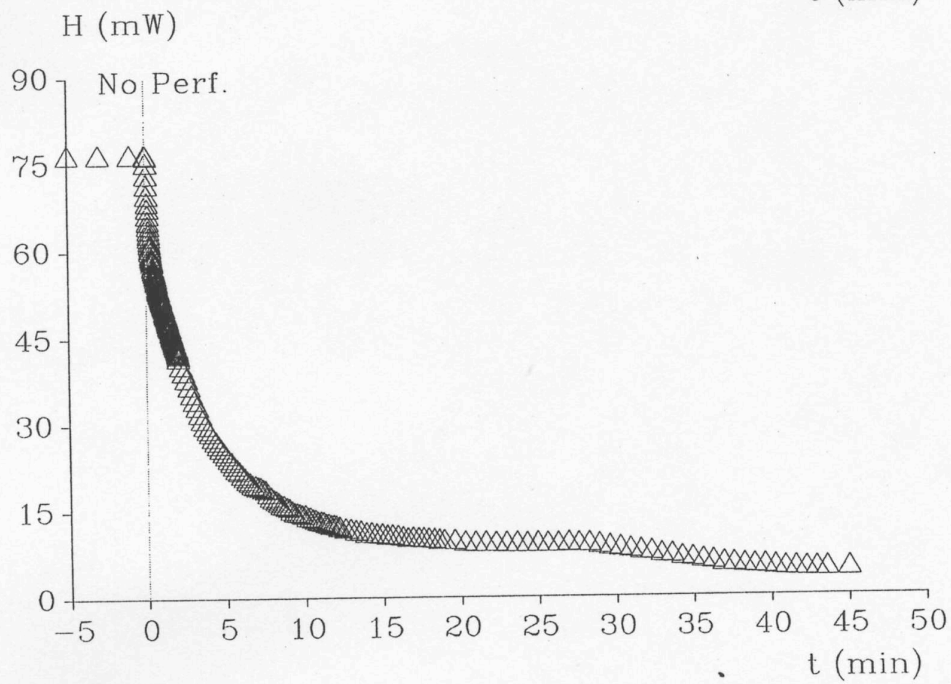
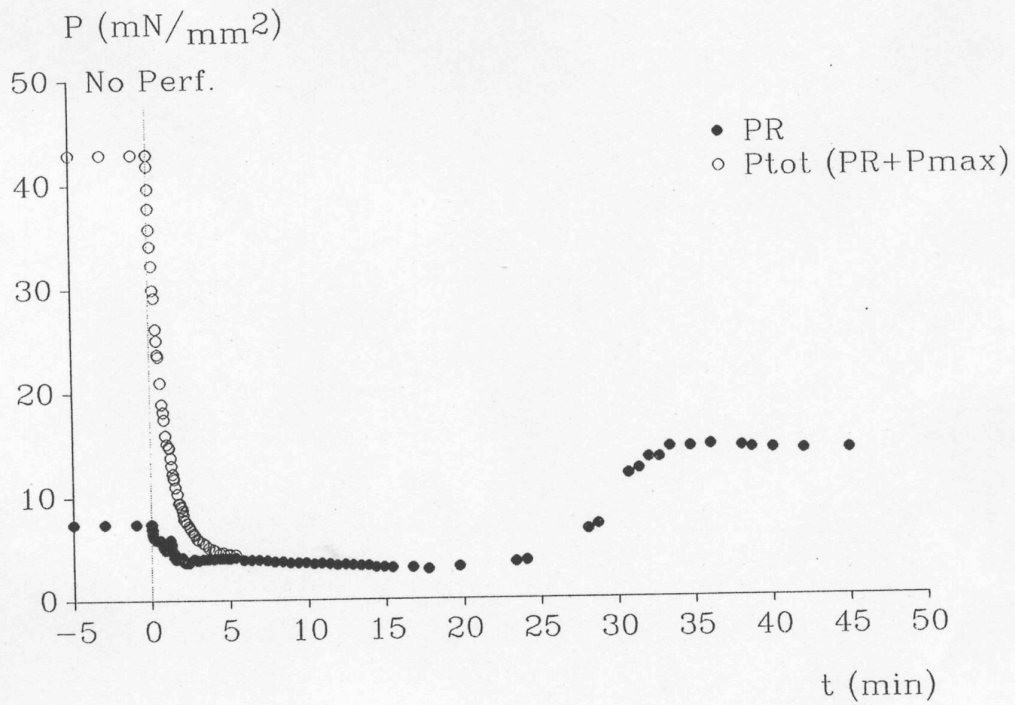


Figura 15 Evolución mecánica (arriba) y miotérmica (abajo) en un experimento a 30 °C. PR: presión de reposo; Pmax: máxima presión desarrollada; Ptot: presión total; H: producción de calor por gramo de tejido seco.

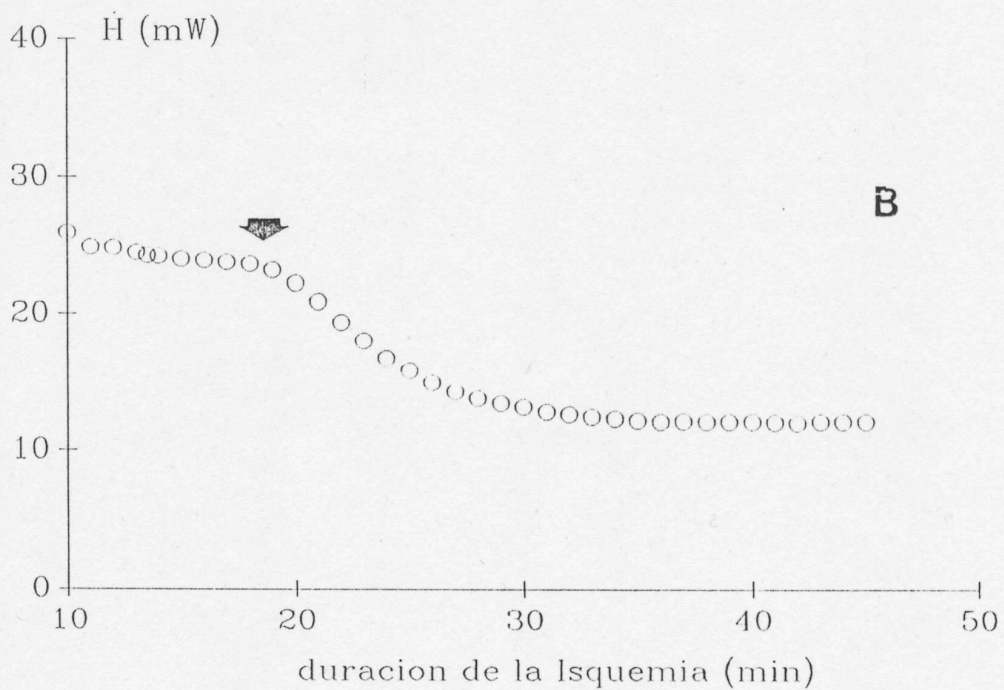
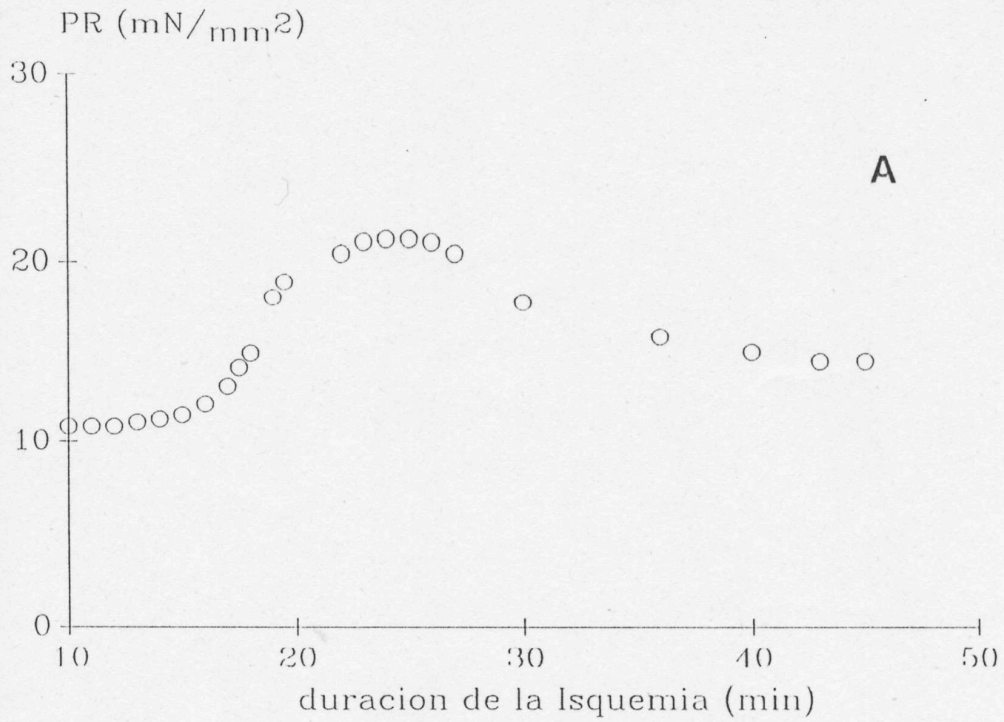


Figura 16: Evolución de la presión de reposo (PR) (A) y la producción de calor (H) (B) a partir de los 10 min de isquemia en un experimento a 35 °C. (↓): codo. Obsérvese el inicio de la contractura (inicio de la fase 3 en la evolución de la PR) antes de la aparición del codo en la evolución de H. Nótese también como la PR alcanza un máximo (al final de la fase 3 de la evolución de la PR) para luego descender (fase 4).

e) Contracciones aisladas durante la isquemia

Los protocolos experimentales de contracciones aisladas durante el corte de perfusión se realizaron con el objeto de evaluar la evolución temporal de los componentes de calor activo (Ha) y su posible incidencia en el comportamiento observado de la economía durante la isquemia.

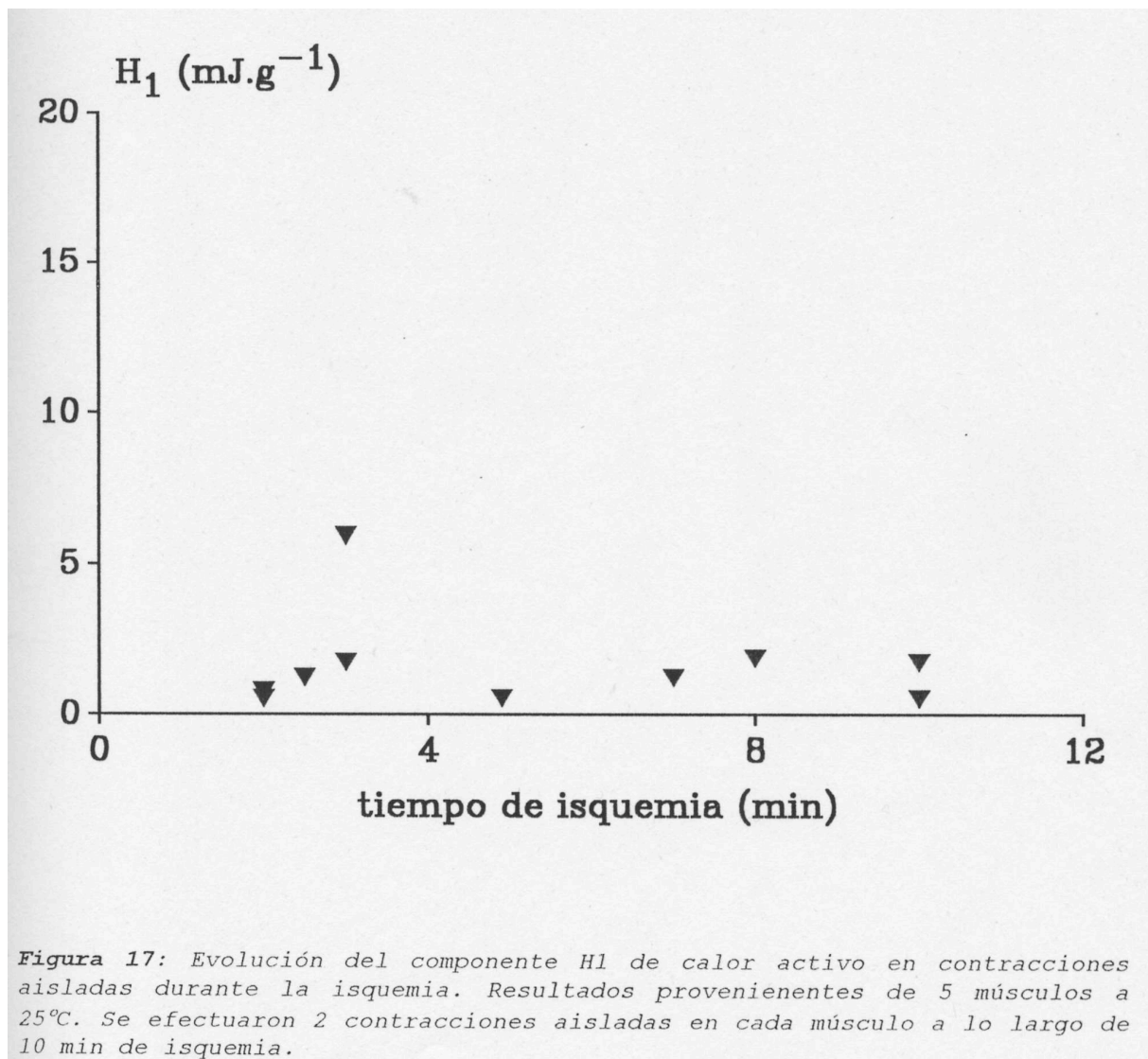
Los experimentos se llevaron a cabo en 5 músculos perfundidos con Krebs a 25 °C conteniendo 0.5 mM de Ca⁺⁺. Luego de realizados las contracciones aisladas control (en presencia de perfusión) y determinado el calor de reposo control (Hr) se inició la isquemia. Se registró permanentemente el flujo de calor y se efectuaron 2 contracciones aisladas en los primeros 10 min de isquemia. En cada contracción aislada, el calor liberado por latido (en mJ) se midió como el área bajo la curva de flujo de calor (en mW) vs. tiempo (en s) por encima de la línea de base correspondiente al reposo mecánico. Para cada contracción se determinó los componentes de calor activo H1, H2, H3 y H4 (134)(ver Materiales y Métodos y Fig. 4).

Los valores preisquémicos del Hr fueron de 22.6 ± 2.8 mW/g. En condiciones control, la máxima presión desarrollada y el Ha liberado durante una contracción fueron de 32.5 ± 2.0 mN/mm² y 108.4 ± 14.8 mJ/g respectivamente. En las mismas condiciones, los componentes del Ha fueron: 4.5 ± 1.7 mJ/g (H1), 11.5 ± 1.9 mJ/g (H2), 41.1 ± 4.6 mJ/g (H3) y 52.5 ± 5.1 mJ/g (H4).

La suspensión del flujo de perfusión anuló H4, por lo que a los tiempos de isquemia analizados el calor liberado por las contracciones se ajustó a 3 componentes. Por su parte, la isquemia no modificó de manera estadísticamente significativa los valores de H1 y H2 a ningún tiempo estudiado. Los índices de

correlación de H1 y H2 con el tiempo (r) fueron 0.17093 (NS) y 0.5427 (NS) (ver Figs. 17 y 18).

A diferencia de H1 y H2, el componente H3 cayó con el tiempo de isquemia (r = 0.6447, $p < 0.05$). La disminución de H3 (vinculado a la actividad actomiosínica) fue proporcional a la caída en la presión desarrollada y la correlación H3/Pmax vs. tiempo de isquemia fue significativa (r = 0.817, $p < 0.01$) (ver Fig. 19). El valor de este cociente durante la isquemia (0.7) fue menor que en condiciones control (1.2). Esta diferencia se explica porque una fracción de H3, asociada a la recuperación aeróbica del tejido, desaparece en condiciones de isquemia (134).



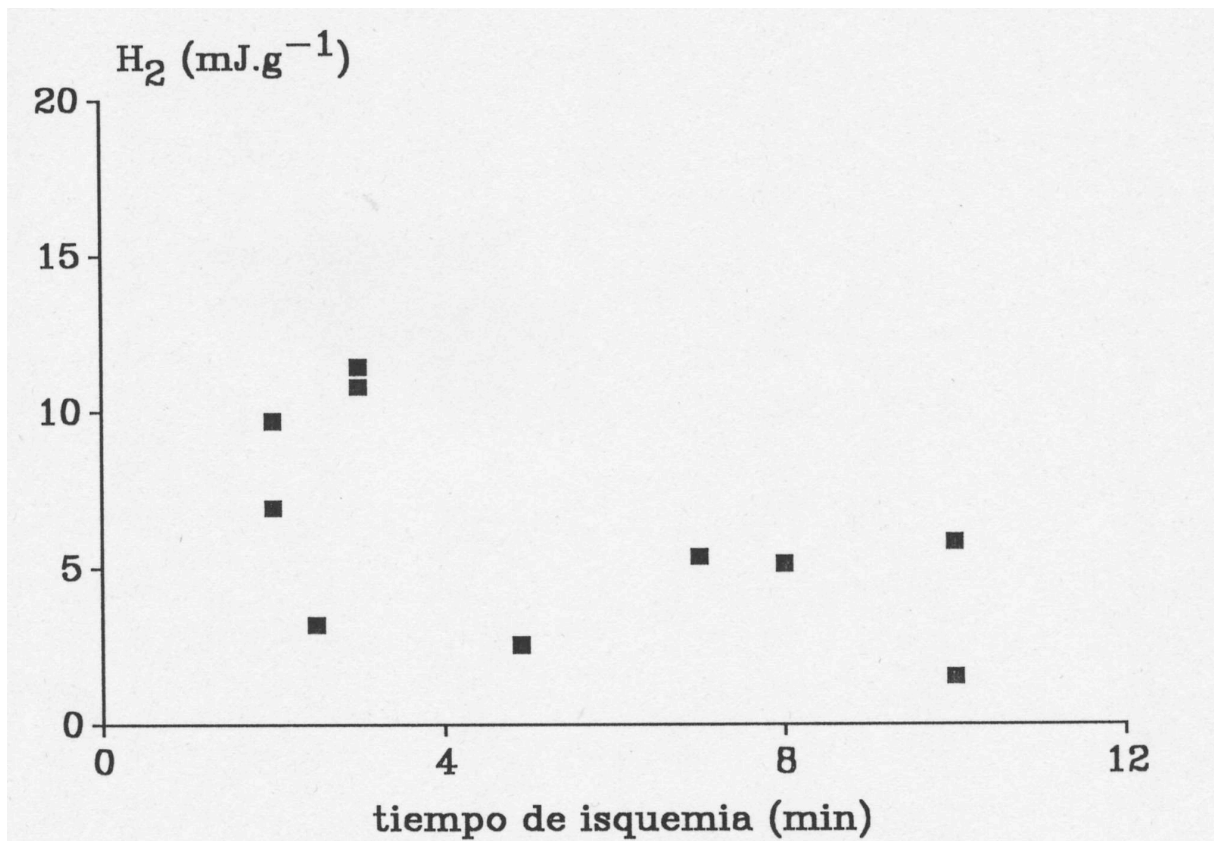


Figura 18: Evolución del componente H₂ de calor activo en contracciones aisladas durante la isquemia. Los resultados provienen de 5 músculos a 25°C. Se efectuaron 2 contracciones aisladas en cada músculo a lo largo de 10 min de isquemia.

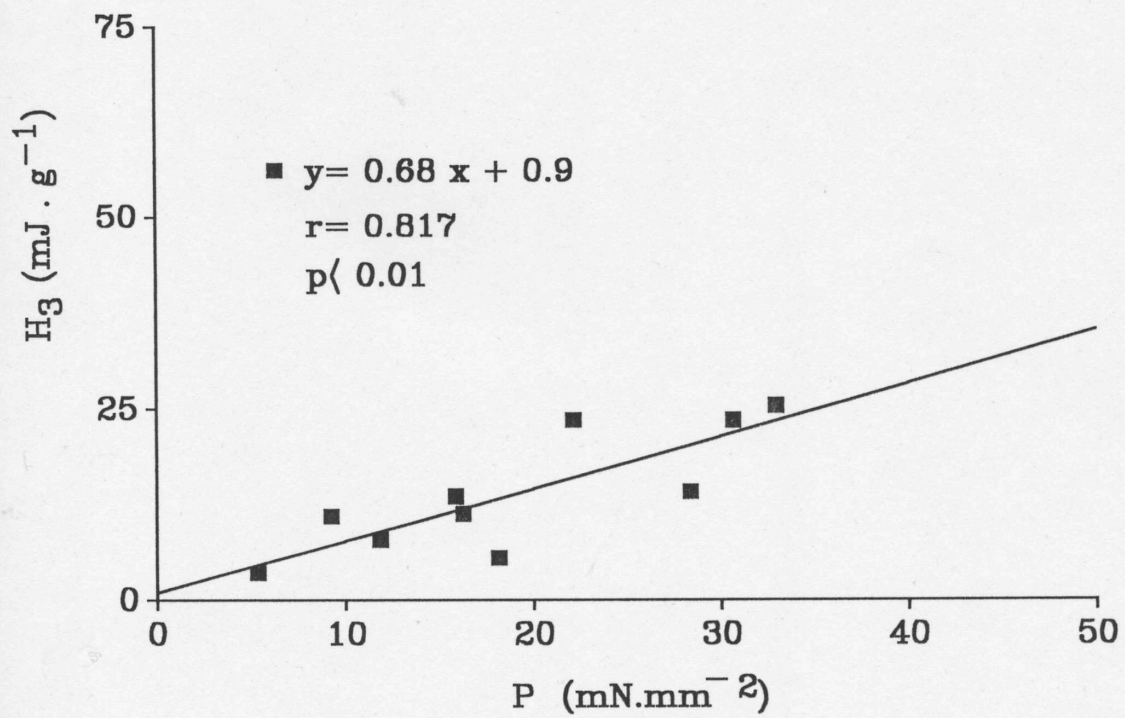


Figura 19: Relación entre el componente H3 del calor activo y la presión desarrollada (P) en contracciones aisladas durante la isquemia. Los resultados provienen de 5 músculos a 25 °C. Se efectuaron 2 contracciones aisladas en cada músculo a lo largo de 10 min de isquemia.

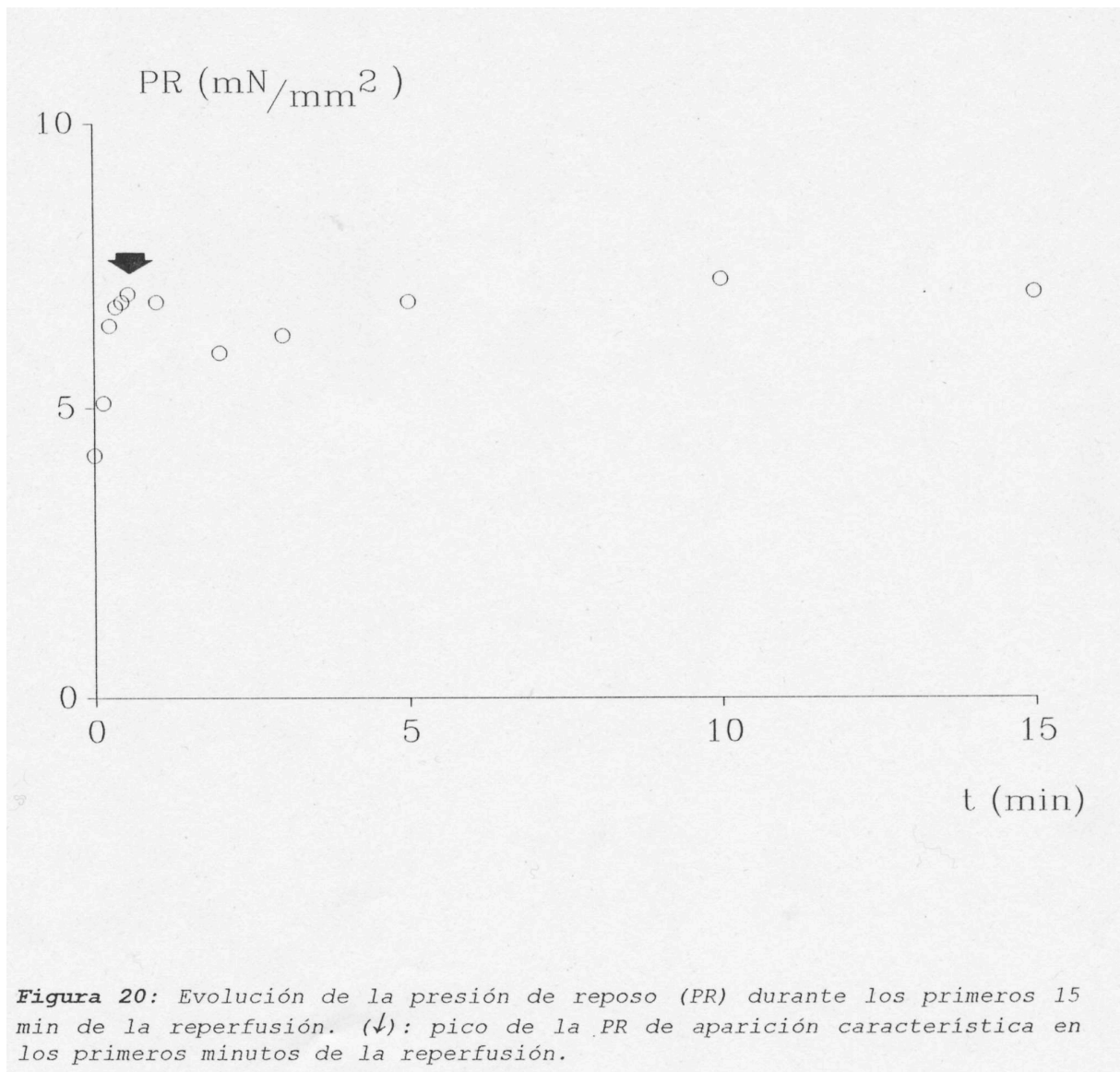
B. Reperusión

a) Evolución mecánica durante la reperusión

Independientemente de la temperatura de trabajo, el reinicio de la perfusión indujo un aumento transitorio de la PR en relación a los valores alcanzados a los 45 min de isquemia. La Fig. 20 muestra este aumento inicial de la PR que produce un **pico** para luego descender. Este pico inicial se produjo a tiempos que no difirieron estadísticamente entre los grupos. A 25 °C el pico inicial de la PR se produjo a los 28 ± 6 s mientras que a 30 y 35 °C los tiempos de ocurrencia fueron de 39 ± 8 s y 30 ± 4 s respectivamente. Los valores de este pico son variables y no hubo diferencias estadísticamente significativas a las diferentes temperaturas de trabajo. Tomando como referencia el valor de la PR al inicio de la reperusión (100%), el pico de PR representa un incremento que osciló entre el 170% y el 280%. Posteriormente al mismo se observa una paulatina disminución en los valores de PR. Al final de la reperusión esta disminución alcanzó valores porcentuales (en relación a la PR al inicio de la reperusión) de -9 ± 20 % , 75 ± 29 % y 143 ± 44 % para C25, C30 y C35 respectivamente ($p < 0.05$ C25 vs C35, ANOVA, Bonferroni). Es decir que en los experimentos realizados a temperaturas menores la PR tiende a normalizarse, mientras que se mantiene elevada a temperaturas de trabajo mayores.

La actividad contráctil (desarrollo de presión) se reinició a tiempos variables durante la reperusión, y no difirió entre los grupos. Mientras que a 25 y 30 °C todos los experimentos recuperaron la actividad contráctil, en el grupo C35 a 35 °C solo el 50 %

de los músculos estudiados logró reiniciar la contracción. El porcentaje de recuperación de la Pmax en relación a sus valores preisquémicos fue : $88.8 \pm 7.9 \%$, $39.4 \pm 11.9 \%$ y $7.8 \pm 4.7 \%$ para C25, C30 y C35 respectivamente ($p < 0.05$ C25 vs C35; $p < 0.05$ C25 vs C30; ANOVA, Bonferroni).



La evolución global de la PR y la P total (PR + Pmax) en experimentos tipo a 25, 30 y 35 °C se muestra en la Fig. 21 (partes A, B y C respectivamente). Puede observarse que, a temperaturas de trabajo menores, la recuperación de la Pmax durante la reperfusión fue mayor, a la vez que la PR presenta una tendencia a recuperar sus valores preisquémicos.

b) Evolución miotérmica durante la reperfusión

La evolución temporal del incremento inicial de H es compleja y alcanza un valor máximo (Val_{max}) luego del cual la producción de calor cae hasta alcanzar un valor relativamente estable (H_{estab}) alrededor de la cual oscila moderadamente. El incremento inicial en el flujo de calor es característico de la reperfusión (ver Fig. 22) y su Val_{max} no llega a superar los valores de calor preisquémicos. En efecto, el máximo calor producido por el músculo durante la reperfusión fue de alrededor de un 90% de los valores controles. El 50% del incremento en la producción de calor durante la reperfusión se alcanzó en un tiempo (t_{50}) de 69 ± 4 s y no fue estadísticamente diferente entre los grupos.

Con posterioridad al Val_{max} , el flujo de calor cayó hasta alcanzar un valor medio (H_{estab}) alrededor del cual osciló de manera irregular hasta el final de la reperfusión (Fig. 22 y Fig. 23 A). Estas oscilaciones irregulares alrededor del valor de H_{estab} se asociaron con la sucesión de eventos mecánicos de ocurrencia frecuente en la reperfusión. Entre ellos podemos citar episodios breves de fibrilación, reinicio del desarrollo de presión activa, latidos extrasistólicas etc. En aquellos experimentos realizados a 35 °C, solamente aquellos músculos que lograron recuperar la actividad contráctil

estabilizaron su producción de calor alrededor de un H_{estab} (Fig. 23, A). Los valores de H_{estab} fueron, en relación a los valores controles, porcentualmente similares a las diferentes temperaturas de trabajo. Aquellos músculos que no pudieron reiniciar su actividad contráctil no estabilizaron su producción de calor, la que cayó hasta la finalización de la reperfusión (Fig. 23, B).

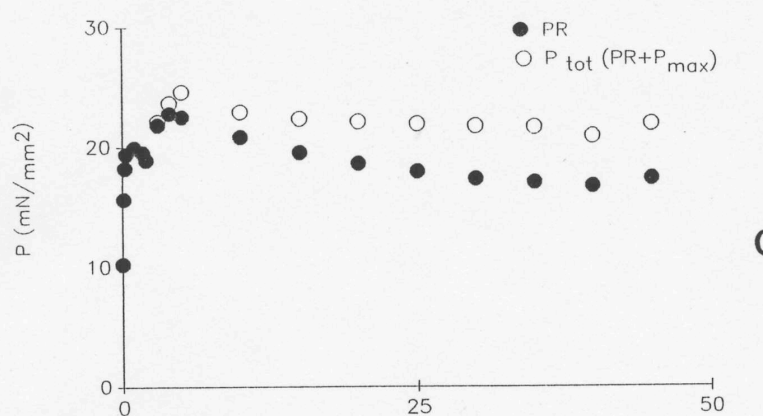
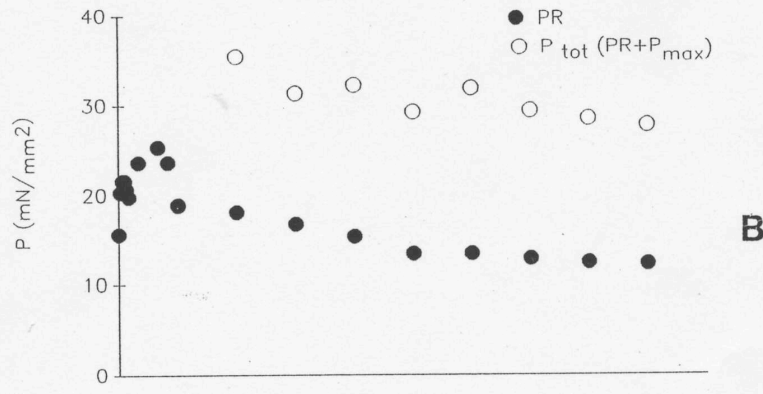
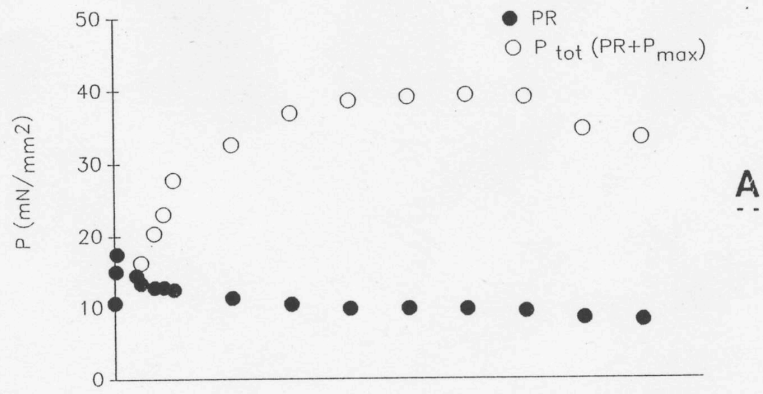


Figura 21: Evolución de la presión de reposo (PR) y la presión total (P_{tot}) durante 45 min de reperfusión en experimentos a 25, 30 y 35 °C (A, B y C respectivamente). Nótese la mayor recuperación de la máxima presión desarrollada (P_{max}) a 25 °C (A) en relación a la alcanzada en el experimento a 35 °C (C).

Los parámetros característicos de la evolución de calor durante la reperfusión se muestran en la Tabla VIII.

Grupo	T VAL _{max} (s)	t ₅₀ (s)	% VAL _{max}	%Hestab
C25 (n=6)	165 ± 8	61 ± 2	89 ± 6	81 ± 4
C30 (n=5)	173 ± 6	60 ± 6	85 ± 5	84 ± 4
C35 (n=4)	185 ± 20	82 ± 6	92 ± 2	80 ± 0

Tabla VIII. Parámetros característicos de la producción de calor (H) del músculo cardíaco durante la reperfusión. mecánicos preisquémicos a diferentes condiciones experimentales.

T VAL_{max}: tiempo al máximo valor de H (VAL_{max}) durante el inicio de la reperfusión.

t₅₀: tiempo en el que se alcanza el 50% de la diferencia entre el VAL_{max} y el valor de H al inicio de la reperfusión.

% VAL_{max}: valor porcentual de la diferencia de calor entre el VAL_{max} y el valor de H al inicio de la reperfusión.

%Hestab: valor porcentual del calor alcanzado con posterioridad al VAL_{max} (Hestab) en relación al H al inicio de la reperfusión.

Con el objeto de evaluar los posibles mecanismos intervinientes en la producción de calor durante la reperfusión, se realizaron 3 experimentos a 25 °C perfundiendo los músculos en presencia de 10 mM de BDM. El BDM, que es un inhibidor de la interacción actomiosínica, fué perfundido desde la condición preisquémica y durante los 45 min de reperfusión. En todos los experimentos realizados se observó la desaparición del Val_{max} en el flujo inicial de calor. La Fig. 24 muestra el registro de un experimento tipo durante la reperfusión, nótese el incremento continuo del calor, sin la aparición de un Val_{max} a partir del cual declina.

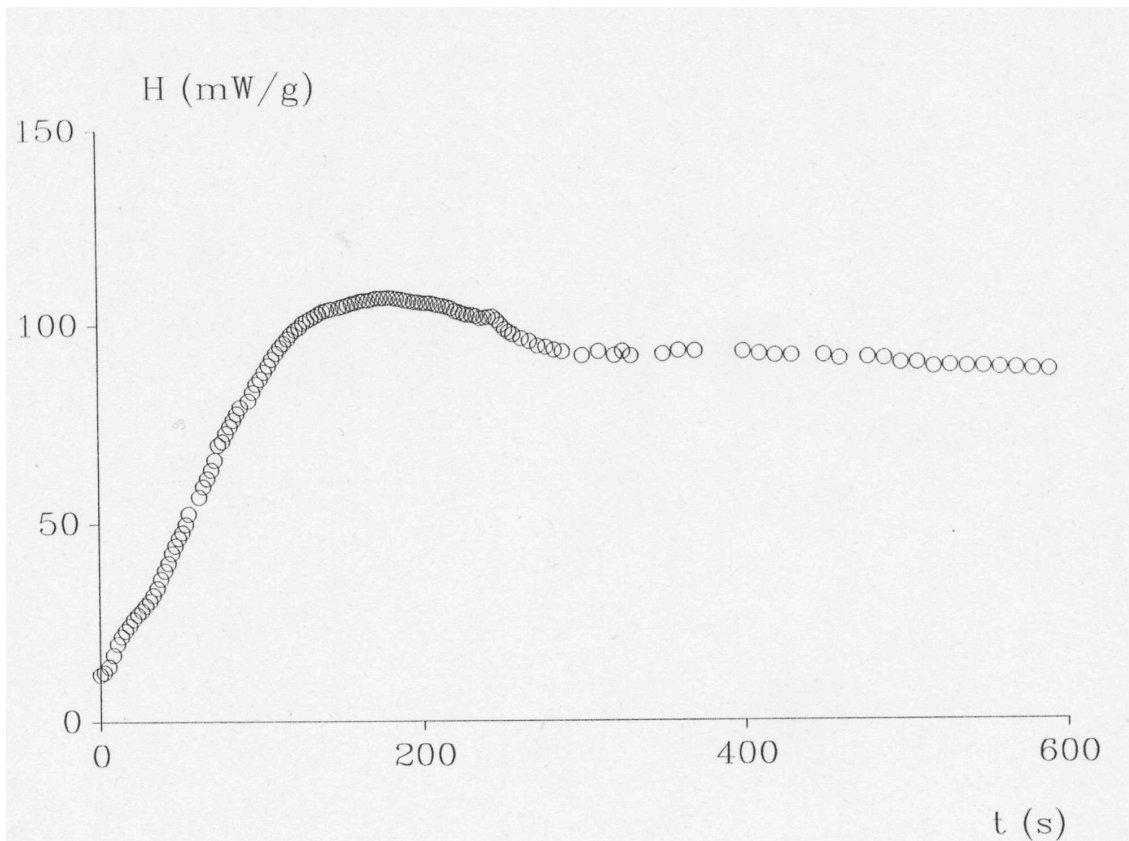


Figura 22: Evolución de la producción de calor (H) durante los primeros 10 min de la reperfusión. Nótese el incremento de H hasta alcanzar un valor máximo (Val_{max}) luego del cual declina moderadamente.

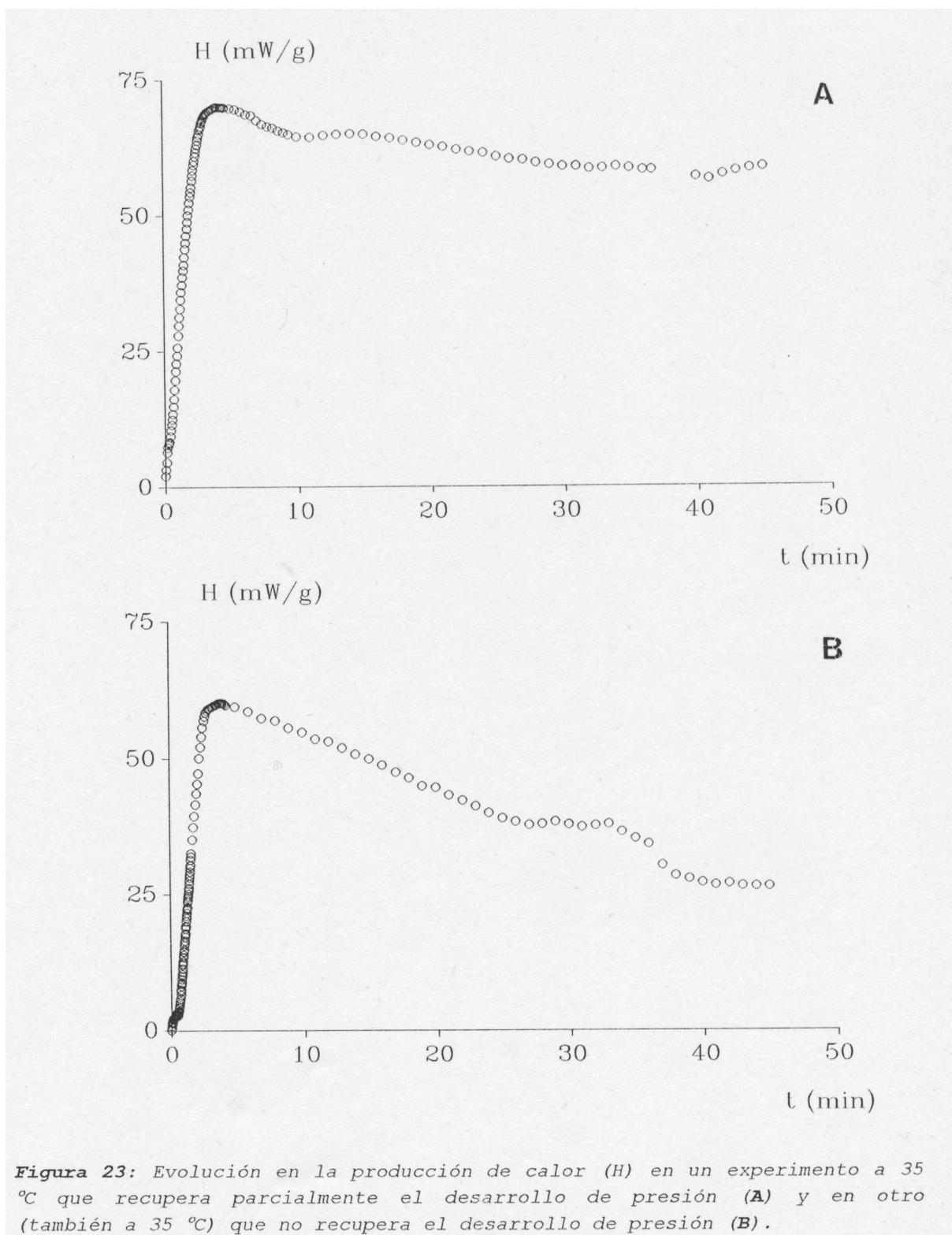


Figura 23: Evolución en la producción de calor (H) en un experimento a 35°C que recupera parcialmente el desarrollo de presión (**A**) y en otro (también a 35°C) que no recupera el desarrollo de presión (**B**).

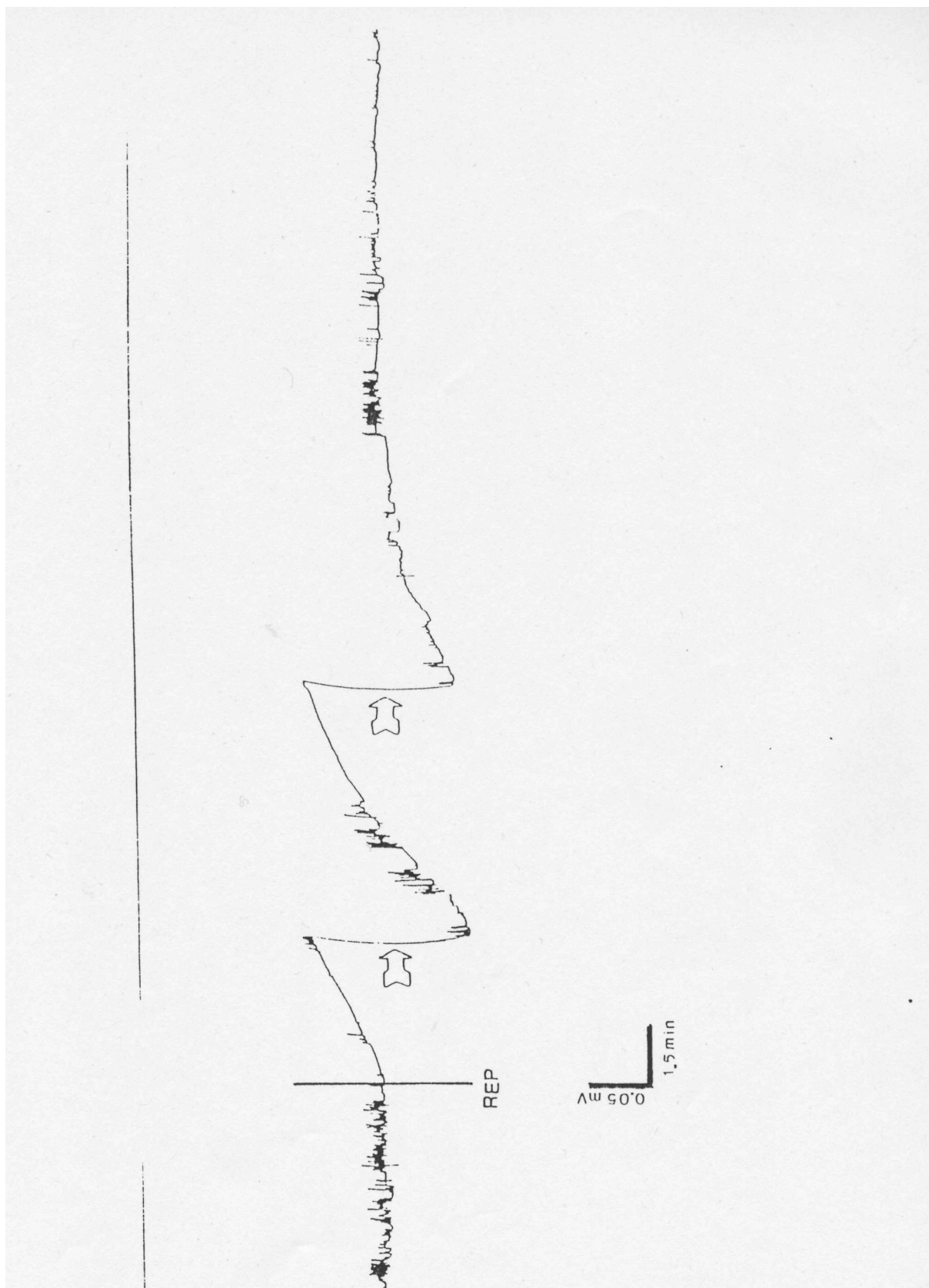


Figura 24: Registro original de la señal calorimétrica (en uV) durante la reperusión de un músculo perfundido con BDM (un inhibidor de la interacción actomiosínica). Las flechas marcan los cambios de línea de base que se hicieron para mantener la señal dentro del canal de registro. Nótese que la producción de calor no alcanza un valor máximo (Val_{max}) como en los músculos perfundidos sin BDM (ver Figs. 22 y 23).

c) Interrelación mecánico-energética durante la reperfusión

Los resultados mecánicos y miotérmicos indican que, durante la reperfusión, el calor se estabiliza alrededor de un H_{estab} cercano al 85% del H_{in} en todos los grupos, mientras que la recuperación de la P_{max} oscila entre el 90% (en C25) y el 8% (en C35). Es decir que, mientras la producción de calor se recupera hasta alcanzar niveles cercanos a los preisquémicos, la recuperación del desarrollo de presión durante la reperfusión es mínima a las temperaturas de trabajo mayores. Esto resulta en una E_{co} menor que la E_{co} preisquémica y cuya disminución se asocia fundamentalmente a la baja recuperación de la P_{max} durante la reperfusión.

Los máximos valores porcentuales de E_{co} alcanzados (en relación a la E_{co} preisquémica) fueron de $90.9 \pm 23.2\%$ a 25 °C y de $52.6 \pm 14.8\%$ y $9.7 \pm 5.9\%$ a 30 y 35 °C respectivamente ($p < 0.05$ C35 vs C30 y C25). Dado que la recuperación de la E_{co} durante la reperfusión sufre oscilaciones, para el cálculo de estos valores se tomó el máximo valor alcanzado en tiempos variables entre los 25 y 45 min de la reperfusión. La Fig. 25 muestra, mediante un diagrama de barras, la recuperación porcentual de H (utilizando el valor de H_{estab}) (A), la recuperación de la P_{max} (B) y de la E_{co} (C) durante la reperfusión.

La integración de datos mecánicos y miotérmicos puso también de manifiesto que, durante la reperfusión, existe una secuencia temporal en la sucesión de eventos que se cumple en todos los experimentos realizados: 1ro) el incremento transitorio de la PR alrededor de los 30s de reperfusión, 2do) sobreproducción de calor hasta alcanzar un tope en tiempos medios de 180 s y 3to) el reinicio de la generación de presión (en aquellos experimentos en los que hay recuperación de la P_{max}). Mientras que las

respuestas son variables cuantitativamente, la secuencia (independientemente de la temperatura) es la misma.

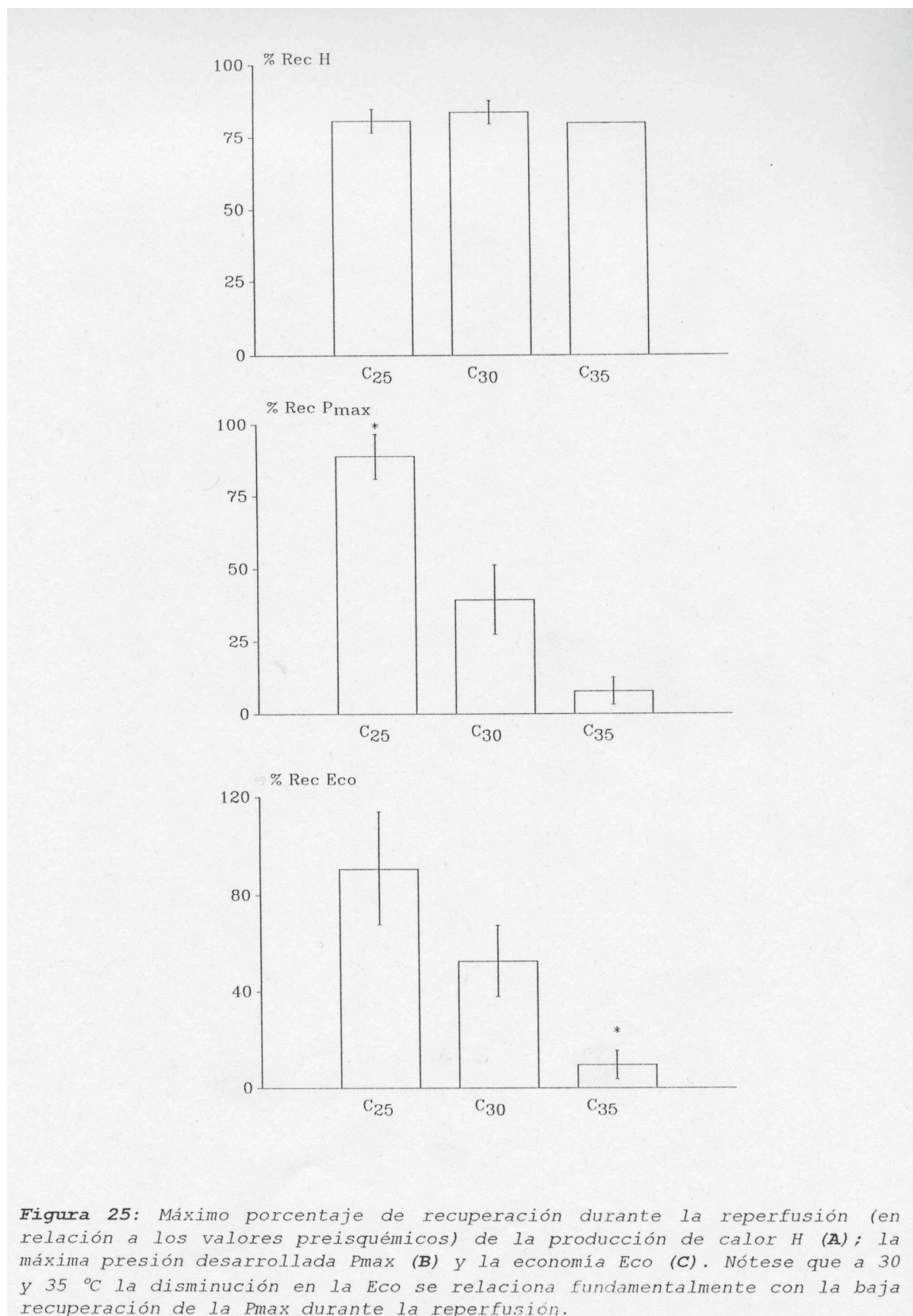


Figura 25: Máximo porcentaje de recuperación durante la reperfusión (en relación a los valores preisquémicos) de la producción de calor H (A); la máxima presión desarrollada Pmax (B) y la economía Eco (C). Nótese que a 30 y 35 °C la disminución en la Eco se relaciona fundamentalmente con la baja recuperación de la Pmax durante la reperfusión.

Finalmente, se relacionaron los valores individuales de recuperación de la Pmax durante la reperfusión con el tiempo de isquemia posterior a la aparición del codo en cada experimento. En aquellos músculos que no presentaron codo durante la isquemia, ese tiempo fue considerado igual a 0. Los datos correlacionados se muestran en la Fig. 26 y el r fue de 0.899 ($p < 0.01$), lo que parecería indicar un vínculo entre ambos parámetros. Si tomamos el porcentaje de recuperación de la Pmax durante la reperfusión como un índice del daño celular producido por la isquemia y la reperfusión cardíacas, esta correlación estaría indicando que el daño tisular es más pronunciado en aquellos músculos en los que el codo en la producción de calor durante la isquemia aparece más tempranamente. De esta forma, contaríamos con un indicador energético (el codo en la producción de calor) del daño celular.

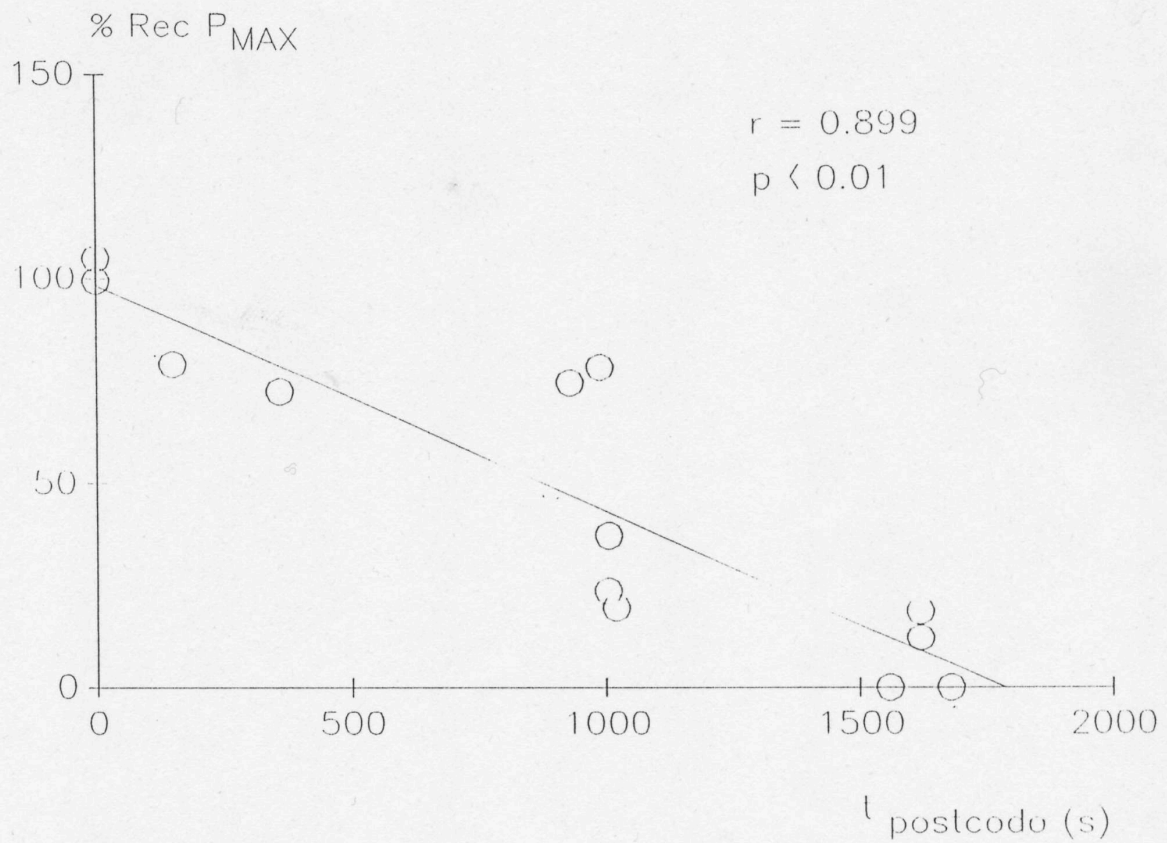


Figura 26: Correlación lineal entre el porcentaje máximo de recuperación de la presión desarrollada (% Rec P_{max}) durante la reperfusión y el tiempo de isquemia posterior a la aparición del codo en la evolución de la producción de calor. Ordenada al origen: 98.3 %; pendiente: $-5.5 \cdot 10^{-2}$ %/s; r: coeficiente de correlación.

Discussion

1.- Aspectos generales

En el presente trabajo de Tesis se evaluó, por primera vez en la literatura y de manera simultánea y conjunta, la evolución mecánica y miotérmica del músculo cardíaco durante la isquemia y posterior reperfusión.

Los registros mecánicos y calorimétricos preisquémicos obtenidos en el presente trabajo resultaron comparables con los que se encuentran en la literatura. A una concentración de Ca^{++} de 0.8 mM, las contracciones obtenidas durante la estimulación estacionaria del músculo (a 1.5 Hz) desarrollaron una presión máxima de $30 \pm 3 \text{ mN/mm}^2$ a 30 °C. Este valor es equiparable al obtenido por otros autores a 30 °C utilizando 2 mM de Ca^{++} (138), si se hace la corrección de acuerdo a la variación de la presión desarrollada en función de la concentración extracelular de Ca^{++} (ecuación de Hill) (133). El calor activo (Ha) liberado durante una contracción a 25 °C (normalizado por gramo de tejido seco) fue de $108 \pm 14.8 \text{ mJ/g}$, comparable a los obtenido por otros investigadores (134). Con respecto a la evolución del metabolismo basal, o más correctamente del metabolismo asociado al reposo mecánico, solo a 25 °C fue posible determinar el calor de reposo (Hr). Esto se debió a que en presencia de 0.8 mM de Ca^{++} y a temperaturas de trabajo de 30 y 35 °C los músculos desarrollaron actividad contráctil espontánea, lo que impidió la evaluación energética del estado de reposo mecánico (30;34). La producción de calor de reposo (Hr) a 25 °C y en presencia de 0.5 mM de Ca^{++} fue de $22.6 \pm 2.8 \text{ mW/g}$, y es equiparable a la obtenida previamente en nuestro laboratorio y a la que registra la bibliografía (61;139). Estos valores se obtuvieron con una concentración de Ca^{++} menor que la utilizada (0.8 mM) en los protocolos experimentales para evaluar la isquemia y reperfusión con

estimulación estacionaria. Sin embargo, nótese que se ha demostrado que la producción de calor de reposo es independiente de la concentración extracelular de Ca^{++} (entre 0.3 y 3 mM)(61;140).

La producción de calor total (Ht) previa al inicio de la isquemia fue menor a temperaturas de trabajo mayores. Este hecho podría explicarse por la conjunción de una serie de factores: i) El Hr es relativamente insensible a la temperatura, comportamiento que se refleja en un Q10 aproximado de 1.3 (24;61), más cercano al de los procesos físicos que al de los metabólicos. De manera que Hr, que representa cerca del 25 % del Ht en normoxia, aumentaría sólo moderadamente con la temperatura. Si tomamos la media de los Hr obtenidos en este trabajo, puede calcularse para un Q10 de 1.3 que el Hr aumentaría de 22.6 mW/g a 25 °C a 29.4 mW/g a 35 °C. ii) La caída en la máxima presión desarrollada y consecuente disminución de Ha con la temperatura. El Ha representa cerca del 75 % del Ht e incluye componentes asociados a la actividad actomiosínica (H3) y componentes independientes de la misma (134)(ver Materiales y Métodos). El componente H3 representa cerca del 45 % del Ha y su sola variación alcanzaría para explicar una parte importante de la caída encontrada del Ht con la temperatura. En efecto, H3 debe disminuir acorde con la disminución de la máxima presión desarrollada desde 32.1 mN/mm² a 25 °C hasta 23.6 mN/mm² a 35 °C. Si las relaciones entre las distintas fracciones de calor observadas a 25 °C se mantuvieran a diferentes temperaturas (134), podría estimarse un valor teórico de Ht de 93 mW/g a 35 °C. Este valor se aproxima a la media de 81 ± 9.4 mW/g obtenida en los experimentos a 35 °C.

2.- Evolución mecánico-energética durante la isquemia en presencia de actividad contráctil

Como ya ha sido expuesto (ver Introducción), la isquemia produce múltiples alteraciones bioquímicas, mecánicas, electrofisiológicas y estructurales (2,77,82). La reducción de los fosfatos de alta energía, la sobrecarga de Ca^{++} citosólico y la acidificación intracelular han sido, entre otros, algunos de los eventos mas estudiados (88). Esto es así debido a las profundas consecuencias de estos factores sobre el funcionamiento cardíaco. Sin embargo, aún no se ha podido establecer la incidencia relativa de cada uno de ellos en las alteraciones durante la isquemia y la reperfusión.

Con respecto a las alteraciones mecánicas que suceden durante la isquemia, **la caída del pico máximo de presión desarrollada se ajustó a la suma de 2 exponenciales con constantes de velocidad marcadamente diferentes**. Esto permitió agrupar a los mecanismos intervinientes en la disfunción contráctil de acuerdo a sus características cinéticas, en: a) procesos de temprana desaparición cuya contribución a 25 °C se agota con un $t_{1/2}$ de 14 s y b) procesos de desaparición tardía que a 25 °C agotan su contribución con un $t_{1/2}$ de 69 s.

Con la metodología utilizada **no se observaron cambios en los procesos de rápida desaparición debidos a la temperatura**. En cambio, **el componente lento incrementó su constante de velocidad con un Q10 de 1.43**. Valores de Q10 de esta magnitud (entre 1.3 y 1.4) han sido observados en el calor de reposo de papilares de rata y conejo (141;142), en el consumo de oxígeno de cortes de ventrículo de rata (143) y en corazones perfundidos arrestados con alto K^+ de perro y cobayo (144;145) y en células aisladas (24). La desaparición durante la isquemia de procesos altamente

dependientes de la temperatura podría explicar, al menos parcialmente, el bajo Q10 encontrado. Uno de estos procesos podría ser, por ejemplo, el consumo de oxígeno (que tiene un Q10 de 1.8). Otra causa posible es la importante participación relativa en el calor total del calor asociado al metabolismo basal a este tiempo de isquemia. Como ya fué discutido, el Q10 del calor de reposo es bajo (entre 1.3 y 1.4) y el aumento porcentual del Hr disminuiría el Q10 de la globalidad de los procesos involucrados en la componente lenta.

La rápida disminución inicial de la presión desarrollada observada en este y otros trabajos se ha tratado de explicar a través de mecanismos metabólicos, iónicos e hidráulicos. Las hipótesis de carácter metabólico sugieren que existe una rápida acumulación de metabolitos capaces de inhibir la generación de fuerza, tales como fosfatos inorgánicos y H^+ (147;148). Otros autores agregan que la reducción en los fosfatos de alta energía tisulares también serían responsables de la disfunción (149).

Las hipótesis de carácter iónico suponen un acortamiento del potencial de acción asociado a la salida de potasio intracelular (150;151). Este fenómeno llevaría a una disminución en las concentraciones transitorias de calcio y a una consecuente reducción en el desarrollo de fuerza. Sin embargo, en los tiempos de ocurrencia de este evento inicial, no fue posible comprobar experimentalmente la disminución de los transitorios de calcio (152;153). Por otro lado, en el presente trabajo H1 y H2 no se modifican en las contracciones aisladas durante la isquemia, por lo que podría descartarse esta hipótesis. En efecto, estos componentes del calor activo H_a se asocian fundamentalmente con la unión de Ca^{++} a sus sitios de "binding" específicos (H1) y la remoción de Ca^{++} citosólico y homeostasis iónica en general (H2)(134). Por lo

tanto, la disminución de las concentraciones transitorias de Ca^{++} implicarían necesariamente la disminución de estos componentes.

Los procesos de rápida evolución tienen un tiempo de ocurrencia superpuesto con el de la caída inicial de la presión de reposo observada (durante la fase 1 de la caída de la misma durante la isquemia). Se ha propuesto que la caída de la presión de reposo implicaría acortamiento del sarcómero que sería la causa de la disminución de la presión desarrollada (mecanismo de Frank-Starling)(154). Sin embargo, esta hipótesis de tipo "hidráulica" aun no ha podido ser corroborada. Algunos trabajos realizados usando inyección de microesferas en el árbol coronario (154) sugieren que este efecto contribuye de manera importante en la caída inicial del desarrollo de presión. Estos y otros autores minimizan la contribución de los procesos metabólicos en el evento argumentando que tanto la declinación de los fosfatos de alta energía como la acumulación de H^+ y fosfatos son demasiado lentos para explicar su desarrollo. También argumentan no haber observado cambios en la excitabilidad muscular. Contrariamente, en trabajos recientes variando la velocidad con que cae la presión en el lecho coronario (155) no fue posible correlacionar ésta con la caída en el desarrollo de presión. Se observó, además, que el incremento de la frecuencia de estimulación y el consumo de oxígeno aceleraba la disfunción contráctil (155), lo que reforzaría las teorías metabólicas sobre el evento. En el presente trabajo no fue posible correlacionar las constantes de velocidad "rápidas" con la temperatura. En consecuencia, los resultados cinéticos obtenidos durante este período inicial no contradicen las teorías de tipo "hidráulico" o de movimientos iónicos de rápida ocurrencia, sin que necesariamente las confirme.

Los procesos causantes de la disfunción isquémica tardía, en cambio, han suscitado menos controversia. Esta caída mas "lenta" en el desarrollo de presión se produce mayormente en condiciones en las que la presión de reposo se mantiene constante (fase 2), luego del descenso inicial atribuible al colapso vascular (fase 1) (154) y previa al inicio de la contractura (fase 3). Parece existir acuerdo sobre el hecho de que la suma de alteraciones metabólicas durante la isquemia sería la causa de la paulatina declinación en el desarrollo de presión. En este trabajo, el aumento que las mayores temperaturas imprimen a esta declinación está en concordancia con esta hipótesis.

Durante el período inicial de la isquemia, se observó una rápida caída en el flujo de calor. Durante los 8 primeros minutos, los músculos disminuyeron en un 80% su producción de calor, en todas las condiciones experimentales analizadas (ver Figs. 12 y 13). La evolución compleja de la respuesta energética durante los 45 min de isquemia está en relación directa con la multiplicidad y variado grado de superposición de los eventos celulares que se suceden. La curva pone de manifiesto las consecuencias que estos eventos celulares tienen sobre los diversos componentes de calor en el músculo cardíaco. De acuerdo a lo expuesto en la Sección Energética Cardíaca (ver Introducción), el calor muscular total se vincula a procesos relacionados con el metabolismo basal (calor de reposo, Hr) y a aquellos relacionados con el metabolismo activo (calor activo, Ha). Estudios realizados en nuestro laboratorio permitieron ajustar la liberación de calor activo a una combinación lineal de 4 funciones de tipo difusional (componentes H1, H2, H3 y H4) (134). Bajo condiciones normales de perfusión cada una de estas funciones se vinculó a eventos celulares que ocurren

durante la contracción: unión del calcio a sitios intracelulares de "binding" (H1); remoción del Ca^{++} citosólico (H2); ciclaje actomiosínico durante la contracción (H3) y actividad mitocondrial calcio-dependiente (componente H4)(134).

La caída en la producción de calor durante la isquemia se produce inicialmente en presencia de actividad contráctil, para luego continuar una vez que esta se ha interrumpido. Durante el período isquémico inicial (en el que aún se registra desarrollo de presión), es posible evaluar el cociente entre la máxima presión desarrollada y el flujo de calor total en cada instante. Este cociente es un índice econométrico de la actividad del músculo. Los índices econométricos pueden calcularse a partir del H3, del H_a o del H_t . El uso del H3 resulta en un indicador asociado básicamente a la actividad enzimática actomiosínica y a la recuperación aeróbica (al menos parcial) del ATP hidrolizado durante la interacción de las miofibrillas. La economía calculada a partir del H_a considera, además de lo anterior, los movimientos de Ca^{++} y la homeostasis iónica del miocito. El uso del H_t , en cambio, relaciona a este parámetro no solo con los componentes del calor activo sino además con el calor de reposo. Dado que para el desarrollo "eficiente" de presión deben funcionar la totalidad de los procesos metabólicos, el uso del H_t permite una evaluación más global de la economía muscular.

Como el desarrollo de presión se anula durante la isquemia con mayor velocidad que la producción de calor, también la economía tiende a anularse. En este trabajo se determinó que su rápida caída inicial da lugar a un descenso más moderado, que se continúa hasta la aparición de una inflexión característica (Fig. 14). A partir de esta inflexión la velocidad de caída de la economía vuelve a incrementarse. El estudio de la evolución del H_r (Fig. 13) hace suponer que no es el principal

responsable de la caída de la economía durante la isquemia ni de su inflexión característica. Esta fracción, que representa el 25 % del Ht, se mantiene relativamente constante durante el primer minuto de isquemia y luego desciende. Su magnitud relativa y su evolución eliminan la posibilidad de que contribuya al descenso inicial de la economía o a la aparición del punto de inflexión. Particularmente la caída del Hr implicaría "per se" un aumento en la economía y no su disminución. Por su parte, el desarrollo homogéneo de la caída de la presión desarrollada durante la isquemia hace que su evolución solo pueda explicar parcialmente el comportamiento de la economía. En efecto, la evolución de la presión desarrollada puede explicar la disminución de la economía, pero no su inflexión.

Han sido descartados el Hr y la máxima presión desarrollada como responsables de la aceleración en la caída de la economía. Consecuentemente **la caída de la economía debe atribuirse prioritariamente al calor activo**. Los experimentos realizados en contracciones aisladas mostraron que H4 se anula mucho más rápidamente que el desarrollo de presión con el corte de perfusión. Tanto en este trabajo como en trabajos previos de nuestro laboratorio se demostró que **este componente (H4) (vinculado a la actividad mitocondrial Ca^{++} dependiente) es altamente dependiente de la presencia de oxígeno y que desaparece en ausencia del mismo** (134). Su anulación, por lo tanto, contribuye a la caída inicial en la producción de calor y por ende no podría explicar una disminución del cociente entre presión desarrollada y calor. El componente H3 (dependiente de la fuerza en condiciones control) varió en el mismo sentido que la caída de presión. Al igual que en anoxia, la relación H3/presión en isquemia disminuye (134) pero permanece constante durante el período en el que la presión desarrollada es significativa. Esta caída inicial

se explica porque una fracción de H3, asociada a la recuperación aeróbica del tejido, desaparece en condiciones de isquemia. Una vez desaparecida la fracción de recuperación, la energía liberada por la interacción actomiosínica se mantiene proporcional al desarrollo de presión (Fig. 19). Sin embargo, algunos trabajos hacen referencia a una disminución de la energía libre de hidrólisis del ATP en condiciones de anoxia (156). Si este fuera el caso, la relación entre la energía liberada por la interacción actomiosínica y el desarrollo de presión (H3/P) debería afectarse, cosa que no ocurre. Por lo tanto, este resultado estaría indicando que, **mientras existe desarrollo de presión, los cambios debidos a la isquemia no son de magnitud como para alterar la energía libre de hidrólisis del ATP.**

Por su parte, H1 y H2 se mantuvieron relativamente estables durante los 8 a 10 primeros minutos de la isquemia a 25 °C. **La invariabilidad de los componentes H1 y H2 permite hipotetizar acerca de la magnitud de las alteraciones isquémicas en las condiciones estudiadas.** Puede suponerse que eventos tales como la acidificación, la acumulación intracelular de fosfatos inorgánicos o la disminución de los fosfatos de alta energía (ver Introducción) o no se han iniciado o no han alcanzado los niveles necesarios para alterar significativamente los procesos asociados con los componentes H1 y H2. En general, los resultados están de acuerdo con los previamente publicados en condiciones de anoxia, en los que los componentes del calor activo se modificaron en el mismo sentido (134). Es factible interpretar, en base a estos datos, que la caída en **la economía durante la isquemia se produce debido a la relativa invariabilidad inicial de H1 y H2.** Al reducirse los valores de H3 paulatinamente y mantenerse la suma de H1 y H2 constante, esta comienza a ser de

una influencia porcentual progresivamente mayor y produce la inflexión en la economía que eleva la velocidad de caída de la misma.

Independientemente de la evaluación previa, es importante notar que **no fue posible determinar una relación entre los tiempos de aparición del punto de inflexión en la evolución de la economía y el grado de recuperación de la máxima presión desarrollada durante la reperfusión**. Si el punto de inflexión se relacionara con el daño celular isquémico, entonces cabría esperar una menor recuperación de la presión desarrollada durante la reperfusión asociada a la aparición mas temprana del mismo. Estos hechos permitirían concluir que, de acuerdo al nivel de análisis alcanzado en este trabajo, **la evolución de la economía estaría mas asociada a la necesidad de ahorro energético que al daño inducido**.

3- Evolución mecánico energética durante la isquemia en ausencia de actividad contráctil

El cese de desarrollo de presión se produce a tiempos variables de isquemia, pero siempre durante la fase estable de la PR (fase 2). Este período de estabilidad de la PR se relaciona con la ausencia de contractura, la que se inicia mas tempranamente con el incremento de la temperatura (inicio de la fase 3 de la PR) (Tabla V). La causa de la contractura observada estaría mas asociada al rigor (por falta de ATP) que al ingreso masivo de Ca^{++} que generaría mas uniones fuertes actomiosínicas (157). La disminución de la actividad de las bombas de recaptación de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico (por falta de ATP)(110;118) podría aumentar la concentración citosólica de este ion y por ende la contractura. Sin embargo, se ha sugerido que no sería la

disminución por debajo de un cierto valor umbral en la concentración total de ATP la que desencadenaría la contractura. Trabajos recientes sugieren que el estado relajado del miocardio se mantendría en base a la generación de ATP por glucólisis anaeróbica o creatina fosfato proveniente del medio intracelular cercano a las miofibrillas (158). Mas aún, la observación de que el inicio de la contractura es coincidente con el del inicio del "plateau" de pH intracelular implicaría que la contractura comienza cuando la producción anaeróbica de ATP se detiene (159). Es decir que en el inicio de la fase 3 de la PR (Fig. 10) la producción de ATP por glucólisis sería nula o no significativa. Previsiblemente, las reservas compartimentalizadas del ATP encargado de mantener el estado relajado no se agotan de manera inmediata. Este agotamiento paulatino de las reservas produciría el aumento concomitante en la PR hasta llegar a un máximo que se alcanza mas rápidamente a mayores temperaturas (Fig.10). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que esta hipótesis no descarta la posibilidad de la participación de un componente Ca^{++} dependiente en el desarrollo de la contractura.

La fase 4 de la evolución de la presión de reposo se caracteriza por una disminución que se incrementa con la temperatura (Fig. 10). Probablemente esta caída de la PR no signifique menor cantidad de uniones fuertes actomiosínicas (rigor), menor nivel de contractura y por ende un mejoramiento del estado metabólico y funcional del músculo. Al contrario, la dependencia observada con la temperatura de este efecto (Tabla V) permite suponer que se vincula con el déficit energético y concomitante deterioro celular. De hecho, **el inicio de la caída de la presión de reposo (fase 4) siempre se produce cuando la producción de calor esta cayendo** (Fig. 16). Mas aún, la velocidad de caída en la producción de calor se incrementa significativamente con la temperatura (Tabla VI). Por lo tanto, podría suponerse que, al

igual que lo que ocurre en corazones privados de energía química por inhibición con iodoacetato (160), en estos corazones el deterioro celular causado por la isquemia lleva al desgarro muscular y caída de la PR.

Luego de la desaparición del desarrollo de presión, la producción de calor continúa decreciendo hasta alcanzar valores de relativa estabilidad. Dado que no hay desarrollo de presión, y basándonos en los resultados obtenidos a partir de contracciones aisladas, puede asumirse que los valores de H3 son despreciables o nulos. De manera que el descenso en la producción de calor se debería fundamentalmente a la disminución de Hr, H1 y H2.

En el músculo cardíaco el calor activo Ha representa aproximadamente el 75% del calor total Ht y el componente H3 asociado al ciclaje actomiosínico representa alrededor del 45% del mismo (134). Por lo tanto, H3 equivaldría al 34% del Ht. Es decir que, si durante la isquemia las distintas fracciones de calor conservaran una relación porcentual similar a la control, el cese del desarrollo activo de presión explicaría cerca de un 40% de la caída total en la producción de calor. La disminución de Hr durante la isquemia representa alrededor de un 20 % de la del Ht. La suma de estos valores no alcanza para explicar la totalidad del descenso en la producción de calor (cerca al 90%). Por lo tanto, debe concluirse que **la energía vinculada a la activación de la contracción, es decir los componentes H1 y H2, también debe disminuir.**

Como ya ha sido expuesto (ver Introducción) el músculo cardíaco posee un metabolismo basal particularmente elevado (en relación al músculo esquelético) cuya manifestación miotérmica es el llamado calor de reposo (Hr). El Hr depende de la temperatura, osmolaridad, concentraciones extracelulares de potasio (34,61) y puede representar hasta un 25% del Ht en normoxia (134). **El calor de reposo (Hr) cae**

durante la isquemia y algunos eventos durante la misma permitirían conjeturar sobre esta declinación. La actividad de la bomba Na^+/K^+ -ATPasa, por ejemplo, que en condiciones de perfusión control puede llegar a representar el 25 % del Hr (57,58,59), podría contribuir con su inhibición durante la isquemia (106) en la reducción del mismo.

Para estudiar el comportamiento del Hr durante la isquemia a 25 °C, se realizaron protocolos en los que se midió el calor liberado por el músculo en condiciones de arresto mecánico.

A 25 °C con un H_t preisquémico de 102 mW/g y un Hr medido de 27.4 mW/g, es posible evaluar a partir de la Ec.2 (ver Resultados) un Hr de 6.1 mW/g a los 45 min de isquemia. El valor experimental del calor total obtenido en ese tiempo fue de 9.7 mW/g. La diferencia entre ambos valores podría deberse a que el valor experimental incluye el calor de activación H_a . En cambio, la fórmula obtenida para el cálculo de Hr (Ec.2) resulta de experimentos en ausencia de estimulación eléctrica. Podríamos hipotetizar que, de variar el Hr de acuerdo a la Ec.2 (a 25 °C), el H_t y el Hr a los 45 min de isquemia tendrían valores cercanos. Estos valores solo diferirían en la existencia o no de calor de activación. Es decir, **durante la isquemia y a las temperaturas de trabajo menores, la producción de calor total tendería a aproximarse al calor de reposo.**

Dado que durante la isquemia no se suspendió la estimulación eléctrica, seguirían activos, al menos durante cierto tiempo, los mecanismos vinculados al componente no contráctil del calor activo, o calor de activación. Este se vincula a la despolarización y activación de la fibra (ver Introducción) y representa cerca del 23 % del calor activo. Algunas alteraciones celulares durante la isquemia permiten hipotetizar acerca de una disminución del mismo. En efecto, el componente asociado a la

remoción del Ca^{++} citosólico y el restablecimiento del gradiente electroquímico para Na^+ y K^+ (H2) podría reducirse durante la isquemia por: i) la inhibición de las bombas sarcolemales ATP-dependientes para la extrusión de Ca^{++} , como consecuencia de la caída en los niveles de fosfatos de alta energía (116;117), ii) la baja actividad de las bombas de Ca^{++} del retículo sarcoplásmico debido al aumento intracelular de Mg^{++} y H^+ (110;118) y iii) la inhibición de la bomba $\text{Na}^+\text{-K}^+$ ATPasa del sarcolema (106). Sin embargo, **no se observó una reducción de H2 durante la isquemia temprana** (Fig. 18). Por lo tanto, podemos suponer que, durante los primeros min de isquemia, los efectos antes citados no alcanzan la magnitud suficiente como para disminuir el componente H2. Estos efectos (i;ii;iii) aumentarían paulatinamente su importancia relativa con la duración de la isquemia. Lamentablemente, aún carecemos de información que pueda asegurar en qué momento estos factores afectan significativamente al proceso de activación.

El “binding” de Ca^{++} , ya sea a sus sitios específicos ó inespecíficos, es un proceso exotérmico que contribuye al calor total liberado. Este componente de calor asociado a la unión de Ca^{++} a sus sitios intracelulares específicos (H1) representa una fracción de menor magnitud (aproximadamente un 10%) si se la compara con el resto de los componentes del calor activo (134). Sin embargo, su peso relativo porcentual podría ser mayor si se considera la anulación del componente H4 durante la isquemia. La disminución del pH (probablemente pequeña, dado que **al inicio de la isquemia H1 no varía**, ver Fig. 17) sería mayor a tiempos avanzados de isquemia. Por lo tanto, H1 disminuiría si, como indican algunos estudios, la afinidad del Ca^{++} por sus sitios de unión es menor por efecto de la acidosis intracelular durante la isquemia (107).

Como ya fue discutido, luego de la desaparición del desarrollo de presión la producción de calor continúa disminuyendo hasta alcanzar valores de relativa estabilidad (Figs. 11 y 12). Sin embargo, **en todos los experimentos a 30 y 35 °C y en algunos a 25 °C se produce un incremento en la velocidad de caída del flujo de calor durante la isquemia que da lugar a una inflexión que fue llamada codo** (Fig. 12). Esta inflexión se produce a tiempos característicos en cada temperatura estudiada (Tabla VI) y el tiempo de duración de la isquemia posterior a él se correlaciona con la recuperación de la actividad contráctil durante la reperfusión ($r=0.899$; $p<0.01$)(Fig. 26). Es decir que **el codo aparecería como un indicador de la discapacidad funcional derivada de los procesos de isquemia y reperfusión cardíacos**. Hasta el presente, ninguna de las variables estudiadas consideradas de importancia en estos procesos presentan una evolución temporal capaz de predecir con este grado de certeza las consecuencias derivadas de los mismos. En efecto, ni la evolución temporal de los niveles tisulares de fosfatos de alta energía ni la de iones considerados de importancia en el metabolismo cardíaco (Ca^{++} , Mg^{++} , H^+) presentan puntos característicos que permitan este grado de predicción.

La aparición del codo siempre se produce con posterioridad al inicio de la contractura (Fig. 16 y Tabla VII) y por lo tanto cuando la producción anaeróbica de ATP se ha interrumpido (ver anteriormente)(159). Además, su aparición es previa al nivel máximo de contractura, lo que permite suponer que aun no se ha gastado completamente el ATP de reserva destinado a mantener el estado relajado. La inhibición de la glucólisis anaeróbica permite hipotetizar sobre algunos eventos de posible ocurrencia en este período. Es sabido que la isquemia produce una acumulación de K^+ extracelular (76;161) que se incrementa por la interrupción de la vía

anaeróbica de producción de ATP (162). Esta acumulación en parte podría deberse a un aumento en la conductancia del K^+ , posiblemente vinculada a los canales de K^+ - ATP dependientes. Estos canales se activarían cuando las concentraciones de ATP de su microentorno caen por debajo de un valor crítico (162). El ATP producido en anaerobiosis sería la fuente principal vinculada a estos canales y por lo tanto la inhibición de la glucólisis anaeróbica los activaría (162).

Por otro lado, cercano al tiempo de aparición del codo podría esperarse una inhibición casi total de la bomba Na^+/K^+ . En efecto, es sabido que el funcionamiento de esta bomba -que contribuye con hasta un 25% del calor de reposo (57;58;59)- depende del ATP proveniente de la glucólisis anaeróbica (163) y su inhibición podría reflejarse en los registros miotérmicos.

La suma de estos eventos finalmente favorecería la observada acumulación de K^+ extracelular y Na^+ intracelular (83;106;161). En esta situación - hipotéticamente- se vería favorecido el intercambio Na^+/Ca^{++} (116;119), con la consecuente acumulación intracelular de Ca^{++} . El aumento del Ca^{++} intracelular contribuiría al menos parcialmente al aumento de la PR y se vincularía al daño isquémico.

3.- Evolución mecánico energética durante la reperfusión

La reinstauración de la perfusión eleva (en alrededor de 30 s) la presión de reposo hasta un valor (pico) luego del cual desciende moderadamente (Fig. 20). Posteriormente, ésta tiende a sus valores controles (a 25 °C) o se mantiene elevada (a 35 °C) (Fig 21). Esta rápida elevación inicial de la presión de reposo podría vincularse a: i) la elevación de la presión intravascular causada por la reperfusión, con el

consecuente estiramiento de las fibras (154), ii) el ingreso masivo de Ca^{++} desde el espacio extracelular. Este último efecto fué corroborado en experimentos realizados en corazones de rata tratados con "aequorin", en los que se observó una importante emisión de luz en los 2 minutos iniciales de la reperfusión (164).

Ambos eventos tendrían efectos diferentes sobre la presión de reposo y la contractura muscular, cuantitativa y cualitativamente. Mientras que el estiramiento mecánico de las fibras aumentaría moderadamente la presión de reposo sin modificar la contractura, el ingreso de Ca^{++} (aumentando el ciclado de ATP Ca^{++} dependiente a nivel de los puentes actomiosínicos)(157) incrementaría la contractura y la presión de reposo.

Luego del pico en la presión de reposo, la relajación alcanzada durante la reperfusión es mayor a menores temperaturas. Este efecto se asocia a un menor grado de daño tisular que implicaría mayor recuperación de los niveles de fosfatos de alta energía. Por ende, la célula tendría (entre otras cosas) mayor posibilidad de disminuir los niveles citosólicos de Ca^{++} y el número de uniones "fuertes" actomiosínicas. En concordancia con la mayor disponibilidad energética postulada, la recuperación del desarrollo de presión fué mayor a menores temperaturas de trabajo.

La reperfusión también eleva rápidamente la producción de calor, la que alcanza un valor máximo (Valmax) y luego cae hasta asumir valores relativamente estables (H_{estab})(Figs 22 y 23). La aparición de un valor máximo cercano a los 3 min de reperfusión parecería estar ligada a la interacción actomiosínica, como lo sugieren los experimentos con perfusión con BDM, un inhibidor de la actividad actomiosínica (Fig. 24). La reoxigenación y la rápida normalización del bajo pH intracelular (inhibidor de la glucólisis anaeróbica)(165)

inducirían el reestablecimiento de la producción de energía química. La creciente disponibilidad energética permitiría el aumento de la actividad de las bombas ATP-dependientes para la remoción de Ca^{++} así como la disminución del estado de rigor. Sin embargo, el ingreso masivo de Ca^{++} (164) durante la reperfusión sería cuantitativamente mas importante, por lo que la presión de reposo aumentaría hasta alcanzar un pico (Fig. 20). Luego del pico, la disminución de la presión de reposo se vincularía al cese del influjo extracelular de Ca^{++} , a la remoción del mismo y a la posibilidad de generar ATP y disminuir la contractura. La manifestación calorimétrica de estos procesos exotérmicos conduciría a un Valmax en la producción de calor, que decaería conjuntamente con la remoción del Ca^{++} citosólico. Esta hipótesis estaría en concordancia con la aparición del pico en la PR previa a la del Valmax en la producción de calor.

El reestablecimiento de la actividad contráctil solo se produce con posterioridad al pico de la presión de reposo y cuando la producción de calor se estabiliza (H_{estab}). Este hecho puede inducirnos a una reflexión de carácter general, si se lo asocia a la rápida disfunción contráctil durante la isquemia. En efecto, podría decirse que, en el músculo cardíaco energéticamente deficitario, la función específica prioritaria (la contracción) es lo primero que se anula y lo último que se reestablece.

La producción de calor posterior al Valmax (H_{estab}) representó valores porcentuales similares (en relación a los preisquémicos) a todas las temperaturas estudiadas (Tabla VIII). Como el daño celular irreversible durante la isquemia y la reperfusión aumenta con la temperatura, podríamos suponer que en los experimentos **a mayor temperatura una menor cantidad de tejido viable produce**

niveles equiparables de flujo calórico. Mas aún, la producción porcentual de calor a distintas temperaturas es similar pese a que la recuperación de la actividad contráctil es marcadamente diferente (89 % a 25 °C vs 8 % a 35 °C). Por lo tanto, **no existe vinculación entre la producción de calor durante la reperfusión y el daño previo o la capacidad de recuperación mecánica.** Este resultado permite establecer que **la disociación entre la recuperación de la actividad contráctil y la producción de calor es la causa prioritaria de la caída de la economía durante la reperfusión.** Además, permite asumir que la participación relativa en el H_{estab} de los componentes de calor independientes de la actividad actomiosínica y la generación de presión es mayor con el incremento de la temperatura. Por lo tanto, **la disfunción contráctil durante la reperfusión se asocia a altos niveles de calor independiente de tensión y/o calor de reposo.** Dado que los H_{estab} son similares a todas las temperaturas estudiadas, **la recuperación del desarrollo de presión debe ser conjunta con la caída del calor de reposo y/o los componentes del calor de activación.** De no ser así, debería encontrarse un importante aumento en el flujo de calor asociado a la recuperación de la actividad contráctil, cosa que no ocurre. Esta observación permite hipotetizar que la recuperación de la actividad contráctil está supeditada al reestablecimiento de condiciones previas, como por ejemplo la recuperación de la homeostasis iónica. Es decir que el desarrollo de presión sólo se produciría con posterioridad al reestablecimiento de condiciones básicas para la homeostasis celular.

Sumario

La comprensión de los procesos energéticos vinculados al metabolismo cardíaco es fundamental en un tejido que, en reposo, es responsable de más del 10% del consumo total de O_2 . Siendo el suministro de nutrientes a todos los tejidos dependiente de su funcionamiento, conservar su viabilidad es de vital importancia. Gran parte de la patología cardíaca se debe a reducciones de su flujo arterial (cuadros isquémicos) al punto de ser una de las causas de muerte más frecuentes. La reinstauración del flujo en las zonas isquémicas (reperfusión) no necesariamente restablece el funcionamiento miocárdico normal, y puede generar "per se" daños tisulares. Por lo tanto, el conocimiento de los procesos que ocurren durante la isquemia y reperfusión cardíacas es de interés tanto teórico como por su aplicación clínica.

Dado que la injuria isquémica compromete la producción de energía y viabilidad de los miocitos, para la comprensión del fenómeno es necesario contar con una evaluación energética continua del músculo cardíaco. Actualmente hay numerosos trabajos que evalúan energéticamente al miocardio. Sin embargo, las metodologías empleadas presentan, en general, limitaciones. Las limitaciones más comunes se deben a que los métodos se basan en mediciones discontinuas o son inaplicables cuando se suspende la perfusión tisular. En relación a los enfoques miotérmicos, como no todas las metodologías en uso pueden aplicarse a tejidos perfundidos sometidos a isquemia, no existen evaluaciones termodinámicas del miocardio en estas condiciones.

En el presente trabajo de Tesis se evaluó, por primera vez en la literatura y de manera simultánea y conjunta, la evolución miotérmica y mecánica del músculo cardíaco durante la isquemia y posterior reperfusión. Los resultados obtenidos permiten no solo establecer la sucesión temporal de eventos mecánico-energéticos sino que además sugieren posibles mecanismos vinculados a ellos. A la vez, posibilitan evaluar el grado de vinculación entre la ocurrencia de estos eventos y la recuperación de la disfunción contráctil durante la reperfusión. Es decir, se han logrado índices

predictivos de la recuperación mecánica y/o daño asociado durante la reperfusión. Por otro lado, los resultados obtenidos permiten re-evaluar el grado de participación de eventos isquémicos descritos en la literatura. El trabajo analiza microcalorimétricamente el calor total liberado (Ht) y la respuesta mecánica de ventrículos de rata estimulados a 1.5 Hz durante 45 min de isquemia y 45 min de reperfusión. La incidencia de la temperatura fue analizada a 25, 30 y 35 °C. La influencia de la isquemia sobre los diferentes componentes identificables del calor activo en una contracción aislada (H1, H2, H3 y H4) se estudió a 25 °C durante los 10 primeros minutos de isquemia.

La isquemia genera una importante caída de Ht, que porcentualmente no difiere a las distintas temperaturas de trabajo utilizadas (90%). Este decremento puede dividirse en dos períodos. Un período inicial en el que en 8 min se produce alrededor del 80% de la caída de Ht y otro período tardío en el que el músculo mantiene relativamente estable su producción de calor.

Por su parte, la suspensión del flujo disminuyó el desarrollo de presión generada por el músculo (P). Esta caída de la presión se ajustó a una función que es la suma de dos exponenciales cuyas constantes de velocidad difieren en magnitud aproximadamente 5 veces una de la otra. Este hecho permite agrupar los mecanismos intervinientes en la caída de la presión desarrollada durante la isquemia por sus características cinéticas (componente rápida y componente lenta). Se observó que la temperatura no afecta a la componente rápida mientras que acelera la lenta. Esta observación sugiere que causas diferentes de las metabólicas están implicadas en la rápida caída inicial de la P y, por lo tanto, esto está de acuerdo con teorías tales como la del "colapso vascular" para explicar la disfunción.

La disminución de Ht durante la isquemia es parcialmente debida a la caída en la generación de P. Sin embargo, se continúa luego de la desaparición de la actividad contráctil. Dado que la caída de H es más lenta que la de P, hay una alteración en la economía para el desarrollo de presión (Eco), evaluada como Ht/P .

La evolución de la Eco hasta su anulación es compleja. Luego de una rápida caída inicial el descenso se hace mas moderado y se continúa hasta la aparición de un punto de inflexión (P_{inf}) a partir del cual se incrementa su velocidad de caída. No se observaron cambios ni en la evolución temporal de la Eco ni en la aparición de su P_{inf} con la temperatura. Mas aún: el análisis de la evolución temporal de la Eco y de su P_{inf} no brinda información sobre la posibilidad de recuperación mecánica durante la reperfusión cardíaca. Entonces, la caída de la economía no se debería a la aparición durante la isquemia de un mecanismo que necesariamente involucre daño celular sino que estaría asociada fundamentalmente al ahorro energético.

A partir del estudio de las contracciones aisladas es posible explicar la evolución observada de la economía, a la vez que limitar los posibles alcances de algunos eventos referidos en la literatura. En efecto, en las condiciones experimentales utilizadas, los componentes H1 (vinculado al "binding" intracelular de Ca^{++}) y H2 (asociado a la remoción de Ca^{++} y homeostasis iónica) no se modifican. En cambio H4 (relacionado a una actividad mitocondrial Ca^{++} dependiente) se anula y H3 (asociado a la actividad actomiosínica) se mantiene proporcional al desarrollo de P. La invariabilidad de H1 y H2 explica la evolución de la economía. En efecto, al reducirse los valores de H3 paulatinamente y mantenerse la suma de H1 y H2 constante, ésta comienza a ser de una influencia porcentual mayor que eleva la velocidad de caída de la economía. Además, se logró disociar la generación de presión (actividad contráctil) del componente de calor vinculado a la actividad mitocondrial Ca^{++} dependiente. Por otro lado, los resultados sugieren que algunas alteraciones isquémicas comunmente referidas por la literatura (por ejemplo, en los niveles transitorios de Ca^{++} citoplasmático, homeostasis iónica y variación de la energía libre de hidrólisis del ATP) no tienen la magnitud suficiente para alterar H1, H2 y/o la relación H3/P.

Ya en ausencia de generación de fuerza, en el período tardío de disminución de H_t , se produce un incremento en la velocidad de caída de la producción de calor. Este incremento da lugar a una inflexión llamada **codó**. La iniciación de la reperfusión posterior a él impide la recuperación total del desarrollo de P. Además, la aparición del

modo se adelanta con el aumento de la temperatura y siempre ocurre con posterioridad al inicio de la contractura. Cuanto mas tiempo transcurra entre la aparición del codo y la reperfusión menor será el grado de recuperación de la actividad contráctil. De hecho, el tiempo de isquemia posterior a él se correlaciona en forma inversa con la recuperación de la actividad contráctil durante la reperfusión ($r = 0.899$; $p < 0.01$). Por lo tanto, el codo aparecería como un indicador de la discapacidad funcional derivada de los procesos de isquemia y reperfusión cardíacos. Ni el estudiado P_{inf} de la economía ni las variables consideradas de importancia en estos procesos (niveles de fosfatos de alta energía; concentraciones intracelulares de Ca^{++} , H^+ , Mg^{++} , Na^{++} y otras) presentan este nivel de predicción de las consecuencias funcionales de la isquemia.

La reperfusión elevó la PR y la producción de calor. La PR se eleva hasta un valor **pico**, luego del cual desciende moderadamente y tiende a sus valores controles (a 25 °C) o se mantiene elevada (a 35 °C). Por su parte, la producción de calor alcanza un valor máximo (Val max) y luego cae hasta valores relativamente estables (H_{estab}). La aparición del Valmax parece asociarse con el pico de la PR, y puede ser suprimida por la inhibición de la actividad actomiosínica.

Pese al distinto grado de necrosis tisular esperado, con posterioridad al Valmax la producción de calor (H_{estab}) fue porcentualmente similar a todas las temperaturas estudiadas. Sin embargo, la recuperación de la actividad contráctil fue marcadamente diferente (89% a 25 °C vs 8% a 25 °C). Esta disociación (causa prioritaria de la baja recuperación de la economía) indica que no existe relación entre el nivel de Ht alcanzado durante la reperfusión y la posibilidad de recuperación de la actividad contráctil. Además, permite deducir que, durante la reperfusión, la participación relativa de los componentes de calor independientes de la generación de presión se incrementa con la temperatura. Por lo tanto, la disfunción contráctil durante la reperfusión se asocia a altos niveles de calor independiente de tensión. Esto puede pensarse como la necesidad de reestablecer condiciones celulares (tales como la homeostasis iónica) previo al desarrollo de actividad contráctil.

Bibliografia

- 1.- Gibbs CL, Chapman JB. Cardiac Energetics. In Handbook of Physiology, Sec 2: The cardiovascular system, Vol 1. Edited by RM Berne, N Sperelakis, **SR Geiger**. **Chapter 22**: 775-804, Am Physiological Society, Maryland, 1979a.
- 2.- Jennings R.B., Reimer K.A. The cell biology of acute myocardial ischemia. **Annu Rev Med 42**: 225-246, 1991.
- 3.- Sun, D.; Nguyen, N.; De Grado, T.R.; Schwaiger, M; Brosius III, F.C. "Ischemia induces translocation of the insulin-responsive glucose transporter Glut 4 to the plasma membrane of cardiac myocytes". **Circulation 89**, 793 (1994).
- 4.- Wollenberger A., Krause E. Metabolic control characteristics of the acutely ischemic myocardium. **Am J Cardiol 22**: 349-59, 1968.
- 5.- Hill AV. The recovery heat production in oxygen after a series of muscle twitches. **Proy Roc Soc London, Ser B 103**: 181-191, 1928.
- 6.- Gibbs CL, Gibson WR. Energy production of rat soleus muscle. **Am Physiol 223**: 864-871, 1972.
- 7.- Chapman J.B., Gibbs CL. The effect of metabolic substrate on mechanical activity and heat production in papillary muscle. **Cardiovasc Res 8**: 656-667, 1974.
- 8.- Bodem R., Sonnenblick E.H. Mechanical activity of mammalian heart muscle: variable onset, species differences, and the effect of caffeine. **Am J Physiol 228**: 250-261, 1975.
- 9.- Brutsaert DL. Concerning contraction and relaxation of the heart. **Verhandelingen van de Koninklijke voor Geneeskunde van Belgie, 41 (1)**:14-80, 1979.
- 10.- Suga H., Yamada O., Goto Y. Energetics of ventricular contraction as traced in the pressure-volume diagram. **Federation Proc 43**: 2411-2413, 1984.
- 11.- Ponce-Hornos JE, Langer GA. Effects of inorganic phosphate on ion exchange, energy state and contraction in mammalian heart. **Am J Physiol 242**: H79-H88, 1982.
- 12.- Dominguez-Mon M, Ponce-Hornos JE, Gomez R, Cannata MA, Taquini AC. Energetic, metabolic and contractile effects of vasopressin in mammalian heart. **Meth & Find Exptl Clin Pharmacol 6**: 373-378, 1984.
- 13.- Suga H. Ventricular Energetics. **Physiol Rev 70**: 247-277, 1990.
- 14.- Kobara M., Tatsumi T., Matoba S., Yamahara Y., Nakagawa C., Ohta B., Matsumoto T., Inoue D., Asayama J., Nakagawa M. Effect of ischemic preconditioning on mitochondrial oxidative phosphorylation and high energy phosphates in rat hearts. **J Mol Cell Cardiol 28**: 417-428, 1996.

- 15.- Asimakis G.K. Myocardial glycogen depletion cannot explain the cardioprotective effects of ischemic preconditioning in the rat heart. **J Mol Cell Cardiol** **28**: 563-570, 1996.
- 16.- HE Bøtker, HH Kimose, AR Thomassen and TT Nielsen. Applicability of small endomyocardial biopsies for evaluation of high energy phosphates and glycogen in the heart. **J Mol Cell Cardiol** **27**: 2081-2089, 1995.
- 17.- Przyklenk K., Bauer B., Kloner R.A. Reperfusion of hibernating myocardium: Contractile function, high-energy phosphate content, and myocyte injury after 3 hours of sublethal ischemia and 3 hours of reperfusion in the canine model. **Am Heart J** **123**: 575-588, 1992.
- 18.- Goodwin G.W., Taegtmeyer H. Metabolic recovery of isolated working rat heart after brief global ischemia. **Am J Physiol** **267**: H462-H470, 1994.
- 19.- Drake-Holland A.J. Cardiac metabolites: the importance of supply and demand. **Heart perfusion, energetics, and ischemia** (L. Dintenfass, D.G. Julian, G.V.F. Seeman) **Life Sciences** **62**: 433-440, 1983.
- 20.- Rhode E. Über den einfluss der mechanischen Bedingungen auf die tätigkeit un den Sauerstoffverbrauch der Warmbluterherzans. **Naunyn Schmiedebergs Arch Exp Pathol Pharmakol** **68**: 401-434, 1912.
- 21.- Gibbs C.L., Papadoyannis D.E., Drake A.J., Noble M.I.M. Oxygen consumption of the non working and potassium chloride-arrested dog heart. **Circ Res** **47**: 408-417, 1980.
- 22.- Suga H., Yamada O., Goto Y., Igarashi Y., Yasumura Y, Nozawa T., Futaki S. Left ventricular O₂ consumption and pressure-volume area in puppies. **Am J Physiol** **253**: H770-H776, 1987.
- 23.- Ricchiuti NV, Gibbs CL. Heat production in a cardiac contraction. **Nature London** **208**: 897-898, 1965.
- 24.- Ponce-Hornos JE, JM Parker and GA Langer. Heat production in isolated heart myocytes: differences among species. **Am J Physiol** **258 (Heart Circ. Physiol. 27)**: H880-H886, 1990.
- 25.- Drake A.J. Substrate utilization in the myocardium. **Basic Res Cardiol** **27**: 1-72, 1982.
- 26.- Issekutz B., Miller H.L., Rohdahl K. Effect of lactic acid on free fatty acids and glucose oxidation in dogs. **Am J Physiol** **209**: 1137-1144, 1965.
- 27.- Drake A.J., Haines J.R., Noble M.I.M. Preferential uptake of lactate by the normal myocardium in dogs. **Cardiovas Res** **14**: 65-72, 1980.

- 28.- Papadoyannis D.E. The influence of calcium ion availability on cardiac contraction: a study of energy requirements and factors affecting glycolysis. **Ph. D. Thesis**. University of London, 1980.
- 29.- Noble M.I.M. Energy transfer by the heart. **Heart perfusion, energetics, and ischemia** (L. Dintenfass, D.G. Julian, G.V.F. Seeman) **Life Sciences 62**: 539-547, 1983.
- 30.- Ponce-Hornos J.E. Energetics of calcium movements. **Calcium and the heart**, Langer G.A. Ed., Raven Press, 269-298, 1990.
- 31.- Drake-Holland A.J. Substrate Utilization. **Cardiac Metabolism** D.Holland-Noble Eds., John Wiley & Sons, 195-213, 1983.
- 32.- Borle A.B., Freudenrich C.C., Snowdowne K.W. A simple method for incorporating aequorin into mammalian cells. **Am J Physiol 251**: C323-C326, 1986.
- 33.- Ohsuzu F., Bessho M., Yanagida S., Sakata N., Takayama E., Nakamura H. Comparative measurement of myocardial ATP and creatine phosphate by two chemical extraction methods and ³¹P-NMR spectroscopy. **J Mol Cell Cardiol 26**: 203-210, 1994.
- 34.- Ponce-Hornos JE, Marquez MT, Bonazzola P. Influence of extracellular K on the energetics of resting heart muscle. **Am J Physiol 262**: H1081-H1087, 1992.
- 35.- Mast F., Woledge R.C., Elzinga G. Analysis of thermopile records from contracting isolated cardiac muscle. **Am J Physiol 259**: H1601-H1605, 1990.
- 36.- Ingwal, J.S.; Bittl, J.A. Regulation of heart creatine kinase. **Cardiac energetics. Basic mechanisms and clinical implications**. Jacob R, Just H, Holubarsch Eds., Springer - Verlag New York, 93-102, 1987.
- 37.- Balaban, RS; Heineman, FW. Control of mitochondrial respiration in the heart in vivo. **Molec and Cell Biochemistry 89**: 191-197, 1989.
- 38.- Spencer, RGS; Balschi, JA; Leigh JS; Ingwall JS. ATP synthesis and degradation rates in the perfused rat heart. **Biophys J. 54**: 921-929, 1988.
- 39.- Flaherty J.T., Weisfeldt M.L., Bulkley B.H., Gardner T.J., Gott V.L., Jacobus W.E. Mechanisms of ischemic myocardial cell damage assessed by phosphorus-31 nuclear magnetic resonance. **Circulation 65**: 561, 1982.
- 40.- Marban E., Kitazake M., Kusuoka H., Porterfield J.K., Yue D.T., Chacko V.P. Intracellular free calcium concentration measured with ¹⁹F-NMR spectroscopy in intact ferret hearts. **Proc Natl Acad Sci USA 84**: 6005-6009, 1987.
- 41.- Keller A.M., Sorce D.J., Cannon P.J. Monitoring myocardial intracellular sodium without a shift reagent using double quantum magnetic resonance spectroscopy (Abstract). **Circulation 78**: (Suppl II): II-495, 1988.

- 42.- Garlick P.B., Radda G.K., Seeley P.J. Studies of acidosis in the ischaemic heart by phosphorus nuclear magnetic resonance. **Biochem J** **184**: 547-554, 1977.
- 43.- Marban E., Kitazake M., Koretsune Y., Yue D.T., Chacko V.P., Pike M.M. Cuantification of $[Ca^{2+}]$ in perfused hearts. Critical evaluation of the 5F-BAPTA and nuclear magnetic resonance method as applied to the study of ischaemia and reperfusion. **Circ Res** **66**: 1255-1267, 1990.
- 44.- Pike M.M., Kitazake M., Marban E. Increase in intracellular free sodium concentration during ischemia revealed by ^{23}Na -NMR in perfused ferret hearts (Abstract). **Circulation** **78**: (Suppl II): II-151, 1988.
- 45.- Borchgrevink P.C., Bergan A.S., Bakoy E.O., Jynge P. Magnesium and reperfusion of ischemic rat heart as assessed by ^{31}P -NMR. **Am J Physiol** **256**: H195-H204, 1989.
- 46.- Dawson, MJ. Nuclear magnetic resonance. **Cardiac Metabolism**. Drake-Holland AJ; Noble, NIM; eds. **John Wiley & Sons. New York**, 309-338, 1983.
- 47.- Ponce-Hornos JE, Ricchiuti NV, Langer GA. On-line calorimetry in the arterially perfused rabbit intraventricular septum. **Am J Physiol** **243**: H289-H295, 1982.
- 48.- Helmholtz H. **Arch Anat Physiol** **144-164**, 1848.
- 49.- Hill AV. Trails and Trials in Physiology. **Edward Arnold Publishers Ltd, 1965**.
- 50.- Neill WA, Wagner RJ, Messner JV, Krasnov N, Gorlin R. Left ventricular heat production measured by coronary flow and temperature gradient. **J Appl Physiol** **16**: 883-890, 1961.
- 51.- Mulieri LA, Luhr G, Trefry J, Alpert NR. Metal-filme thermopiles for use with rabbit right ventricular papillary muscles. **Am J Physiol** **233**: C146-C156, 1977.
- 52.- Mc Donald RH jr. Myocardial heat production: its relationship to tension development. **Am J Physiol** **220**: 894-900, 1971.
- 53.- Coulson RL, Rusy BF. A system for assessing mechanical performance, heat production and oxygen utilization of isolated perfused whole hearts. **Cardiovascular Res** **7**: 859-869, 1973.
- 54.- Theisohn M, Friedrich M, Justus P, Guttler K, Klaus W. Heat production and oxygen of the isolated rabbit heart: their relation to mechanical function. **Basic Res Cardiol** **72**: 19-33, 1977.
- 55.- Rusy BF, Coulson RL. Energy consumption in the isolated rabbit heart. **Anesthesiology** **39**: 428-434, 1973.

- 56.- Gibbs CL, Momaerts WFHM, Ricchiutti NV. Energetics of cardiac contractions. **J Physiol** **191**: 25-46, 1967.
- 57.- Ponce-Hornos JE, Bonazzola P, Taquini AC. The role of extracellular sodium on heart muscle energetics. **Pflugers Arch Eur J Physiol** **409**: 163-168, 1987.
- 58.- Gibbs CL, Chapman JB. Cardiac heat production. **Ann Rev Physiol** **41**: 507-519, 1979b.
- 59.- Gibbs CL. Thermodynamics and cardiac energetics. **Life Sciences** **62**: 549-576, 1983.
- 60.- Lochner W, Dudziak R. Sillstandumsatz und Ruheumsatz des Herzens. **Pflugers Arch** **285**: 169-177, 1965.
- 61.- Loiselle DS. Cardiac basal and activation metabolism. **Basic Res Cardiol** **82**: 37-50, 1987.
- 62.- Schreiber SS, Evans C, Oratz M, Rothchild M. The basal level of cardiac protein synthesis. **J Mol Cell Cardiol** **18 (Suppl 1)**: 26P, 1986.
- 63.- Fenn WO. The quantitative comparison between the energy liberated and the work performed by the isolated sartorius of the frog. **J Physiol London** **58**: 175-203, 1923.
- 64.- Fenn WO. The relation between work performed and the energy liberated in muscular contraction. **J Physiol London** **58**: 373-395, 1924.
- 65.- Hill AV. The heat of shortening and the dynamic constants of muscle. **Proc Roy Soc London Ser B** **126**: 136-195, 1938.
- 66.- Gibbs CL. Cardiac energetics and the Fenn effect. **Basic Res Cardiol** **82**: 61-68, 1987.
- 67.- Chapman JB, Gibbs CL, Gibson WR. Effects of calcium and sodium on cardiac contractility and production in rabbit papillary muscle. **Circ Res** **27**: 601-610, 1970.
- 68.- Rall JA. Effects of temperature on tension, tension-dependent heat and activation heat in twitches of frog skeletal muscle. **J Physiol** **291**: 265-275, 1979.
- 69.- Gibbs CL, Vaughan P. The effect of calcium depletion upon the tension independent component of cardiac heat production. **J Gen Physiol** **52**: 532-549, 1968.
- 70.- Alpert NR, Mulieri LA. Increased myothermal economy of isometric force generation in compensated cardiac hypertrophy induced by pulmonary artery constriction in the rabbit. **Circ Res** **50**: 491-500, 1982.

- 71.- Gibbs CL, Loiselle CL, Wendt IR. Activation heat in rabbit cardiac muscle. **J Physiol London 395**: 115-130, 1988.
- 72.- Loiselle DS, Gibbs CL. Species differences in cardiac energetics. **Am J Physiol 237**: H90-H98, 1979.
- 73.- Gibbs CL. Modification of the physiological determinants of cardiac energy expenditure by pharmacological agents. **J Pharmacol Ther 18**: 133-152, 1982.
- 74.- Allen DG, Kurihara S. The effects of muscle length on intracellular calcium transients in mammalian cardiac muscle. **J Physiol (London) 327**: 79-94, 1982
- 75.- Karin Przyklenk, Robert A. Kloner and Derek M. Yellon. **Ischemic Preconditioning: The concept of endogenous cardioprotection**. Kluwer Academic Publishers, Massachusetts, 1994.
- 76.- Kléber, AG. Extracellular potassium accumulation in acute myocardial ischemia. **J Mol Cell Cardiol 16**: 389-394, 1984.
- 77.- Langer G.A., Weiss J.N., Schelbert H.R. Cardiac ischemia. Part I - Metabolic and Physiologic responses. [Specialty Conference]. **West J Med 146**: 713-723, 1987.
- 78.- Flaherty J.T., Jacobus W.E. Myocardial ischemia: Regulation of myocardial oxygen supply and demand. **Regulation of Heart Function 327-331**, 1986
- 79.- Ferrari R., Cargnoni A., Bernocchi P., Pasini E., Curello S., Ceconi C., Ruigrok T.J.C. Metabolic adaptation during a sequence of no-flow and flow ischemia. A possible trigger for hibernation. **Circulation 94**: 2587-2596, 1996.
- 80.- Park Y., Bowles Dk, Kehrer J.P. Protection against hypoxic injury in isolated-perfused rat heart by ruthenium red. **J Pharmacol Exp Ther 253**: 628, 1990.
- 81.- Lawson C.S., Downey J.M. Ischaemic preconditioning: state of the art myocardial protection. **Cardiovasc Res 27**: 542-550, 1993.
- 82.- Reimer K.A., Murry Ch.E., Jennings R.B. Cardiac adaptation to ischemia. Ischemic preconditioning increases myocardial tolerance to subsequent ischemic episodes. **Circulation 82**: 2266-2268, 1990.
- 83.- Jennings R.B., Schaper J., Hill M.L., Steenbergen Jr. C., Reimer K.A. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. **Circ Res 56**: 262-278, 1985.
- 84.- Bountra C., Kaila K., Vaughan-Jones R.D. Effect of repetitive activity upon intracellular pH, sodium and contraction in sheep cardiac Purkinje fibers. **J Physiol Lond 398**: 341-360, 1988.

- 85.- Bergfeld I., Sunderdiek U., Krenz M., Schwanke U., Arnold G., Schipke J.D. The effect of different perfusion media on ventricular function of the isolated rabbit heart. (Abstract). **J Mol Cell Cardiol 25 (Suppl. I):** S16: II P 17, 1993.
- 86.- Vericat F., Grigera J.R. Theoretical single-ion activity of calcium and magnesium ions in aqueous electrolyte mixtures. **J Phys Chem 86:** 1030-1032, 1982.
- 87.- Chien K.R., Engler R. Calcium and ischemic myocardial injury. **Calcium and the heart** (Langer G.A.) 333-354, 1990.
- 88.- Katz A.M. The ischemic heart. **Physiology of the heart** (Katz A.M.) 609-637, 1992.
- 89.- Heyndrickx G., Millard R.W., McRitchie R.J., Maroko P.R., Vatner S.F. Regional myocardial function and electrophysiologic alterations after brief coronary artery occlusions in conscious dogs. **J Clin Invest 56:** 978-985, 1975.
- 90.- Braunwald E., Kloner R. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. **Circulation 66:** 1146-1149, 1982.
- 91.- Jennings R.B., Murry C.E., Steenbergen C.Jr, Reimer K.A. Development of cell injury in sustained acute ischemia. **Circulation 82:** (Suppl.2): II2-II12, 1990.
- 92.- Vander Heide R.S., Hill M.L., Reimer A., Jennings R.B. Effect of reversible ischemia on the activity of the mitochondrial ATPase: relationship to ischemic preconditioning. **J Mol Cell Cardiol 28:** 103-112, 1996.
- 93.- Rouslin W. Regulation of the mitochondrial ATPase in situ in cardiac muscle: Role of the inhibitor subunit. **J Bioenerg Biomembr 23:** 873-887, Mini-Review, 1991.
- 94.- Kolocassides K.G., Seymour A-M L., Galiñanes M., Hearse J. Paradoxical effect of ischemic preconditioning on ischemic contracture? NMR studies of energy metabolism and intracellular pH in the rat heart. **J Mol Cell Cardiol 28:** 1045-1057, 1996.
- 95.- Askenasy N., Vivi A., Tassini M., Navon G. The relation between cellular sodium, pH and volumes and the activity of Na/H antiport during hypothermic ischemia: Multinuclear NMR studies of rat hearts. **J Mol Cell Cardiol 28:** 589-601, 1996.
- 96.- Headrick J.P. Ischemic preconditioning: Bioenergetic and metabolic changes and the role of endogenous adenosine. **J Mol Cell Cardiol 28:** 1227-1240, 1996.
- 97.- Case, RB; Felix, A; Castellana, FS. Rate of rise of myocardial Pco₂ during early myocardial ischemia in the dog. **Circ. Res. 45:** 324-330, 1979.
- 98.- Williamson J.R. Glycolytic control mechanisms. II. Kinetics of intermediate changes during the aerobicanaerobic transition in perfused rat heart. **J Biol Chem 241:** 5026-36, 1966.

- 99.- Steenbergen C., Deleeuw G., Barlow C., Chance B., Williamson J.R. Heterogeneity of the hypoxic state in perfused rat heart. **Circ Res** **41**: 606-15, 1977.
- 100.- Neely, JR; Whitmer, JT; Rovetto, MJ. Effect of coronary blood flow on glycolytic flux and intracellular pH in isolated rat hearts. **Circ Res** **37**: 733-741, 1975.
- 101.- Zhou H.Z., Malhorta D., Shapiro J.I. Contractile dysfunction during metabolic acidosis: role of impaired metabolism. **Am J Physiol** **261**: H1481-H1486, 1991.
- 102.- Armiger L.C., Seelye R.N., Elswijk J.G., Carnell V.M., Gavin J.B., Heardson P.B. Fine structural changes in dog myocardium exposed to lowered pH in vivo. **Lab Invest** **37**: 237-242, 1977.
- 103.- Piwnica-Worms D., Jacob R., Horres C.R., Lieberman M. Na/H exchange in cultured chick heart cell. **J Gen Physiol** **85**: 43-64, 1985.
- 104.- Mahnensmith R.L., Aronson P.S. The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and pathophysiological processes. **Circ Res** **56**: 773-788, 1985.
- 105.- Lazdunski M., Frelin C., Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: Its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. **J Mol Cell Cardiol** **17**: 1029-1042, 1985.
- 106.- Regan T.J., Broisman L., Haider B., Eaddy C., Oldewurtel H.A. Dissociation of myocardial sodium and potassium alterations in mild versus severe ischemia. **Am J Physiol** **238**: H575-H580, 1980.
- 107.- Allen D.G., Lee J.A., Smith G.L. The consequences of simulated ischaemia on intracellular Ca^{2+} and tension in isolated ferret ventricular muscle. **J Physiol (Lond)** **410**: 297-323, 1989.
- 108.- Orchard C.H., Kentish J.C. Effects of changes of pH on the contractile function of cardiac muscle. **Am J Physiol** **258**: C967-C981, 1990.
- 109.- Mochizuki S., MacLeod K.T. The effects of hypoxia on cytosolic Ca^{2+} during low Na^+ exposure in isolated cardiac myocytes from guinea pig (Abstract). **J Physiol (Lond)** **446**: 334.
- 110.- Kawai M., Konishi M., Kurihara S. Magnesium and hydrogen ions Inhibit sarcoplasmic reticulum function in cardiac muscle. **J Mol Cell Cardiol** **28**: 1401-1413, 1996.
- 111.- Xu L., Mann G., Meissner G. Regulation of cardiac Ca^{2+} release channel (ryanodine receptor) by Ca^{2+} , H^+ , Mg^{2+} , and adenine nucleotides under normal and simulated ischemic conditions. **Circ Res** **79**: 1100-1109, 1996.

- 112.- Headrick J.P., Arminger L.C., Willis R.J. Behaviour of energy metabolites and effect of allopurinol in the "stunned" isovolumic rat heart. **J Mol Cell Cardiol** **22**: 1107-1161, 1990.
- 113.- Steenbergen C., Murphy E., Levy L., London R.E. Elevation in cytosolic free calcium concentration early in myocardial ischemia in perfused rat heart. **Circ Res** **60**: 700-7, 1987.
- 114.- Kusuoka H., Marban E. Cellular mechanism of myocardial stunning. **Annu Rev Physiol** **54**: 243-256, 1992.
- 115.- Rowe G.T. Manson N.H., Caplan M., Hess J.L. Hydrogen peroxide and hydroxyl radical mediation of activated leukocyte depression of cardiac sarcoplasmic reticulum. Participation of the cyclooxygenase pathway. **Circ Res** **53**: 584-591, 1983.
- 116.- Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. **Annu Rev Biochem** **56**: 395-433, 1987.
- 117.- Caroni P., Carafoli E. The Ca⁺⁺ pumping ATPase of heart sarcolemma. **J Biol Chem** **256**: 3263-3270, 1981.
- 118.- Kabbara A.A. Stephenson D.G. Effects of Mg²⁺ on Ca²⁺ handling by the sarcoplasmic reticulum in skinned skeletal and cardiac muscle fibres. **Pflügers Arch** **428**: 331-339, 1994.
- 119.- Tani M. Mechanisms of Ca²⁺ overload in reperfused ischemic myocardium. **Annu Rev Physiol** **52**: 543-559, 1990.
- 120.- Burton K.P., Hayler H.K., Templeton G.H., Willerson J.T., Buja C.M. Lanthanum probe studies of cellular pathophysiology induced by hypoxia in isolated cardiac muscle. **J Clin Invest** **60**: 1289-1302, 1977.
- 121.- Chien K.R., Abrams J., Serroni A., Martin J.T., Farber J.L. Accelerated phospholipid degradation and associated membrane dysfunction in irreversible, ischemic liver cell injury. **J Biol Chem** **253**: 4809-4817, 1978.
- 122.- Post J.A., Clague J.R., Langer G.A. Sarcolemmal phospholipid asymmetry and Ca fluxes on metabolic inhibition of neonatal rat heart cells. **Am J Physiol** **265**: H461-H468, 1993.
- 123.- Seigneuret M., Deveaux P.F. ATP dependent asymmetric distribution of spin labeled phospholipids in the erythrocyte membrane: relation to shape changes. **Proc Natl Acad Sci USA** **81**: 3751-3755, 1984.
- 124.- Schroit A.J., Zwaal R.F.A. Transbilayer movement of phospholipids in red cell and platelets membranes. **Biochim Biophys Acta** **1071**: 313-329, 1991.

- 125.- Steenbergen C., Hill M.L., Jennings R.B. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. **Circ Res** **60**: 478-486, 1987.
- 126.- Das D.K., Engelman R.M., Rousou J.A., Breyer R.H., Otani H., Lemeshow S. Role of membrane phospholipids in myocardial injury induced by ischemia and reperfusion. **Am J Physiol** **251**: H71-H79, 1986.
- 127.- Verkleij A.J., Post J.A. Physico-chemical properties and organization of lipids in membranes: its possible role in myocardial injury. **Basic Res Cardiol** **82:(Suppl.I)**: 85-92, 1987.
- 128.- Nayler W.G., Poole-Wilson P.A., Williams A. Hypoxia and calcium. **J Mol Cell Cardiol** **11**: 683-706, 1979.
- 129.- Tani M., Neely J.R. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of $\text{H}^+\text{-Na}^+$ and $\text{Na}^+\text{-Ca}^{2+}$ exchange. **Circ Res** **65**: 1045-1056, 1989.
- 130.- Watts J.A., Koch C.D., LaNoue K.F. Effect of Ca^{2+} antagonism on energy metabolism: Ca^{2+} and heart function after ischemia. **Am J Physiol** **238**: H909-H916, 1980.
- 131.- Crake T., Poole-Wilson P.A. Evidence that calcium influx on reoxygenation is not due to cell membrane disruption in the isolated rabbit heart. **J Mol Cell Cardiol** **18 (Suppl. IV)**: 31-36, 1986.
- 132.- Mast F., Elzinga G. Heat production and oxygen consumption following contraction of isolated rabbit papillary muscle at 20°C. **Cardiac Energetics** (Jacob, Just, Holubarsch) 85-92, 1987.
- 133.- Bonazzola P., Ponce-Hornos J.E., Márquez M.T. Caffeine effects on heart muscle energetics: species differences. **APPTLA** **42**: 155-170, 1992.
- 134.- Ponce-Hornos J.E., Bonazzola P., Marengo F.D., Consolini A.E., Márquez M.T. Tension-dependent and tension-independent energy components of heart contraction. **Pflügers Arch-Eur J Physiol** **429**: 841-851, 1995.
- 135.- O. Langendorff. **Arch Gesamte Physiol** **61**: 291, 1895.
- 136.- Documenta Geigy Scientific Tables, 6th Edition. Ardsley, NY, Konrad Diem Ed. Geigy Pharmaceuticals Division of Geigy Chemical Corporation, 1962.
- 137.- Levin, V.; Patlak, C.S. A compartmental analysis of Na kinetics in rat cerebrum, sciatic nerve and cerebrospinal fluid. **J. Physiol.** **224**: 559-581, 1972.
- 138.- Marban E., Koretsune Y., and Kusuoka H. Disruption of intracellular Ca^{2+} homeostasis in hearts reperfused after prolonged episodes of ischemia. **Annals of the New York Academy of Sciences** **723**: 38-50, 1994.

- 139.- Márquez M.T., Consolini A., Bonazzola P., Ponce-Hornos J.E.. The energetics of the quiescent heart muscle: high potassium cardioplegic solution and the influence of calcium and hypoxia on the rat heart. **Acta Physiol Scand** 1997 (en prensa).
- 140.- Ponce-Hornos JE, Taquini AC. Calcium effects on contractility and heat production in mammalian myocardium. **Am J Physiol** 251: H127-H132, 1986.
- 141.- Loiselle D.S. The rate of resting heat production of rat papillary muscle. **Pflug Arch** 405: 155-162, 1885a.
- 142.- Loiselle D.S., Gibbs C.L. Factors affecting the metabolism of resting rabbit papillary muscle. **Pflug Arch** 396: 285-291, 1983.
- 143.- Loiselle D.S. The effect of temperature on the basal metabolism of cardiac muscle. **Pflug Arch** 405: 163-169, 1985b.
- 144.- Bretschneider H.J., Hubner G., Knoll D., Lohr B., Nordbeck H., Spieckermann P.G. Myocardial resistance and tolerance to ischemia: physiological and biochemical basis. **J Cardiovasc Surg** 16: 241-260, 1975.
- 145.- Lochner W., Arnold G., Muller-Ruchholtz E.R. Metabolism of the artificially arrested heart and of the gas-perfused heart. **Am J Cardiol** 22: 299-311, 1978.
- 146.- Spieckermann PG, Piper HM. Oxygen demand of calcium - tolerant adult cardiac myocytes. En: Isolated adult cardiac myocytes. Editor: P. G. Spieckermann y H.M. Piper. **Steinkopff Verlag Darmstadt**, 1985.
- 147.- Steenbergen C, Deleeuw G, Rich T, Williamson JR. Effects of acidosis and ischemia on contractility and intracellular pH of rat heart. **Circ Res** 41: 849-858, 1977.
- 148.- Kusuoka H, Weisfeldt ML, Zweier JL, Jacobus WE, Marban E. Mechanism of early contractile failure during hypoxia in intact ferret evidence for modulation of maximal Ca^{2+} activated force by inorganic phosphate. **Circ Res** 59: 270-282, 1986.
- 149.- Arai AE, Pantely GA, Thoma WJ, Anselone CG, Bristow JD. Energy metabolism and contractile function after 15 beats of moderate myocardial ischemia. **Circ Res** 70: 1137-1145, 1992.
- 150.- Weiss JN, Lamp ST. Cardiac ATP-sensitive K^+ channels: Evidence for preferential regulation by glycolysis. **J Gen Physiol** 94: 911-936, 1989.
- 151.- Lederer WJ, Nichols CG, Smith GL. The mechanism of early contractile failure of isolated rat ventricular myocytes subjected to complete metabolic inhibition. **J Physiol (Lond)** 413: 329-349, 1989.
- 152.- Lee HC, Mohabir R, Smith N, Franz MR, and Clusin WT. Effect of ischemia on calcium-dependent fluorescence transients in rabbit hearts containing into 1: correlation with monophasic action potentials and contraction. **Circulation** 78: 1047-1059, 1988.

- 153.- Kihara Y, Grossman W, Morgan JP. Direct measurements of changes in intracellular calcium transients during hypoxia, ischemia, and reperfusion of the intact mammalian heart. **Circ Res** **65**: 1029-1044, 1989.
- 154.- Koretsune Y, Corretti MC, Kusuoka H, Marban E. Mechanism of early ischemic contractile failure. Inexcitability, metabolite accumulation, or vascular collapse? **Circ Res** **68**: 255-262, 1991.
- 155.- M Galiñanes, DJ Hearse and MJ Shattock. The role of the rate of vascular collapse in ischemia-induced acute contractile failure and decreased diastolic stiffness. **J Mol Cell Cardiol** **28**: 519-529, 1996.
- 156.- Kammermeier H, Schmidt P, Jüngling E. Free energy change of ATP-hydrolysis: a causal factor of early hypoxic failure of the myocardium? **J Mol and Cell Cardiol** **14**: 267-277, 1982.
- 157.- Bremel RD, Webwe A. Cooperation within actin filament in vertebrate skeletal muscle. **Nature New Biol** **238**: 97-101, 1972.
- 158.- Haworth RA, Nicolaus A, Goknur AB, Berkoff HA. Synchronous depletion of ATP in isolated adult rat heart cells. **J Mol Cell Cardiol** **20**: 837-847, 1988.
- 159.- Kingsley PB, Sako EY, Yang MQ, Zimmer SD, Ugurbil K, Foker JE, From AH. Ischemic contracture begins when anaerobic glycolysis stops: a ³¹P-NMR study of isolated rat hearts. **Am J Physiol** **261**: H469-H478, 1991.
- 160.- Bing OHL, Fishbein MB. Mechanical and structural correlates of contracture induced by metabolic blockade in cardiac muscle from the rat. **Circ. Res.** **45**: 298, 1979.
- 161.- Weiss JN, Lamp ST, Shine KI. Cellular K⁺ loss and anion efflux during myocardial ischemia and metabolic inhibition. **Am J Physiol** **256**: H1165-H1175, 1989.
- 162.- Weiss JN, Lamp ST. Glycolysis preferentially inhibits ATP-sensitive K⁺ channels in isolated cardiac myocytes. **Science Wash DC** **238**: 67-69, 1987.
- 163.- Weiss J, Hiltbrand B. Functional compartmentation of glycolytic versus oxidative metabolism in isolated rabbit heart. **J. Clin. Invest.** **75**: 436-447, 1985.
- 164.- Meissner A., Morgan J.P. Contractile dysfunction and abnormal Ca²⁺ modulation during postischemic reperfusion in rat heart. **Am J Physiol** **268**: H100-111, 1995.
- 165.- Neely JR, Morgan HE. Relationship between carbohydrate and lipid metabolism and the energy balance of heart muscle. **Annu Rev Physiol** **36**: 413-459, 1974.