

MAPFRE MEDICINA

—INSTITUTO DE MEDICINA CARDIOVASCULAR—

INVESTIGACIÓN CARDIOVASCULAR

PRÓLOGO.— Jesús M. Paylos

EFFECTOS DE LA DENERVACIÓN REGIONAL DEL MIOCARDIO SOBRE EL SUSTRATO ELECTROFISIOLÓGICO DEL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO.— Juan Cinca, Ana Carreño, Lluís Mont, J. Soler-Soler

LA PROPAFENONA BLOQUEA LA CORRIENTE RECTIFICADORA TARDÍA EN MIOCITOS VENTRICULARES AISLADOS DE COBAYA.— Eva Delpón, Carmen Valenzuela, Onésima Pérez, Juan Tamargo

EL INTERVALO S-A TOPOESTIMULADO: UNA NUEVA GUÍA CARTOGRÁFICA EN LA ABLACIÓN CON CATÉTER DE VÍAS ACCESORIAS AURICULOVENTRICULARES OCULTAS.— José Luis Merino Lloréns, Jesús Almendral Garrote, Rafael Peinado Peinado, Ángel Arenal Maiz, Julián Pérez Villacastín, Luis Tercedor Rodríguez, Juan Luis Delcán Domínguez

ANÁLISIS DEL COSTE-BENEFICIO DE LA ABLACIÓN POR RADIOFRECUENCIA DE LAS TAQUICARDIAS PAROXÍSTICAS SUPRAVENTRICULARES EN UN HOSPITAL UNIVERSITARIO DE BARCELONA.— Josep Brugada, Xavier Navarro, Mariona Matas, Francisco Navarro-López

EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA SÍNTESIS DE ISOPRENOIDES SOBRE EL CICLO CELULAR DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS.— José Martínez-González, Obadella Varela, Lina Badimon

ESTUDIO DE LOS EFFECTOS DE ELGODIPINO, UNA NUEVA DIHIDROPIRIDINA, SOBRE LA ATEROSCLEROSIS EXPERIMENTAL.— Marcela del Río, Emilio Ruíz, Rosa Lorente, Teresa Tejerina

PLAQUETAS, FIBRINÓGENO Y FIBRINA EN LA ARTERIOSCLEROSIS CORONARIA ACELERADA.— Teresa Royo Bargués, María Berrozque Martínez, Matilde Vidal Tramunt, Juan José Badimon Maestro, Lina Badimon Maestro



FUNDACION MAPFRE MEDICINA

MAPFRE MEDICINA

ÓRGANO DE EXPRESIÓN DE LA FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA

Editor: José Luis Cabello Flores
Director Ejecutivo: Ricardo Gutiérrez Fayos
Director Científico: Pedro Guillén García

Comité de Redacción:

Javier Alonso Santos
José M.^a Antón García
Ricardo Cámara Anguita
Antonio Carabias Aguilar
Javier Coba Sotés
Vicente Concejero López
Francisco de la Gala Sánchez
José M.^a Gálvez Failde
Pedro García Méndez

José Manuel Gómez López
Carlos Hernando de Larramendi
Carmen Hernando de Larramendi
José M.^a López Puerta
José M.^a Madrigal Royo
Mariano Malillos Pérez
Joaquín Martínez Ibáñez
Jesús Paylos González
Montserrat Valls Cabrero

Consejo Asesor:

Alfred O. Bonati (Florida)
César Borobia Fernández (Madrid)
René Cailliet (Santa Mónica)
Luis Conde-Salazar Gómez (Madrid)
Jacinto Corbella Corbella (Barcelona)
Diego Dámaso López (Madrid)
José Ramón de Juanes Pardo (Madrid)
Manuel de Oya Otero (Madrid)
Henry Dejour (Lyon)
Antonio del Río Prego (Madrid)
Andrew A. Fischer (Nueva York)
Alberto Gimeno Alava (Madrid)
José Luis López-Sendón (Madrid)
Fernando Martín Martín (Madrid)
María Pilar Martínez Gutiérrez (Madrid)
José Mendoza Sarmiento (Toledo)
José Luis Miranda Mayordomo (Madrid)
Louis Miró (Nimes)

Vicente Moya Pueyo (Madrid)
Roberto Pastrana Pérez-Canales (Madrid)
Lars Peterson (Gothenburg)
Juan Plaja Masip (Barcelona)
Raymond Roy-Camille (París)†
Luis Miguel Ruilope Urioste (Madrid)
Ulises Ruiz Ferrándiz (Madrid)
Carlos Sáenz de la Calzada y Campo (Madrid)
Julián Sanz Esponera (Madrid)
Salomón Schächter (Buenos Aires)
José María Segovia de Arana (Madrid)
Juan Tamargo Menéndez (Madrid)
Juan A. Traver Aguilar (Madrid)
Eliseo Vaño Carruana (Madrid)
José Delfín Villalaín Blanco (Valencia)
Enrique Villanueva (Granada)
George W. Wood (Memphis)
Pedro Zarco Gutiérrez (Madrid)

Secretaría de Redacción:
Carmen Amado Castela

Los originales o correspondencia deben ser enviados a la siguiente dirección:
FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA
Ctra. de Pozuelo a Majadahonda, s/n. MAJADAHONDA - 28220 MADRID
Tel.: (91) 626 57 04 - 626 55 00 - Télex: 48.125 MAPFR-E - Fax: 626 58 25 - 639 26 07

ISSN: 1133-5602

MAMEE6 8(Supl. III)1-68 (1997)



FUNDACION MAPFRE MEDICINA

Edita: EDITORIAL MAPFRE, S.A. - Paseo de Recoletos, 25 - 28004 MADRID
Imprime: GRÁFICAS MONTERREINA, S.A.
Fotocomposición: NUAN



FIPP
MIEMBRO DE LA FEDERACION
INTERNACIONAL DE LA
Prensa Periodica

Publicación trimestral (4 números al año). Textos originales, 1997. Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, sin la autorización por escrito de los titulares del Copyright. Fundación MAPFRE Medicina no se hace responsable del contenido de ningún artículo firmado por autores ajenos al staff editorial de la Revista. Únicamente, publica artículos que reflejan las opiniones individuales de los mismos.

Depósito Legal: M. 37.367-1990 - S.V.R.: 575





BECAS DE ESPECIALIZACIÓN 1997

OBJETIVO

Estas Becas se convocan con el propósito de facilitar un período de formación y especialización sobre temas relacionados con las áreas de actividad de la Fundación, brindando la posibilidad de intercambiar experiencias entre profesionales iberoamericanos y portugueses.

La dotación de estas Becas permiten financiar los gastos de desplazamiento y estancia, para el desarrollo de un programa de actividades formativas por parte de los becarios.

ÁREAS DE FORMACIÓN Y ESPECIALIZACIÓN

La Fundación MAPFRE MEDICINA ejerce su actividad en los siguientes campos:

- Formación Profesional de Personas con Discapacidad.
- Gestión Sanitaria.
- Medicina Cardiovascular.
- Medicina del Trabajo.
- Rehabilitación.
- Geriatria.
- Traumatología.

CONDICIONES PARA OPTAR A LAS BECAS

1. Ser ciudadano de cualquier país iberoamericano o de Portugal.
2. Aceptar las fechas de incorporación establecidas por la Fundación MAPFRE MEDICINA, así como los programas de trabajo y formación.
3. Poseer titulación universitaria.
4. Presentar un proyecto en el que se definan las materias o temas en que se desea recibir formación y especialización, que deberán estar relacionadas con las áreas de actividad de la Fundación.

CARACTERÍSTICAS DE LAS BECAS

1. La duración del período de formación será de cuatro semanas, durante el último trimestre del año.
2. En base a los acuerdos de colaboración firmados por la Fundación MAPFRE MEDICINA con otras instituciones del ámbito iberoamericano, la Fundación podrá establecer que las Becas se desarrollen en dichas instituciones.
3. La dotación económica de la Beca dependerá del lugar donde se desarrolle:
 - Becas en España: La dotación será de 400.000 ptas., netas, distribuidas en dos asignaciones.

— Becas en Iberoamérica: La dotación será de 300.000 ptas. netas.

En cualquiera de los casos, con la dotación económica de las Becas, los becarios deberán sufragarse los gastos de desplazamientos, estancia y manutención durante el período de la Beca.

4. La Fundación MAPFRE MEDICINA se hará cargo de las cuotas de inscripción en actividades docentes a las que asista el becario, siempre que hayan sido autorizadas previamente por la propia Fundación.
5. Cada becario estará cubierto por un seguro de enfermedad y accidente durante el período que dure la Beca.
6. La Beca está sujeta a las obligaciones tributarias que marca la Ley Española.

SOLICITUDES

La tramitación de solicitudes y la selección de candidatos se realizará según el siguiente protocolo:

1. Las solicitudes de Beca deben ser remitidas al domicilio social de la Fundación, en fecha anterior al día 10 de junio de 1997.
2. Se adjuntarán, **en el orden que se indica**, los siguientes documentos:
 - 2.1. Solicitud de Beca con todos los datos cumplimentados.
 - 2.2. Escrito en el que se especifiquen:
 - Nivel de conocimientos actuales.
 - Futura aplicabilidad de la formación que se pretende recibir.
 - Propuesta de las áreas y temas en los que se desee recibir formación y especialización.
 - 2.3. Curriculum Vitae, en no más de 10 folios.
 - 2.4. Certificación de estudios con calificaciones obtenidas.
 - 2.5. Copia del título universitario.
 - 2.6. En carpeta aparte se presentarán los demás documentos que se desee, hasta un total de 15.

La Fundación MAPFRE MEDICINA fallará la convocatoria evaluándose todas las solicitudes por medio de un Comité de Expertos en las diferentes áreas. En los casos necesarios, podrá solicitarse ampliación de la información a los candidatos. El fallo de la Convocatoria se comunicará a partir del día 7 de julio de 1997.

INFORMACIÓN

FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA
Ctra. Pozuelo a Majadahonda, km. 3,5
28220 MAJADAHONDA (Madrid) - España
Tels.: (34-1) 626 57 04 - 626 55 00
Fax: (34-1) 626 58 25 - 639 26 07

Prólogo

Este Número Monográfico de «Investigación Cardiovascular» recoge los trabajos realizados por los autores receptores de Becas y Ayudas de Investigación de la Fundación MAPFRE Medicina.

Es para nosotros orgullo y motivo de satisfacción comprobar el alto nivel científico de los trabajos realizados por los investigadores principales y sus grupos de trabajo, de reconocido prestigio nacional e internacional.

La Fundación MAPFRE Medicina y el Instituto de Medicina Cardiovascular expresan su satisfacción por los resultados obtenidos en esta nueva línea abierta de ayuda, promoción y potenciación de la investigación en España y concretamente en el área Cardiovascular, sintiéndonos muy motivados a continuar en la misma y potenciar su futuro bajo el estímulo constante de los propios investigadores, en beneficio de la comunidad científica y el conjunto de la sociedad.

Dr. Jesús M. Paylos
Director, Instituto MAPFRE
Medicina Cardiovascular



JORNADAS DE BIOÉTICA CLÍNICA ELEMENTAL

Sevilla, abril-mayo 1997

COLABORAN: Real e Ilustre Colegio de Médicos de Sevilla, Real Academia de Medicina de Sevilla
y Universidad de Sevilla. Departamento de Medicina

PROGRAMA

MÓDULO I

Viernes, 4 de abril

- 17,00 h.: Presentación de las Jornadas
- Lección teórica: *Ética del Sufrimiento en la enfermedad*
 - Lección teórica: *Ética de la Relación asistencial*
 - Debate
 - Seminario sobre *Legislación y Responsabilidad profesional*

Sábado, 5 de abril

- 9,30 h.: • Lección teórica: *Aspectos éticos referidos al diagnóstico y tratamiento (I y II)*
- Debate
 - Seminario: *Aspectos éticos del Tratamiento de la Hipertensión Arterial*
- 17,00 h.: • Lección teórica: *Análisis y Decisión en Ética Clínica: Fundamentos y metodología*
- Taller de Trabajo: *Análisis de dilemas éticos*
 - Valoración final del primer módulo

MÓDULO II

Viernes, 9 de mayo

- 17,00 h.: • Lección teórica: *Aspectos éticos de la asistencia al enfermo en situación terminal y de la muerte en Atención Primaria*
- Debate
 - Mesa redonda sobre la muerte y el enfermo en situación terminal
- Participan: Médicos de Atención Primaria, Hospitalización Domiciliar y Medicina Interna, Psicóloga y familiar de enfermo

Sábado, 10 de mayo

- 09,30 h.: Ética Clínica especial en Atención Primaria: exposiciones teóricas y debate sobre:
- Enfermos de SIDA
 - Salud Mental
 - Pediatría: El niño maltratado
 - Enfermos oncológicos
- 12,00 h.: Conferencia - Prof. D. Diego Gracia Guillén
- 17,00 h.: • Lección Teórica
- Taller de Trabajo
 - Valoración final

MÓDULO III

En colaboración con la Real Academia de Medicina y Cirugía de Sevilla. Días: 13, 14, 15, 20 y 21 de mayo (20:00 horas).

- **Día 13:** «Aspectos Éticos de la Ancianidad». Profesor D. Francesc Abel i Fabre
- **Día 14:** «Aspectos Éticos de la Asistencia Pediátrica». Profesor D. Antonio González Meneses (Académico de la RAM de Sevilla)
- **Día 15:** «Aspectos Éticos de la Información y la Comunicación». Profesor D. Pedro Sánchez Guijo (Catedrático de Medicina y Académico de la RAM de Sevilla)
- **Día 20:** «Aspectos Éticos de la Investigación Clínica». Profesor D. Francisco de Llanos Peña (Profesor de Bioética de la EU de Ciencias de la Salud)
- **Día 21:** «Aspectos Éticos de la Humanización de la Asistencia Sanitaria». Profesor D. José María Rubio Rubio (Profesor de Bioética de la Facultad de Medicina de Sevilla)

INFORMACIÓN

FUNDACIÓN DEL REAL E ILUSTRE COLEGIO DE MÉDICOS DE SEVILLA

Srta. Estrella

Avda. de la Borbolla, 47 - 1.ª Planta - 41013 Sevilla

Tels.: (95) 423 19 90 (de 9:00 a 14:30 horas)

Efectos de la denervación regional del miocardio sobre el sustrato electrofisiológico del preconditionamiento isquémico

Effects of regional myocardial denervation on the electrophysiological substrate of ischemic preconditioning

Laboratorio de Cardiología Experimental
Servicio de Cardiología
Hospital General Universitari Vall d'Hebrón
Barcelona

Juan Cinca
Ana Carreño
Lluís Mont
J. Soler-Soler

RESUMEN

Durante los primeros instantes de la reperusión coronaria existe una fase transitoria de recuperación supernormal (overshoot) del segmento TQ producida por una disminución del potasio extracelular que coincide temporalmente con la aparición de arritmias letales. La reducción del potasio extracelular podría ser causada por una actividad supranormal de la bomba de Na^+/K^+ secundaria al efecto de las catecolaminas locales.

Para probar esta hipótesis se estudió el patrón de recuperación del segmento TQ durante la reperusión coronaria después de cuatro oclusiones de 5 min de la arteria coronaria descendente anterior en 18 cerdos anestesiados con cloralfosa y ventilados mecánicamente. En la mitad de los casos se practicó una denervación de la región anteroseptal mediante interrupción de los nervios pericoronarios con fenol dos semanas antes del estudio. La otra mitad fueron controles. Durante el estudio se midió el flujo miocárdico, la presión aórtica y las alteraciones del segmento TQ y ST mediante mapeo epicárdico de 32 canales en el área isquémica. La denervación se comprobó por métodos histológicos de fluorescencia adrenérgica y reacción a la acetilcolinesterasa.

La magnitud del overshoot del segmento TQ fue similar en ambos grupos ($1,5 \pm 0,6$ mV en el grupo control y $1,5 \pm 0,6$ en el grupo denervado). Así pues, la fase de recuperación supernormal del segmento TQ durante la reperusión, que indica una reabsorción celular transitoria de potasio, no parece depender de la acción de las catecolaminas.

Palabras clave: Reperusión coronaria, oclusiones repetidas, mapeo epicárdico.

Cinca J, Carreño A, Mont L, Soler-Soler J
Efectos de la denervación regional del miocardio sobre el sustrato electrofisiológico del preconditionamiento isquémico
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 5-12

ABSTRACT

At the very beginning of coronary reperfusion, there is a transient phase of supranormal recovery (overshoot) of the TQ segment caused by a reduction in extracellular potassium which coincides in time with the appearance of lethal arrhythmias. Decreased extracellular potassium could be caused by a supranormal activity of the Na^+/K^+ pump secondary to the effect of local catecholamines.

To test this hypothesis, the recovery pattern of the TQ segment was studied during coronary reperfusion after four 5-minute occlusions of the anterior descending coronary artery in 18 pigs anesthetized with chloralose and ventilated mechanically. In half of the cases, denervation was performed in the anteroseptal region by blocking pericoronary nerves with phenol two weeks prior to the study. The other half were controls. During the study, myocardial flow, aortic pressure and changes in the TQ and ST segments were measured by a 32-channel epicardial mapping in the ischemic area. Denervation was checked by histologic methods of adrenergic fluorescence and reaction to acetylcholinesterase.

The magnitude of overshoot of the TQ segment was similar in both groups ($1,5 \pm 0,6$ mV in the control group and $1,5 \pm 0,6$ in the denervated group). Therefore, the supranormal recovery phase of the TQ segment during reperfusion, which suggests a transient cellular reabsorption of potassium, does not seem to depend on the action of catecholamines.

Key words: Repetitive coronary occlusion, coronary reperfusion, ECG mapping.

Cinca J, Carreño A, Mont L, Soler-Soler J
Effects of regional myocardial denervation on the electrophysiological substrate of ischemic preconditioning
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 5-12

Correspondencia:

Dr. Juan Cinca
Servicio de Cardiología
Hospital General Universitari Vall d'Hebrón
08035 Barcelona

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes han demostrado que el tamaño de un infarto es menor si el miocardio ha sufrido previamente uno o más episodios de isquemia breve (1). Así mismo, se ha descrito que los episodios repetidos de isquemia reducen la incidencia de arritmias de reperfusión coronaria (2-5). A esta situación de mayor tolerancia del corazón a la isquemia se la denomina preconditionamiento isquémico (1).

Los mecanismos causales del preconditionamiento isquémico no están bien definidos. Se ha relacionado el efecto protector del preconditionamiento con la posible liberación de sustancias cardioprotectoras endógenas como la prostaciclina PGI_2 ya que la administración de inhibidores de la ciclo oxigenasa atenúa el efecto antiarrítmico del preconditionamiento (5). Otros autores han observado que los corazones sometidos a preconditionamiento muestran un menor grado de acumulación de productos de degradación de nucleótidos de adenina en el interior del área isquémica (1) que, en condiciones de isquemia miocárdica, pueden ejercer un efecto arritmogénico (6). La estimulación de los receptores de adenosina-1 (A1) o la apertura de los canales de potasio sensibles a la ATP podrían ser las bases celulares de los efectos beneficiosos del preconditionamiento (7, 8).

El análisis de los efectos electrofisiológicos del preconditionamiento permitirían comprender mejor el mecanismo de la protección frente a las arritmias. En un modelo porcino de preconditionamiento hemos observado que éste conlleva una menor elevación del segmento ST durante la oclusión coronaria, una recuperación más homogénea del segmento TQ en el interior del área isquémica durante la reperfusión coronaria y un menor grado de hiperflujo coronario post reperfusión (9). La recuperación homogénea del segmento TQ en el miocardio preconditionado favorecería una menor incidencia de arritmias de reperfusión ya que la existencia de gradientes de potencial en el interior del área isquémica puede ser arritmogénica (10). Aunque desconocemos el mecanismo causal de los efectos anteriormente descritos, cabría la posibilidad de que los episodios isquémicos repetidos ocasionasen una depleción de catecolaminas en las terminaciones nerviosas intramiocárdicas. En favor de este argumento estarían nuestras observaciones en un modelo porcino de denervación miocárdica regional en el que las arritmias y las alteraciones del segmento ST durante la isquemia son menores que en los animales no denervados (11). Sin em-

bargo, la posibilidad de que parte del efecto antiarrítmico del preconditionamiento se deba a depleción local de catecolaminas no ha sido estudiada.

Así pues, este estudio pretende determinar si la depleción miocárdica de catecolaminas es en parte responsable de los efectos electrofisiológicos beneficiosos del preconditionamiento isquémico en un modelo porcino de denervación miocárdica regional. El corazón del cerdo se ha elegido porque al igual que el corazón humano, tiene una escasa circulación colateral (12, 13).

MÉTODOS

Preparación experimental

El estudio se realizó en 18 cerdos de 20-30 kg anestesiados con alfa cloralosa (100 mg/kg, e.v.) ventilados artificialmente con un respirador de presión Bird a una concentración de O_2 del 45%.

Todos los animales se sometieron a dos intervenciones quirúrgicas. La primera intervención consistió en una toracotomía lateral izquierda a nivel del 5° espacio intercostal y tuvo como objetivo el producir una denervación simpática de la cara anterior del ventrículo izquierdo mediante la destrucción de las fibras nerviosas pericoronarias por aplicación de fenol (14). En 9 de los 18 cerdos se disecó la arteria descendente anterior (DA) a su origen y se aplicó fenol (ácido carbólico al 88%) en esta región. En los restantes 9 cerdos se abrió el pericardio pero no se disecó ni se trató la arteria con fenol. El tórax se cerró por planos y se aspiró el aire de la cavidad pleural. Los animales se recuperaron de esta intervención y fueron tratados con antibióticos y analgésicos.

Al cabo de dos semanas se realizó el estudio propiamente dicho. Bajo anestesia general con alfa-cloralosa (100 mg/kg) y ventilación mecánica se abrió el esternón por la línea media y seguidamente el pericardio. Se pasó una sutura de Mersilene 5/0 alrededor de la DA en su tercio medio y los extremos de la sutura se pasaron por el interior de un tubo delgado de goma. Mediante la aplicación de un clamp en la parte proximal del tubo de goma se podía mantener ocluida la DA y posteriormente mediante la liberación del clamp se reperfundía aquella arteria (Figura 1).

Los gases arteriales se midieron a intervalos regulares y se corrigieron sus posibles desviaciones.

La presión arterial se monitorizó de forma continua mediante una cánula introducida por disección en la arteria femoral. Las pérdidas hemáticas fueron compensadas con infusión endovenosa de solución salina fisiológica.

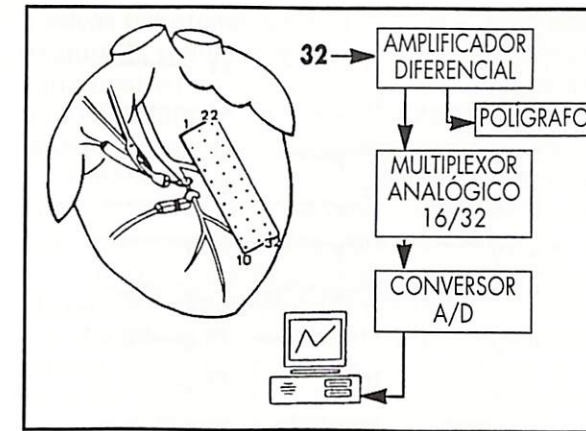


Figura 1. Esquema de la preparación experimental en la que se indica la posición de la malla de 32 electrodos así como el medidor de flujo coronario y el lugar del clamping de la arteria coronaria descendente anterior.

Mapeo epicárdico

En todos los casos se practicó mapeo de los electrogramas epicárdicos mediante un sistema de amplificación diferencial de 32 canales por corriente directa (DC), que ha sido desarrollado en nuestro laboratorio (14).

Los electrodos son de material no polarizable y en concreto, son tubos de polietileno de 0,5 mm de diámetro que contienen un hilo de algodón embebido en suero fisiológico para permitir la transmisión eléctrica. Los electrodos de algodón que están en contacto con el corazón se conectan a los amplificadores a través de una interfase de plata clorada. Los electrodos de polietileno se suturan a una membrana de goma a intervalos de 5 mm formando tres filas paralelas de 10, 11 y 11 electrodos (Figura 1). La membrana se sutura al epicardio con Prolene 5/0 siguiendo una alineación paralela a la del trayecto de la DA. De esta forma los electrodos situados distalmente estarán en contacto con el área isquémica, mientras que los electrodos proximales lo estarán con el miocardio normal circundante. El electrodo de referencia se coloca en la grasa mediastínica.

Los electrogramas se obtuvieron de forma simultánea y se guardaron en el disco duro de un ordenador previa digitalización a una frecuencia de 500 Hz por canal. Las muestras tienen una duración de 2 segundos y se toman cada minuto durante la oclusión coronaria y cada 5 segundos durante la reperfusión.

En cada electrograma se midieron los siguientes parámetros: 1) desplazamiento del segmento TQ (porción plana del intervalo PR) respecto al potencial 0 mV de referencia, 2) desplazamiento del segmento ST a 120-140 msec del inicio del

complejo QRS y 3) tiempo de activación local medido desde el inicio del complejo ventricular hasta la parte media de la deflexión intrínseca (14).

Las alteraciones del ritmo se analizaron en derivaciones del ECG convencional.

Precondicionamiento isquémico

Todos los animales fueron sometidos a cuatro episodios de isquemia-reperfusión coronaria separados entre sí por un intervalo libre de 20 minutos. La duración de la isquemia fue de 5 minutos y la de la reperfusión de 20 minutos. Ambas se indujeron mediante clamping y desclamping de la arteria DA por debajo de la primera rama diagonal.

Flujo arterial coronario

El flujo coronario fásico y medio se midió de forma continua durante todos los episodios de isquemia-reperfusión coronaria mediante un sistema electromagnético Nihon Kodhen modelo MFV 3200. El medidor de flujo tiene un calibre entre 2 y 2,5 mm y se coloca por disección alrededor de la DA por debajo del nivel de la ligadura (Figura 1). Se evitó que durante la implantación del medidor de flujo se originasen trastornos de la motilidad ventricular causados por obstrucción al flujo coronario.

Estudio neuroanatómico

La presencia de denervación en el grupo de cerdos tratados con fenol se comprobó mediante reacción de histofluorescencia adrenérgica inducida por el ácido glioxílico en biopsias de miocardio obtenidas al final del experimento. Las muestras de tejido miocárdico se tomaron en la región denervada anteroseptal y en el miocardio sano de la cara lateral del ventrículo izquierdo. El tejido denervado da una reacción de fluorescencia negativa.

Las biopsias se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Del tejido se obtuvieron secciones de 20-30 nm en un criotomo a temperatura de -20°C que se introdujeron en una solución de ácido glioxílico durante 15 seg. La solución contenía: 2 gr de ácido glioxílico Sigma, 5,4 gr de glucosa, 5,5 gr de fosfato sódico, 100 ml de agua destilada, e hidróxido sódico suficiente para llevar el pH a 7,4. Las preparaciones se incubaron a 80°C durante 190 segundos y se analizaron en un microscopio de fluorescencia Leitz con un filtro K 490.

Protocolo del estudio

Después de obtener registros basales de los electrogramas epicárdicos, flujo coronario, ECG convencional y presión aórtica, se practicaron las cuatro secuencias de isquemia-reperusión coronaria. El ECG convencional, presión aórtica y flujo coronario se registraron de forma continua durante todo el experimento. El mapeo epicárdico se obtuvo cada minuto durante la oclusión coronaria y cada 5 segundos durante la reperusión. En caso de presentarse arritmias ventriculares éstas no se trataron.

Análisis de los resultados

El desplazamiento del segmento TQ y ST se midió en todos los registros y se expresó como la media \pm 1 desviación estándar (DE). Como índice del grado de heterogeneidad del segmento TQ en el interior del área isquémica se tomó la desviación estándar del segmento TQ en los electrodos situados en contacto con el área isquémica. Se considera que un electrodo está en contacto con el área isquémica cuando el electrograma obtenido a este nivel muestra depresión del segmento TQ superior a 2 mV.

La activación local se midió en electrodos que muestren cambios isquémicos y se expresó como la media \pm 1 DE.

El flujo coronario y el desplazamiento del segmento TQ y ST se midieron en el mismo latido cardíaco. Durante la fase hiperémica de la reperusión coronaria se determinó el valor máximo del flujo coronario y se calculó el área de hiperemia por planimetría de la curva de flujo.

Las diferencias en los valores máximos del segmento TQ y ST, activación local, y flujo coronario entre la 1.^a y 4.^a oclusión-reperusión se valorarán aplicando el test de student para muestras apareadas. En nuestro estudio no se podrá aplicar el test de ANOVA para muestras repetidas porque la 1.^a secuencia de isquemia-reperusión influye en la 4.^a, y por tanto no son bloques independientes. Se considerará nivel de significación estadística una $p < 0,05$.

RESULTADOS

Alteraciones del segmento TQ

La isquemia miocárdica induce típicamente un desplazamiento negativo del segmento TQ y una elevación del segmento ST en los electrogramas locales de corriente directa (DC) (Figura 2). La depresión del segmento TQ aumenta en las su-

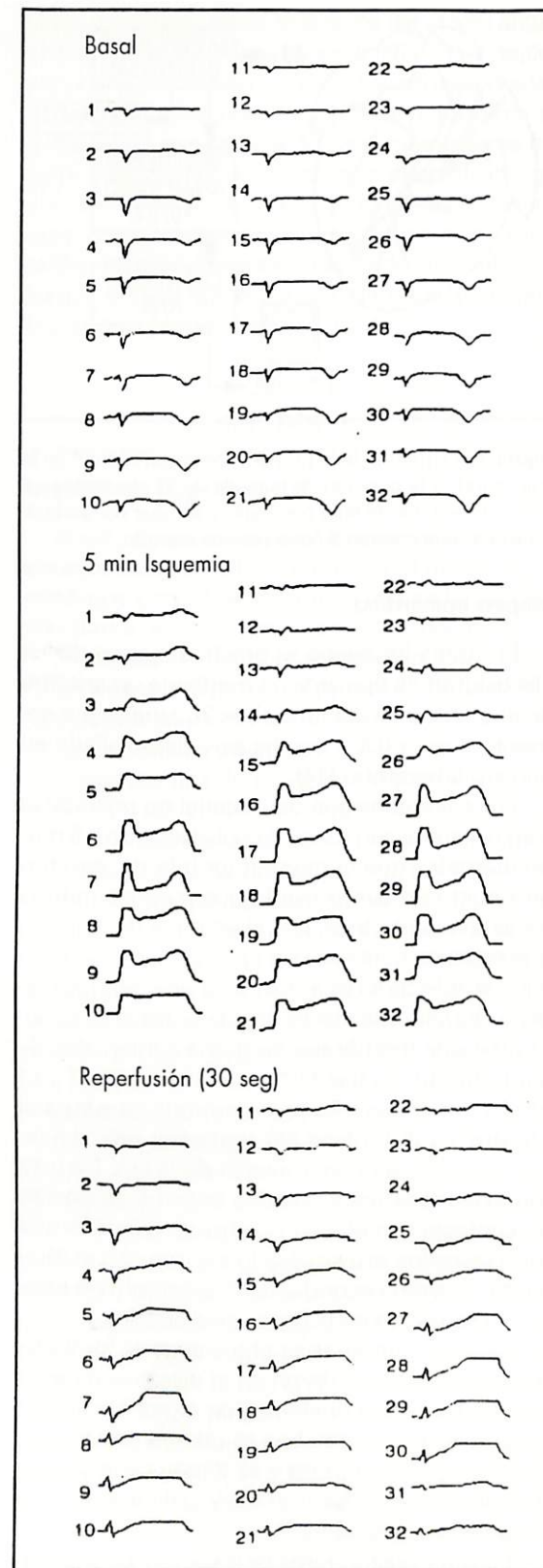


Figura 2. Representación por ordenador de los 32 electrogramas epicárdicos obtenidos en estado basal, a los cinco minutos de oclusión coronaria y a los 30 segundos de reperusión.

cesivas oclusiones coronarias breves y repetidas (Figura 3), siendo este aumento estadísticamente significativo en el grupo control. El grupo tratado con fenol muestra una tendencia similar, aunque no alcanza la significación estadística.

Durante la reperusión coronaria la depresión del segmento TQ se recupera rápidamente, pasando por una fase de ascenso transitorio por encima del potencial cero de referencia (overshoot) (Figura 3). La magnitud del «overshoot» es máxima durante la primera reperusión y es de grado similar en los dos grupos de cerdos (Figura 4). En el grupo control la magnitud del overshoot del segmento TQ en la cuarta reperusión fue menor que en la primera, sin embargo esta amortiguación no se observó en el grupo tratado con fenol (Figura 5). Durante la fase de overshoot la varia-

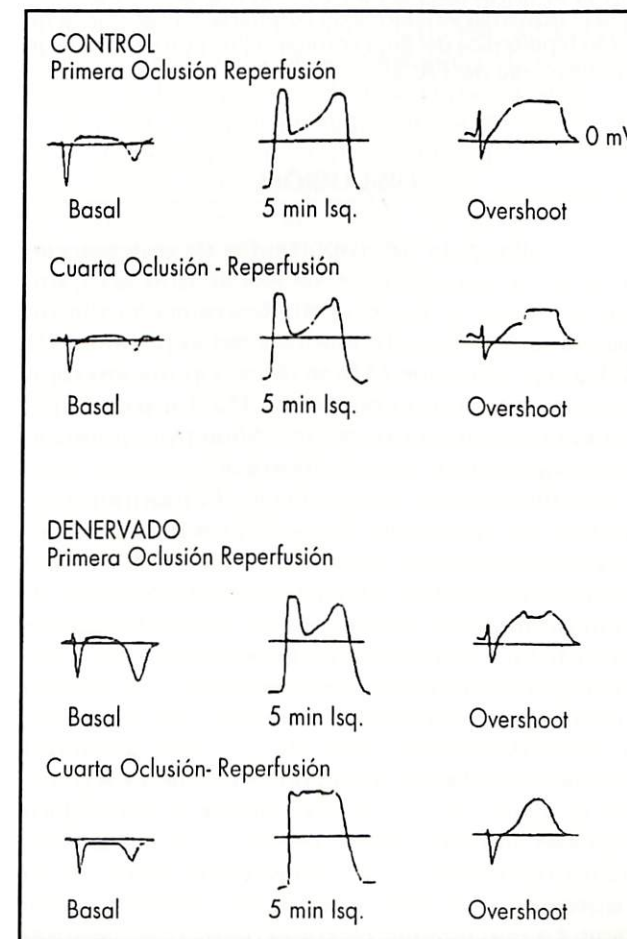


Figura 3. Ilustración de los cambios en un electrodo epicárdico situado en el interior del área isquémica-reperfundida en un caso del grupo control y en otro del grupo denervado. Obsérvese el ascenso por encima del potencial cero relativo (línea continua) del segmento TQ durante la reperusión (overshoot).

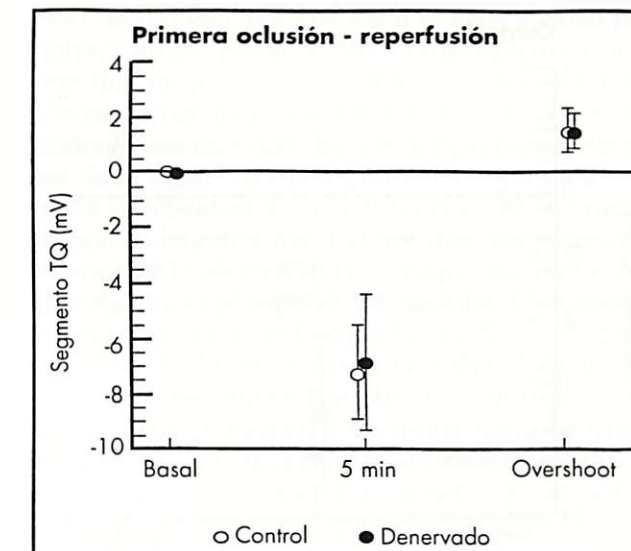


Figura 4. Representación gráfica de los valores medios y desviación estándar del desplazamiento del segmento TQ durante la isquemia (5 minutos) y durante la fase precoz de la reperusión (overshoot).

bilidad regional del TQ (desviación estándar de la media del conjunto de los electrodos de cada animal) aumenta más allá de la que se observa durante la isquemia ($2,2 \pm 0,5$ mV versus $3,6 \pm 0,7$ mV, $p < 0,05$). La recuperación de las alteraciones del segmento TQ es más rápida en la cuarta que en la primera oclusión (57 ± 28 seg versus 41 ± 13 seg, $p < 0,05$).

Alteraciones del segmento ST

La elevación del segmento ST durante los episodios de oclusión coronaria fue similar en los dos grupos de estudio ($2,0 \pm 0,9$ mV en el control y $1,8 \pm 2,0$ en el grupo fenol). Se observó una tendencia no significativa hacia una menor elevación del segmento ST tras las oclusiones coronarias repetidas.

Alteraciones del flujo coronario

Debido a la presencia de pericarditis residual a la primera intervención, existió dificultad técnica en disecar la arteria coronaria descendente anterior. En consecuencia, el flujo coronario sólo pudo ser medido en 10 de los 18 casos.

El flujo coronario basal en la DA media fue de $15 \pm 3,5$ ml/min en el grupo control y $13,3 \pm 3,9$ ml/min en el grupo tratado con fenol. Durante la reperusión coronaria se observa una respuesta hiperémica (Figura 6) que fue estadísticamen-

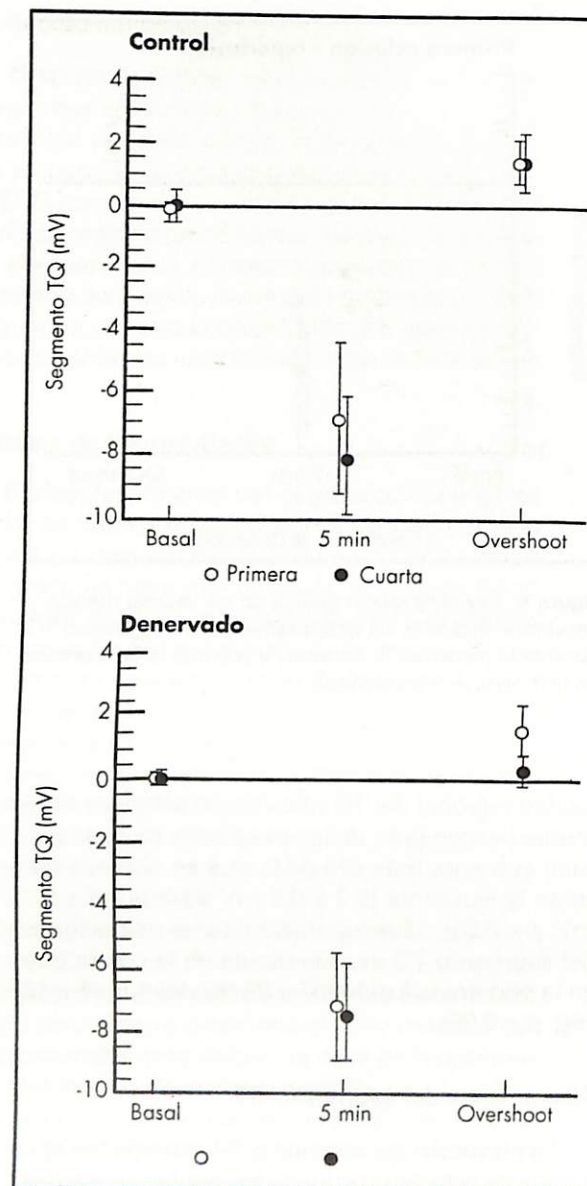


Figura 5. Comparación de la evolución de los valores del TQ durante la isquemia y reperusión en los animales del grupo control frente a los del grupo denervado.

te similar en ambos grupos ($203 \pm 78\%$ incremento respecto al flujo basal vs $240 \pm 108\%$).

Estudio neuro-anatómico

En todos los casos en que se aplicó fenol en la DA proximal se observó desaparición (denervación) de las fibras simpáticas y parasimpáticas tanto en el miocardio de la región anteroseptal como alrededor de la arteria coronaria DA. Por el contrario los cerdos del grupo control mostraron una abundante red de fibras simpáticas y parasimpáticas en aquellas regiones.

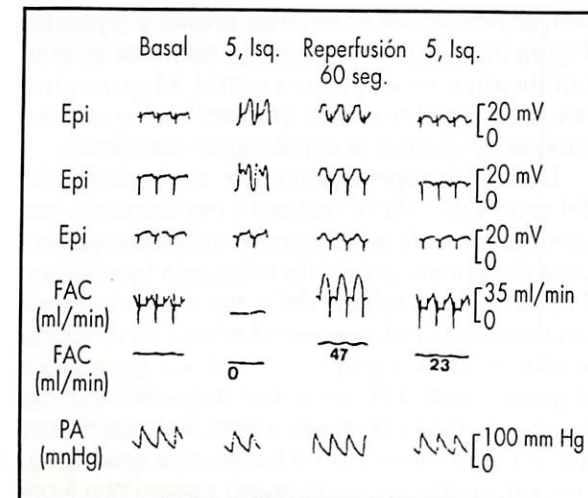


Figura 6. Registro de tres electrogramas epicárdicos (dos en el área isquémica y uno en la normal, flujo arterial coronario (FAC) fásico y medio y presión arterial aórtica durante la isquemia y reperusión coronaria. Obsérvese la reacción hiperémica del flujo coronario (los números indican el valor medio del FAC).

DISCUSIÓN

Los hallazgos más importantes de este estudio son por un lado, la observación de que la repetición de cuadros de isquemia breve acelera la recuperación de las alteraciones del segmento TQ y ST y por otro, que la fase de recuperación rápida (overshoot) del segmento TQ durante la reperusión coronaria no se modifica tras denervación simpática del área isquémica.

Las diferencias regionales en la magnitud de cambio del segmento TQ y ST, en este estudio representadas como la desviación estándar de los valores del conjunto de electrodos isquémicos, reflejan diferencias regionales en las propiedades electrofisiológicas del miocardio isquémico. Así, dado que la depresión del segmento TQ refleja la pérdida de potencial de reposo transmembrana (despolarización) (15, 16) y la elevación del segmento ST alteraciones en la amplitud y duración de dicho potencial concluimos que en el interior del área isquémica existen marcadas diferencias regionales en el potencial de reposo y en la duración y amplitud del potencial transmembrana. La variabilidad regional de dichos parámetros es debida a que las alteraciones electrolíticas y metabólicas que originan las alteraciones del segmento TQ y ST (acumulación extracelular de potasio y acidosis) tampoco se distribuyen uniformemente en el interior del área isquémica (9).

El impacto clínico de la heterogeneidad electrofisiológica del miocardio isquémico se basa en el hecho de que esta situación favorece la génesis de arritmias por mecanismo reentrante (10). Dado que nuestro estudio muestra que los episodios breves y repetidos de isquemia aceleran la recuperación de las alteraciones eléctricas y disminuyen su grado de heterogeneidad, se podría inferir que la isquemia repetida reduciría la incidencia de arritmias ventriculares.

En este modelo porcino hemos observado que durante la reperusión coronaria la recuperación de la depresión del segmento TQ y la de la elevación del segmento ST en el área isquémica sigue un patrón bifásico. Así, inmediatamente al restablecimiento de la perfusión coronaria existe una elevación transitoria del segmento TQ por encima del valor de potencial cero de referencia (overshoot) y también una reelevación del segmento ST. Al cabo de 2-5 minutos sigue una segunda fase durante la que ambos parámetros se recuperan íntegramente. La elevación u overshoot del segmento TQ refleja un estado de hiperpolarización de la membrana.

Durante los primeros instantes de la reperusión coronaria el aumento del grado de dispersión en los valores del segmento TQ (fase de overshoot del segmento TQ) indica que existen zonas del miocardio en fase de recuperación mientras que otras regiones todavía no se ha recuperado. Dicho de otro modo, existen zonas con elevación u overshoot del TQ que indican hiperpolarización, y zonas de depresión del TQ que reflejan despolarización. En esta situación se crean grandes gradientes de potencial eléctrico entre el área isquémica reperfundida y el miocardio sano circundante que originan las arritmias letales de la primera fase de la reperusión (10). En nuestro modelo no hemos podido estudiar las arritmias de reperusión porque éstas son prácticamente nulas cuando el período de isquemia que precede a la reperusión es tan corto como el utilizado en este estudio (5 minutos). Debemos señalar que elegimos este tiempo de isquemia ya que la presencia de arritmias de reperusión hubiera impedido una medición válida de las alteraciones precoces del segmento TQ.

Mediante registro simultáneo del potencial transmembrana y de la concentración extracelular de potasio con electrodos sensibles a este ión (17, 18) se ha demostrado que la acumulación extracelular de potasio en el miocardio isquémico es el que determina en mayor grado la magnitud del desplazamiento del segmento TQ. En efecto, en el corazón perfundido del cerdo hemos demostrado que la fase de overshoot del TQ corresponde a una disminución transitoria de la concentra-

ción de potasio extracelular a niveles incluso por debajo de los basales (19). El mecanismo por el que disminuye la concentración extracelular de potasio en el área reperfundida no se conoce. Se podría especular que durante los primeros instantes de la reperusión coronaria existe un aumento de la actividad de la bomba Na^+/K^+ gracias al cual se incrementaría el bombeo de potasio al interior de la célula con la consiguiente reducción de este ión en el espacio extracelular. El aumento de la actividad de la bomba Na^+/K^+ podría ser el resultado de un efecto de las catecolaminas locales (20), las cuales son liberadas durante la isquemia miocárdica (17). Sin embargo nuestro estudio indica que la depleción de catecolaminas en el miocardio isquémico-reperfundido no modifica la magnitud del overshoot del segmento TQ, que en definitiva refleja el grado de disminución de potasio extracelular.

Es interesante señalar que durante el período de tiempo en que aparece la fase de overshoot o recuperación supranormal del segmento TQ algunos autores han descrito, mediante espectroscopia infrarroja, la existencia de un estado de oxigenación miocárdica así mismo supranormal en el corazón canino (21).

En estudios previos (9) realizados en un modelo porcino de isquemia breve y repetida como el presente observamos que la reperusión coronaria después de un período de isquemia de 5 minutos provoca una reacción hiperémica en el flujo coronario que excede el doble del flujo basal. Esta reacción hiperémica del flujo coronario disminuye en duración y en intensidad después de realizar oclusiones coronarias breves y repetidas. La amortiguación de la respuesta hiperémica tras isquemias repetidas podría ser debida a una pérdida de la capacidad vasodilatadora de las arterias coronarias producida por la isquemia precedente. De hecho, el deterioro de la capacidad vasodilatadora de la arteria coronaria después de isquemia se ha comprobado en el modelo canino (22, 23) y porcino (24, 25) mediante el uso de vasodilatadores dependientes del endotelio (ADP y bradiquinina). La baja acumulación de nucleótidos de la adenina en el miocardio isquémico precondicionado (1) contribuiría a disminuir la capacidad vasodilatadora de la reperusión. Sin embargo debemos señalar que en el miocardio isquémico se acumulan sustancias que pueden favorecer la vasodilatación (H^+ , lactatos, CO_2 y potasio).

Agradecimientos

Este estudio se ha realizado con la ayuda de una beca de la Fundación MAPFRE Medicina.

BIBLIOGRAFÍA

- MURRY C E, RICHART V J, REIMER K A, JENNINGS R B. Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ Res.* 1990; 66: 913-931.
- HAGAR J M, HALE S L, KLONER R A. Effects of preconditioning ischemia on reperfusion arrhythmias after coronary artery occlusion and reperfusion in the rat. *Circ Res.* 1991; 68: 61-68.
- OSADA M, SATO T, KOMORI S, TAMURA K. Protective effect of preconditioning on reperfusion induced ventricular arrhythmias of isolated rat heart. *Cardiovasc Res.* 1991; 25: 441-444.
- SCHOTT R J, ROHMANN S, BRAUN E R, SCHAPER W. Ischemic preconditioning reduces infarct size in swine myocardium. *Circ Res.* 1990; 66: 1134-1142.
- VEGH A, SZEKERES L, PARRATT J R. Protective effects of preconditioning of the ischaemic myocardium involve cyclooxygenase products. *Cardiovasc Res.* 1990; 24: 1020-1023.
- PODZUWEIT T, ELS D J, MCCARTHY J. Cyclic AMP mediated arrhythmias induced in the ischaemic pig heart. *Basic Res Cardiol.* 1981; 76: 443-448.
- KIRSCH G E, CODINA J, BIRNBAUMER L, BROWN A M. Coupling of ATP-sensitive K⁺ channels to A1 receptors by G proteins in rat ventricular myocytes. *Am J Physiol.* 1990; 259: H280-H286.
- TAN H L, MAZÓN P, VERBERNE H J, SLEESWIJK M E, CORONEL R, OPTHOF T, JANSE M J. Ischaemic preconditioning delays ischaemia induced cellular electrical uncoupling in rabbit myocardium by activation of ATP sensitive potassium channels. *Cardiovasc Res.* 1993; 27: 644-651.
- CINCA J, WORNER F, CARREÑO A, CORONEL R, SOLDEVILLA A, PÉREZ-VILLA F, JANSE M J, SOLER-SOLER, J. TQ, ST segment mapping and hyperemia in reperfused pig heart with ischemic preconditioning. *Am J Physiol.* 1992; 32: H1732-H1738.
- KUO C S, MANAKATA K, PRATAP REDDY C, SURAWICZ B. Characteristics and possible mechanisms of ventricular arrhythmias dependent on the dispersion of action potential duration. *Circulation.* 1983; 67: 1356-1367.
- CINCA J, BARDAJÍ A, SALAS-CAUDEVILLA A. Ventricular arrhythmias and local electrograms after chronic regional denervation of the ischemic area in the pig heart. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 14: 225-232.
- SCHAPER W. The collateral circulation of the heart. Amsterdam, North Holland, 1971; 5-18.
- CINCA J, BARDAJÍ A, CARREÑO A, MONT L, BOSCH R, SOLDEVILLA A, TAPIAS A, SOLER-SOLER, J. ST segment elevation at the surface of a healed transmural myocardial infarction in pigs. Conditions for passive transmission from the ischemic periinfarction zone. *Circulation.* 1995; 91: 1552-1559.
- CINCA J, BARDAJÍ A, FIGUERAS J, SALAS-CAUDEVILLA A, SERRANO A, RIUS J. Effects of regional denervation on epicardial DC electrograms during coronary occlusion in pigs. *Am J Physiol.* 1987; 253: H138-H146.
- KLÉBER A G, JANSE M J, VAN CAPELLE F J L, DURRER D. Mechanism and time course of ST and TQ segment changes during acute regional myocardial ischemia in the pig heart determined by extracellular and intracellular recordings. *Circ Res.* 1978; 42: 603-613.
- CINCA J, JANSE M J, MORENA H, CANDELL J, VALLE V, DURRER D. Mechanism and time course of early electrical changes during acute coronary artery occlusion. An attempt to correlate the early ECG changes in man to the cellular electrophysiology in the pig. *Chest.* 1980; 77: 499-505.
- CORONEL R, FIOLET J W T, WILMS-SCHOPMAN F J G, SCHAAPHERDER A F M, JOHNSON T A, GETTES L S, JANSE M J. Distribution of extracellular potassium and its relation to electrophysiologic changes during acute myocardial ischemia in the isolated perfused porcine heart. *Circulation.* 1988; 77: 1125-1138.
- CORONEL R, WILMS-SCHOPMAN F J G, OPTHOF T, VAN CAPELLE F J L, JANSE M J. Injury current and gradients of diastolic stimulation threshold, TQ potential, and extracellular potassium concentration during acute regional ischemia in the isolated pig heart. *Circulation.* 1991; 68: 1241-1249.
- CORONEL F, WILMS-SCHOPMAN G J G, OPTHOF T, CINCA J, FIOLET J W T, JANSE M J. Reperfusion arrhythmias isolated perfused pig heart: inhomogeneities in extracellular potassium, ST and TQ potentials, and transmembrane action potentials. *Circ Res.* 1992; 71: 1131-1142.
- ELLINGSEN O, SEJERSTED O M, LERAAND S, ILEBEKK A. Catecholamine-induced myocardial potassium uptake mediated by beta-1 adrenoceptors and adenylate cyclase activation in the pig. *Circ Res.* 1987; 60: 540-550.
- PARSONS W J, REMBERT J C, BAUMAN R P, GREENFIELD J C Jr, PIANTADOSI C A. Dynamic mechanisms of cardiac oxygenation during brief ischemia and reperfusion. *Am J Physiol.* 1990; 259: H1477-H1485.
- METHA L, NICHOLS W W, DONNELLY W H, LAWSON D L, SALDEEN T G P. Impaired canine coronary vasodilator response to acetylcholine and bradykinin after occlusion-reperfusion. *Circ Res.* 1989; 64: 43-54.
- NICKLAS J M, GIPS S J. Decreased coronary flow reserve after transient myocardial ischemia in dogs. *J Am Coll Cardiol.* 1989; 13: 195-199.
- HEADRICK J P, ANGELLO D A, BERNE R M. Effects of brief coronary occlusion and reperfusion on porcine coronary artery reactivity. *Circulation.* 1990; 82: 2163-2169.
- KIRKEBØEN K A, AKSNES G, ILEBEKK A. Coronary reactivity in the porcine heart after short lasting myocardial ischaemia: effects of duration of ischaemia and myocardial stunning. *Cardiovasc Res.* 1990; 24: 998-1007.

La propafenona bloquea la corriente rectificadora tardía en miocitos ventriculares aislados de cobaya

Propafenone blocks the late rectifying current in ventricular myocytes isolated from guinea pigs

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid

Eva Delpón
Carmen Valenzuela
Onésima Pérez
Juan Tamargo

RESUMEN

Hemos analizado los efectos de la propafenona sobre la corriente rectificadora tardía (I_{K_r}) registrada en miocitos ventriculares aislados de cobaya utilizando la configuración del parche perforado con nistatina de la técnica del parche de membrana. En el cobaya la I_{K_r} presenta al menos dos componentes: uno que se activa rápidamente (I_{K_r}) y es sensible al La^{3+} y otro de activación lenta (I_{K_s}) y es insensible al La^{3+} . En ausencia de La^{3+} la propafenona inhibió la I_{K_r} de forma dosis-dependiente, siendo sus efectos más marcados tras pulsos despolarizantes débiles. La propafenona además desviaba en dirección despolarizante el punto medio de la curva de activación de la I_{K_r} . El bloqueo producido sobre la corriente de cierre ($I_{K_{tail}}$) registrada tras volver a -30 mV era más marcado ($P < 0,05$) tras pulsos despolarizantes cortos. Más aún, en presencia de $5 \mu\text{mol/L}$ de propafenona se satisfacía el test de la envoltura de las colas, permaneciendo el cociente $I_{K_{tail}}/I_{K_{max}}$ constante, independientemente de la duración del pulso despolarizante. En presencia de La^{3+} (cuando sólo existe la I_{K_s}), la propafenona no modificaba la curva de activación y la inhibición de la $I_{K_{tail}}$ era voltaje-independiente. La propafenona tampoco modificaba la fase final de la cinética de activación de la I_{K_s} , pero retrasaba el comienzo de la activación de la corriente. Estos resultados demuestran por vez primera que la propafenona inhibe los dos componentes de la I_{K_r} , pero es más potente para bloquear los canales K_r de la corriente rectificadora y que se une preferentemente al estado cerrado de los canales I_{K_s} .

Palabras clave: Propafenona, antiarrítmicos, miocitos ventriculares, I_{K_r} , I_{K_s} .

Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Tamargo J
La propafenona bloquea la corriente rectificadora tardía en miocitos ventriculares aislados de cobaya
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 13-23

Correspondencia:

Eva Delpón
Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
28040 Madrid

ABSTRACT

Propafenone effects on the late rectifying current (I_{K_r}) recorded in ventricular myocytes isolated from guinea pigs using the configuration of the perforated patch with nystatin of the membrane patch technique. In guinea pigs, I_{K_r} has at least two components: one which is rapidly activated (I_{K_r}) and sensitive to La^{3+} , and a slow activating component (I_{K_s}) insensitive to La^{3+} . In the absence of La^{3+} , propafenone inhibited I_{K_r} in a dose-dependent manner, its effects being more marked after weak depolarizing pulses. Propafenone also shifted in a depolarizing direction the middle point to the activation curve of I_{K_r} . The blockage caused on the closing current ($I_{K_{tail}}$) recorded after returning to -30 mV was more marked ($P < 0,05$) after short depolarizing pulses. Moreover, in the presence of $5 \mu\text{mol/L}$ of propafenone, the tail envelope test was met, the $I_{K_{tail}}/I_{K_{max}}$ ratio remaining constant regardless of the duration of the depolarizing pulse. In the presence of La^{3+} (when only I_{K_s} is present), propafenone did not change the activation curve and the inhibition of $I_{K_{tail}}$ was not voltage-dependent. Propafenone did not change either the final stage of the activation kinetics of I_{K_s} , but delayed the start of current activation. These results demonstrate for the first time that propafenone inhibits both components of I_{K_r} , but it is more potent to block K_r channels of the rectifying current, and is preferentially bound to the closed state of I_{K_s} channels.

Key words: Propafenone, antiarrhythmics, ventricular, myocytes, I_{K_r} , I_{K_s} .

Delpón E, Valenzuela C, Pérez O, Tamargo J
Propafenone blocks the late rectifying current in ventricular myocytes isolated from guinea pigs
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 13-23

Este trabajo ha sido receptor de una beca de investigación del Instituto de Medicina Cardiovascular de la Fundación MAPFRE Medicina.

INTRODUCCIÓN

La propafenona es un fármaco antiarrítmico del grupo I (1) ampliamente utilizado en la profilaxis y tratamiento de arritmias cardíacas (2, 3). Los estudios electrofisiológicos han demostrado que la propafenona inhibe de forma voltaje- y frecuencia-dependencia la velocidad máxima de despolarización de los potenciales de acción auriculares y ventriculares (4, 5) y desplaza la curva que relaciona este parámetro con el potencial de membrana hacia valores menos negativos (6, 7). La propafenona se une al estado activo del canal de Na^+ (8) y se asocia-disocia muy lentamente de su receptor, por lo que se ha incluido en el subgrupo Ic de los fármacos antiarrítmicos (1). El potente bloqueo del canal de Na^+ que produce explica la marcada depresión de la velocidad de conducción intracardíaca y la prolongación del complejo QRS (2, 3). Además, la propafenona bloquea los receptores β -adrenérgicos e inhibe la corriente de entrada de Ca^{2+} a través de los canales tipo L de la membrana cardíaca (9).

La duración del potencial de acción cardíaco (DPA) es la resultante de un complejo balance de diversas corrientes iónicas, unas de entrada (de Na^+ y de Ca^{2+}) y otras de salida de K^+ . Sería de esperar que la inhibición de la I_{Na} e I_{Ca} acortase la DPA, algo que sucede en fibras de Purkinje de oveja (6, 7). Sin embargo, la propafenona prolonga la DPA en las células sinoauriculares (10, 11), fibras musculares auriculares (5) y ventriculares (7) y en fibras de Purkinje de otras especies (11). Estudios clínicos han demostrado que la propafenona puede prolongar la refractoriedad ventricular, habiéndose descrito casos de síndrome de QT largo con torsades de pointes (2, 3). Aún cuando la prolongación de la refractoriedad más allá de la DPA puede explicarse por la prolongación de la reactivación del canal de Na^+ (1), la capacidad de la propafenona para prolongar la DPA puede también explicarse por sus efectos sobre las diversas corrientes de K^+ . Muy recientemente se ha demostrado que la propafenona bloquea tres corrientes de salida de K^+ (I_{K} , I_{K1} e I_{to}) en miocitos auriculares de conejo (12). Sin embargo, la presencia y la participación en la repolarización de los distintos canales de K^+ varían según el tejido cardíaco, la especie animal y la frecuencia de estimulación o la isquemia (13). La corriente de salida que presenta rectificación tardía (I_{K}) determina la DPA en diversas especies. Así, en miocitos de conejo, la I_{K} consta de un componente que se activa con despolarizaciones moderadas con un curso temporal rápido (14), mientras que en miocitos ventricula-

res de cobayo la I_{K} presenta un componente que se activa rápidamente ($I_{\text{K,r}}$) y otro que se activa lentamente ($I_{\text{K,s}}$) (15). En miocitos auriculares humanos se había descrito una corriente transitoria de salida (I_{to}) (16, 17), mientras que la I_{K} se suponía mínima o inexistente. Recientemente se ha demostrado que los miocitos auriculares humanos presentan tres corrientes distintas con rectificación retardada (18). Una de ellas es la corriente rectificadora de activación ultrarrápida (19). Además, las células auriculares humanas presentan una corriente de salida que se activa lentamente (20) y que según su amplitud y cinética es posible que participe en la fase 3 de repolarización más que la I_{to} (20) y parece estar compuesta de una corriente sensible al E-4031 ($I_{\text{K,r}}$) y un componente de activación lenta e insensible a E-4031 ($I_{\text{K,s}}$) (18). Ambos componentes muestran propiedades similares a las corrientes descritas por Sanguinetti y Jurkiewicz en miocitos ventriculares de cobayo (15).

En la actualidad desconocemos los efectos de la propafenona sobre el componente lento de la I_{K} . Por ello, y a fin de obtener mayor información acerca de los mecanismos por los que la propafenona bloquea estas corrientes de K^+ tiempo-dependientes, en este trabajo hemos analizado sus efectos sobre los componentes K_{r} y K_{s} de la I_{K} en miocitos ventriculares aislados de cobayo.

MATERIAL Y MÉTODOS

Aislamiento de miocitos cardíacos

Los miocitos ventriculares fueron aislados de ventrículos de cobayos (250-300 g) utilizando técnicas de disociación enzimática (21, 24). Los corazones se colocaron en un aparato de Langendorff y se perfundieron retrógradamente a través de la aorta a la velocidad de 10-15 ml/min con las siguientes soluciones: a) 1-2 minutos con solución de Tyrode modificada que contenía 1,8 mmol/L CaCl_2 oxigenada (95% O_2 -5% CO_2) y mantenida a 37 °C. b) Con solución de Tyrode sin Ca^{2+} durante 5 minutos; c) durante 4 minutos con la misma solución suplementada con collagenasa (0,12 mg/ml collagenasa, Sigma Ia) y proteasa (0,03 mg/ml. Sigma tipo XIV, Sigma Chemical Co.). d) Con solución KB (alto K^+ , bajo Cl^-) durante 4 minutos. A continuación los corazones fueron troceados en pequeños pedazos y colocados en solución KB, agitándose para facilitar la disociación de las células. La composición del Tyrode fue (mmol/L): NaCl 114, KCl 5,4 CaCl_2 1,8, MgCl_2 1,0, taurina 20,

glucosa 10, NaHCO_3 24 y NaH_2PO_4 0,42 (pH = 7,4 tras adicionar NaOH). La solución KB (alto K^+ , bajo Cl^-) contenía (mmol/L): ácido glutámico 70, taurina 10, KCl 20, KH_2PO_4 10, MgCl_2 1,0, ácido succínico 5,0, creatinina 5,7, dextrosa 10, EGTA-K 0,2 y HEPES-K 10 (pH = 7,4 con KOH).

Una pequeña suspensión de células se transfirió a una cámara (0,5 ml) colocada sobre la platina de un microscopio invertido (Nikon TMS) y perfundida a una velocidad de 1 ml/min. Para determinar la corriente de K^+ total, la solución externa contenía (mmol/L): NaCl 136, KCl 5,4, CaCl_2 1,0, MgCl_2 1,0, CoCl_2 2,0, tetrodotoxina 0,03, glucosa 10 y HEPES 10 (pH = 7,4 con NaOH). En estas condiciones la I_{Na} y la $I_{\text{Ca,L}}$ fueron bloqueadas, respectivamente, por tetrodotoxina y CoCl_2 . Cuando se analizaron los efectos de la propafenona sobre la $I_{\text{K,s}}$, las células se perfundieron con una solución que además contenía 30 $\mu\text{mol/L}$ de la Cl_3 para bloquear los canales K_{r} (25, 26). La composición de la solución de la pipeta era (mmol/L): aspartato-K 80, KCl 42, KH_2PO_4 10, ATP-Mg 5, fosfocreatinina 3, EGTA-K 5 y HEPES-K 5 (pH = 7,2 con KOH). Los potenciales de unión entre la pipeta y la solución externa eran de -9 mV y este potencial era suprimido antes de iniciar el experimento. Los experimentos se realizaron a temperatura ambiente (22-23 °C) en miocitos ventriculares (80-110 μm de longitud) identificados por su apariencia estriada y sin burbujas en su superficie externa.

Registro de corrientes iónicas cardíacas

Las corrientes de membrana se determinaron utilizando la configuración de parche perforado con nistatina de la técnica del parche de membrana (27) utilizando un amplificador Axopatch-1 D (Axon Instruments, Foster City, CA, USA). El método de la nistatina permitía permeabilizar los miocitos cardíacos y registrar la I_{K} sin modificar el medio intracelular (13, 21-23). En estas condiciones se evitaban el fenómeno de «rundown» característico de la I_{K} y, en particular, de la $I_{\text{K,s}}$ cuando se utiliza la configuración de célula entera, manteniéndose estable durante más de 60 minutos (23). Las micropipetas se construyeron utilizando tubos capilares de borosilicato (Narishige GD-1) mediante un estirador programable (Model P-87 Brown-Flaming, Sutter Instruments Co.). Cuando se llenaban de solución interna, la resistencia de las micropipetas era de 2-4 M Ω . Las resistencias en serie se compensaron en $\geq 80\%$ de forma manual utilizando la unidad de compensación correspondiente del amplificador Axopatch. La resistencia efectiva de acceso se calculó a partir del cociente τ_a/C_m co-

mo ha sido previamente descrito por Sala y cols. (28), siendo los valores promedio obtenidos de $12,1 \pm 0,6 \text{ M}\Omega$ ($n = 12$). Dado que se compensaba el 80% de las resistencias en serie y que las corrientes registradas eran inferiores a 1 nA ($642 \pm 42 \text{ pA}$), el promedio del error cometido tendría un valor inferior a 2,4 mV. Durante el experimento, el potencial de membrana y las corrientes iónicas se observaban en un osciloscopio (Kikusui modelo 5020A). Los pulsos se generaron por un convertidor digital-analógico de 12-bit. Las corrientes se filtraron a 1 kHz (-3dB) por un filtro Bassel de 4 polos antes de realizar un muestreo a 2 kHz utilizando un convertidor analógico-digital de 12-bit. Los protocolos de estimulación, la adquisición y análisis de los datos experimentales se realizó en un computador Tandon 386/25 utilizando los programas pClamp 5.5.1 (Axon Instruments, Foster City) y los diseñados por el Dr. D. Snyders de la Universidad de Vanderbilt (Nashville, USA).

Análisis de los datos experimentales

Los datos se presentan como media \pm e.s.m. Para comparar el bloqueo producido por distintos voltajes o concentraciones de propafenona, se utilizó el análisis de varianza de dos colas (29).

La curva de activación de la $I_{\text{K,s}}$ fue ajustada a una distribución de Boltzmann utilizando una rutina de mínimos cuadrados: $I_{\text{K}}/I_{\text{K,max}} = 1/(1 + \exp[(V_h - V_m)/k])$, donde V_h es el punto medio de activación (en mV), V_m es el potencial de prueba y k (en mV), V_m es el potencial de prueba y k (en mV) representa la pendiente de la curva de activación.

La cinética de activación de la $I_{\text{K,s}}$ se ha descrito como un proceso sigmoidal, asumiendo que el canal presenta múltiples estados cerrados (25). En nuestro estudio, para describir la constante de tiempo predominante y su modificación por la propafenona, se realizó un análisis exponencial ajustando la cinética de activación e inactivación a una ecuación del tipo:

$$y = A_1 \exp(-t/\tau_1 x) + A_2 \exp(-t/\tau_2 x) + A_3 \exp(-t/\tau_3 x) + C$$

donde τ_1 , τ_2 y τ_3 son las constantes de tiempo del sistema. A_1 , A_2 y A_3 son las amplitudes de cada componente de la exponencial y C es el valor basal. Para el ajuste de la curva utilizamos un algoritmo de mínimos cuadrados no lineal (Gauss-Newton).

El clorhidrato de propafenona (Knoll AG, Ludwigshafen, Alemania) se disolvió en agua destilada obteniendo una solución madre de 1 mmol/L; posteriores diluciones se realizaron en solución de Tyrode.

RESULTADOS

Efectos de la propafenona sobre la corriente total de K⁺

La Figura 1 muestra trazos de corrientes registrados durante un pulso despolarizante, tanto en situación control como en presencia de propafenona, 5 $\mu\text{mol/L}$. Los pulsos despolarizantes de 5 seg de duración fueron aplicados desde un potencial de fijación de -40 mV (para inactivar la I_{Na}) hasta $+30$ mV, seguido de una repolarización hasta -30 mV. En situación control, los pulsos despolarizantes producen una corriente de salida que aumenta lentamente, mientras que durante la repolarización a -30 mV se registra una corriente de cierre que representa la deactivación de la I_{K} ($I_{\text{K,tail}}$) (30). La corriente máxima activada durante la despolarización ($I_{\text{K,max}}$) se midió como la diferencia entre el nivel de corriente tras la caída del artefacto capacitivo y el nivel de corriente al final del pulso despolarizante. En ausencia de fármaco los valores de $I_{\text{K,max}}$ e $I_{\text{K,tail}}$ eran 312 ± 16 pA y 189 ± 10 pA, respectivamente ($n = 20$). La propafenona inhibía tanto la $I_{\text{K,max}}$ como la $I_{\text{K,tail}}$ de forma dosis-dependiente. Así, en presencia de propafenona (0,5, 1 y 5 $\mu\text{mol/L}$) la $I_{\text{K,max}}$ a $+30$ mV disminuye en un $15,9 \pm 5,3\%$ ($n = 6$), $29,6 \pm 12,2\%$ ($n = 8$) y $43,1 \pm 4,4\%$ ($n = 8$) y la $I_{\text{K,tail}}$ en un $20,3 \pm 2,4\%$ ($n = 6$), $31,3 \pm 2,4\%$ ($n = 8$) y $54,1 \pm 5,5\%$ ($n = 8$), respectivamente ($P < 0,05$ vs control a todas las dosis). El bloqueo de la I_{K} era revertido muy lentamente tras eliminar el fármaco de la perfusión.

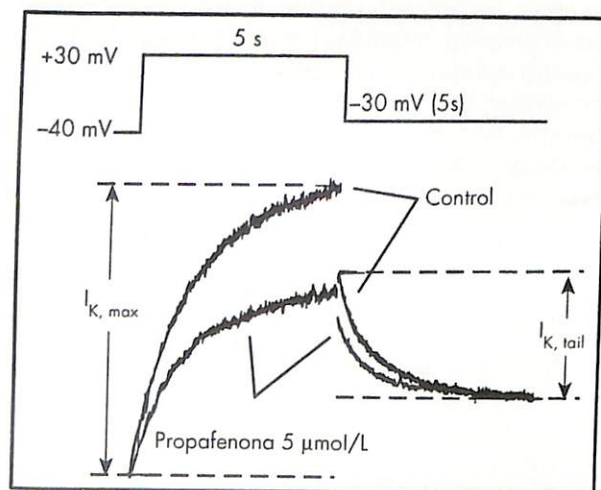


Figura 1. Efectos de la propafenona, 5 $\mu\text{mol/L}$, sobre las I_{K} . Las corrientes fueron obtenidas tras aplicar pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta $+30$ mV durante 5 seg. La línea punteada representa el nivel cero de corriente.

Efectos de la propafenona sobre la dependencia de voltaje de la I_{K}

La Figura 2 muestra los efectos de 5 $\mu\text{mol/L}$ de propafenona sobre la $I_{\text{K,max}}$ obtenida tras aplicar pulsos despolarizantes de 5 seg de duración desde un potencial de fijación de -40 mV. Los pulsos se aplicaban cada 30 seg y en pasos de 10 mV, desde -20 a $+70$ mV. En presencia de propafenona se observaba que tras la aplicación de pulsos a potenciales > -20 mV se reducía de forma significativa la $I_{\text{K,max}}$. El bloqueo era voltaje-dependiente, siendo menos marcado tras aplicar pulsos muy despolarizantes. En 6 células, el porcentaje de bloqueo de la $I_{\text{K,max}}$ tras aplicar pulsos a 0 mV y $+70$ mV era $52,4 \pm 4,6\%$ ($P < 0,05$) y $31,9 \pm 0,05$, respectivamente.

La dependencia de voltaje del bloqueo de la I_{K} fue analizado también midiendo la $I_{\text{K,tail}}$ obtenida al fijar el potencial de membrana a -30 mV tras aplicar pulsos despolarizantes entre -40 y $+70$ mV. La curva de activación se obtuvo normalizando la amplitud de la $I_{\text{K,tail}}$ a cada nivel de potencial de membrana frente al valor máximo. En ausencia de fármaco, la curva de activación en estado de equilibrio de la I_{K} tenía un voltaje medio (V_h) de $17,8 \pm 1,9$ mV y una pendiente (k) de $15,5 \pm 1,1$ mV ($n = 6$). En presencia de propafenona, 5 $\mu\text{mol/L}$, la amplitud de la $I_{\text{K,tail}}$ disminuía a todos los potenciales ensayados, pero su efecto era voltaje-dependiente, siendo menos pronunciado cuanto mayor era la despolarización. Así, en 6 células, la

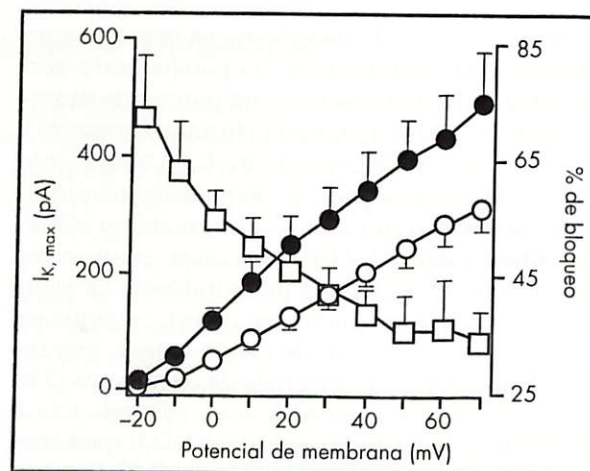


Figura 2. Corriente máxima de K⁺ ($I_{\text{K,max}}$) medida tras aplicar pulsos despolarizantes de 5 seg de duración, en ausencia (●) y en presencia de propafenona, 5 $\mu\text{mol/L}$ (○). El potencial de membrana se mantenía a -40 mV, aplicándose a intervalos de 30 seg pulsos despolarizantes entre -20 y $+70$ mV. Los cuadrados representan el porcentaje de bloqueo de la $I_{\text{K,max}}$ a cada nivel de potencial de membrana. Los valores representan la media \pm e.s.m. de 6 células.

propafenona reducía la $I_{\text{K,tail}}$ en un $64,1 \pm 5,7\%$ ($P < 0,05$) cuando el pulso despolarizante alcanzaba 0 mV y en un $48,1 \pm 4,6\%$ ($P < 0,05$) tras aplicar pulsos hasta $+70$ mV. Además, desviaba en dirección despolarizante el V_h de la curva de activación ($V_h = 21,8 \pm 1,0$ mV, $n = 6$, $P < 0,05$), pero no modificaba la pendiente ($k = 15,1 \pm 0,3$ mV, $n = 6$, $P > 0,05$).

Efectos de la propafenona sobre la cinética de activación de la I_{K}

Para analizar la relación entre el bloqueo inducido por la propafenona y la duración del pulso despolarizante, analizamos los efectos del fármaco utilizando el test de la envoltura de las corrientes de cierre. El potencial de membrana se fijó a -40 mV y se generaron a intervalos de 30 seg pulsos despolarizantes de duración progresivamente creciente desde 0,1 hasta 10 seg hasta $+30$ mV. La Figura 3 muestra corrientes obtenidas tras aplicar pulsos de 0,1, 0,4, 0,7, 1,2 y 4 seg en ausencia y en presencia de 5 $\mu\text{mol/L}$ de propafenona. La propafenona bloqueaba la $I_{\text{K,tail}}$, pero su efecto era más marcado con pulsos cortos que con pulsos largos. Así, la amplitud de la $I_{\text{K,tail}}$ se reducía en un 52% tras un pulso despolarizante de 0,4 seg y sólo en un 31% tras un pulso de 4 seg. Resultados similares fueron obtenidos en 6 células (Tabla I).

La cinética de activación se puede analizar considerando la amplitud de las corrientes de cierre con respecto a la duración del pulso despolarizante (Figura 4A). En situación control la cinética de activación se ajustó mejor a una función biexponencial y las constantes de tiempo (τ) de los componentes rápido y lento resultó ser de $0,5 \pm 0,1$ s ($\tau_{\text{rápida}}$) y $5,2 \pm 1,0$ s (τ_{lenta}), respectivamente. Sin embargo, en presencia de 5 $\mu\text{mol/L}$, los datos experimentales se ajustaban mejor a una función monoexponencial cuya constante de tiempo era de $2,1 \pm 0,3$ s.

Prueba de la envoltura de las corrientes de cierre

El test de la envoltura de las corrientes de cierre predice que si la I_{K} representa la activación de un solo canal, la magnitud de la $I_{\text{K,tail}}$ tras aplicar un pulso despolarizante de duración variable, debería aumentar de forma paralela a la corriente de salida durante dicho pulso (15). Si existe sólo un canal, el cociente entre la corriente de cierre y la corriente tiempo-dependiente ($\Delta I_{\text{K,tail}}/\Delta I_{\text{K,max}}$) debería ser constante, independientemente de la du-

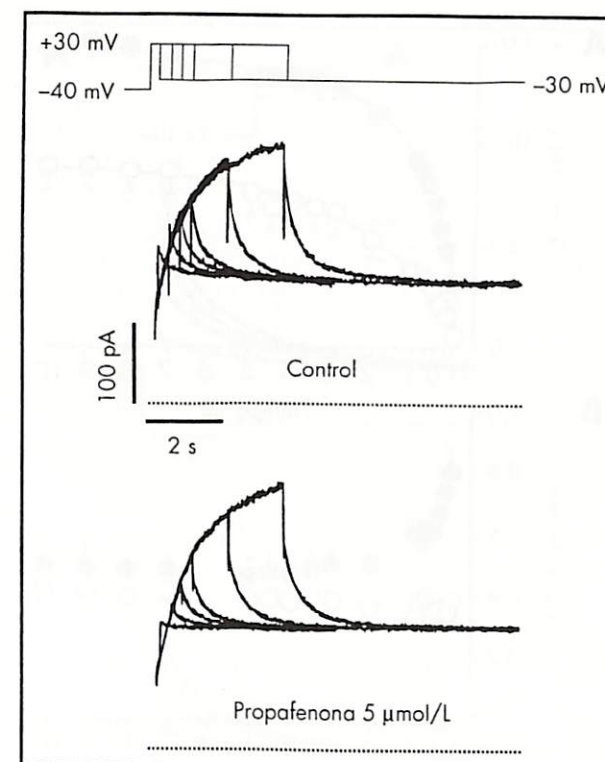


Figura 3. Test de la envoltura de la corriente de cierre para la corriente rectificadora tardía (I_{K}) en presencia y en ausencia de propafenona, 5 $\mu\text{mol/L}$. El potencial de membrana se fijó a -40 mV y a intervalos de 30 seg se aplicaron pulsos a $+30$ mV de duración variable (0,1, 0,4, 0,7, 1, 2 y 4 seg). La línea rayada representa el nivel cero de corriente.

Tabla I. Porcentaje de bloqueo de la I_{K} e $I_{\text{K,s}}$ producida por la propafenona (5 $\mu\text{mol/L}$) sobre las corrientes de cierre, registradas tras regresar el potencial de membrana a -30 mV, tras aplicar pulsos de 0,4 y 10 seg de duración desde -40 mV a $+30$ mV

	0,4 seg	4,0 seg	10 seg
No La^{3+}	$63,4 \pm 5,8$	$41,5 \pm 7,1$	$38,6 \pm 6,9^*$
30 $\mu\text{mol/L}$			
La^{3+}	$43,3 \pm 5,2$	$35,1 \pm 3,3$	$38,3 \pm 2,8$

Los valores representan la media \pm e.s.m. * $P < 0,05$ comparado con el porcentaje de bloqueo tras un pulso de 0,4 seg.

ración del pulso. Los resultados se muestran en la Figura 4B. Se aplicaron pulsos entre -40 mV hasta $+30$ mV con duraciones variables, desde 0,1 seg hasta 10 seg. En células perfundidas en una solución que contenía CO_2^{2+} , el cociente $\Delta I_{\text{K,tail}}/\Delta I_{\text{K,max}}$ dependía de la duración del pulso. Tras aplicar pulsos despolarizantes cortos (< 1 s), la activación de la I_{K} se caracterizaba porque la amplitud de las co-

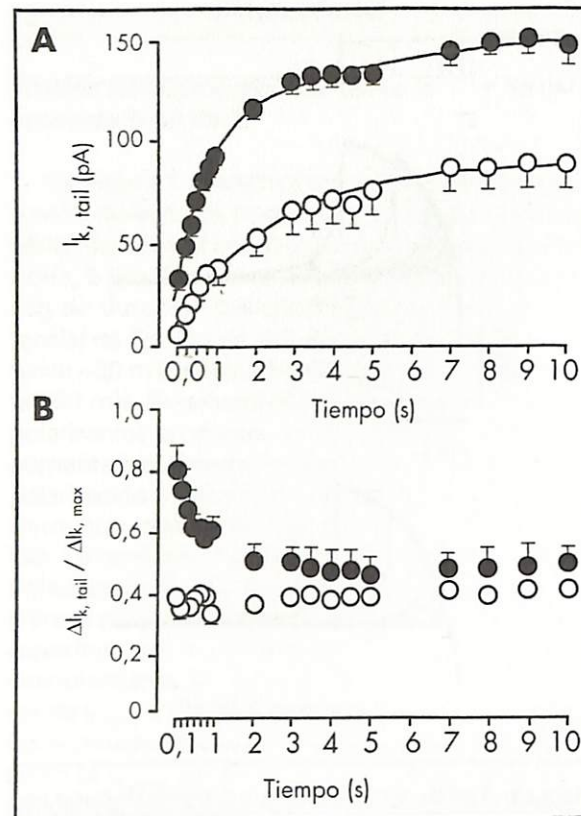


Figura 4. Panel A: la amplitud de $I_{K,tail}$ se graficó frente a la duración del pulso en ausencia (●) y en presencia (○) de propafenona. Los valores representan la media \pm e.s.m. de 6 células. Panel B: Test de la envoltura de la corriente de cierre expresado como el cociente entre las corrientes de cierre y las corrientes tiempo-dependientes ($\Delta I_{K,tail}/\Delta I_{K,max}$) en función de la duración del pulso en ausencia (●) y en presencia propafenona (○) 5 μ mol/L. Los valores representan la media \pm e.s.m. de 12 células.

rientes de cierre era similar a la de las corrientes tiempo-dependientes, pero según aumentaba la duración del pulso, la magnitud de la $\Delta I_{K,tail}$ era menor que la de la $\Delta I_{K,max}$, por lo que para pulsos > 1 seg, el cociente $\Delta I_{K,tail}/\Delta I_{K,max}$ era de $0,52 \pm 0,05$ ($n = 6$). Estos resultados confirman hallazgos previos que demuestran la existencia de dos componentes distintos en la I_K en miocitos ventriculares de cobaya (15, 23, 25), uno que se activa rápidamente ($I_{K,r}$) y otro que se activa de forma lenta ($I_{K,s}$). Los datos obtenidos en 12 células se muestran en la Figura 4B, donde el cociente $\Delta I_{K,tail}/\Delta I_{K,max}$ se graficó en función de la duración del pulso de prueba. En presencia de 5 μ mol/L, la propafenona bloqueaba la $I_{K,r}$ y la corriente que persistía sólo estaba compuesta de un tipo único de canal, el $I_{K,s}$, de tal forma que el cociente $\Delta I_{K,tail}/\Delta I_{K,max}$ permanecía constante ($0,44 \pm 0,003$) independientemente de cuál fuera la duración del pulso despolarizante. Este valor es muy cercano

al predico (0,48) del cociente de la fuerza conductora a +30 mV y a -30 mV para una corriente de salida no rectificadora selectiva para el K^+ (30). Este hallazgo sugiere que la propafenona bloquea de forma dosis-dependiente el componente rápido de la I_K .

Efectos de la propafenona sobre la $I_{K,s}$

Para determinar si la propafenona inhibe la $I_{K,s}$, determinamos sus efectos en células perfundidas con una solución externa que contenía 30 μ mol/L de La^{3+} , un bloqueante de la $I_{K,r}$ (26). Las corrientes de salida se generaron tras aplicar pulsos despolarizantes (de 5 seg de duración cada 60 seg) desde un potencial de fijación de -40 mV, seguido por una repolarización durante 5 seg hasta -30 mV. La Figura 5 muestra las corrientes en ausencia y en presencia de propafenona, 5 μ mol/L. La propafenona disminuía la $I_{K,s,max}$ desde 285 hasta 203 pA y en 6 células expuestas a 5 μ mol/L, la inhibición de la $I_{K,s,max}$ alcanzó un $28,5 \pm 2,2\%$ ($P < 0,05$). A 10 μ mol/L, la propafenona disminuía la $I_{K,s,max}$ en un $37,5 \pm 6,1\%$ ($P < 0,05$, $n = 6$).

Efectos sobre la dependencia de voltaje de la $I_{K,s}$

Para analizar la dependencia de voltaje del bloqueo de la $I_{K,s}$, las células se perfundieron con 30 μ mol/L de La^{3+} y se aplicó el protocolo experimental utilizado para analizar la corriente de K^+ total en ausencia de La^{3+} . La Figura 6A muestra re-

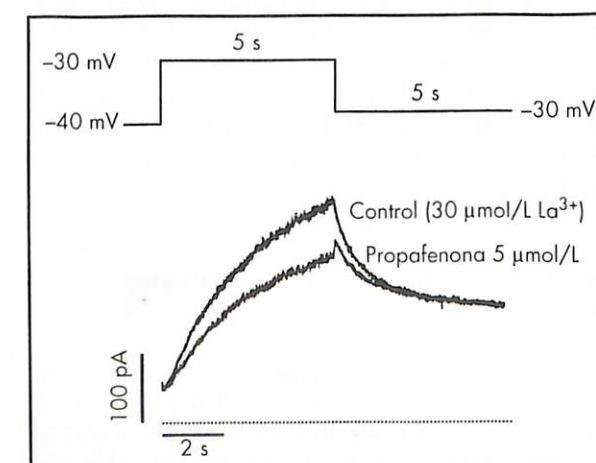


Figura 5. Corriente registrada en ausencia y presencia de propafenona, 5 μ mol/L. El potencial de membrana se fijó a -40 mV y se aplicaron pulsos despolarizantes de 5 seg hasta +30 mV. La línea punteada representa un nivel cero de corriente.

gistros obtenidos al repolarizar a -30 mV tras aplicar pulsos despolarizantes de 5 seg desde -40 hasta +10, +30, +50 y +70 mV, en ausencia y en presencia de 5 μ mol/L de propafenona. Puede observarse que el fármaco reduce la $I_{K,tail}$ a todos los pulsos analizados. Así, la amplitud de la $I_{K,tail}$ tras aplicar un pulso desde -40 mV hasta +30 mV era de $148,8 \pm 22,3$ pA en situación control ($n = 15$), reduciéndose en un $33,9 \pm 1,3\%$ y $47,0 \pm 3,2\%$, respectivamente, en presencia de 5 y 10 μ mol/L de propafenona. La Figura 6B muestra la curva de activación de la $I_{K,s}$. En situación control el punto medio de activación (V_h) era de $29,1 \pm 2,3$ mV y el valor de k de $16,0 \pm 2,1$ mV ($n = 7$). En 6 células, la propafenona (5 μ mol/L) no modificó el V_h ($30,0 \pm 2,2$ mV, $P > 0,05$) o el valor de k ($16,0 \pm 0,4$ mV, $P > 0,05$). En otras 6 células, la propafenona (10 μ mol/L) no modificó el V_h ($36,8 \pm 0,8$ vs. $36,4 \pm 1,0$ mV) o el valor de k ($16,7 \pm 1,0$ vs. $16,7 \pm 0,3$ mV) de la curva de activación. Los cuadrados representan el porcentaje de $I_{K,tail}$ bloqueado por 5 μ mol/L de propafenona a cada nivel de potencial de membrana. Puede verse que no hay diferencias en el grado de bloqueo a los distintos potenciales analizados, así que aparentemente, el bloqueo de la $I_{K,tail}$ era independiente del voltaje del pulso despolarizante.

Efectos de la propafenona sobre la cinética de activación de la $I_{K,s}$

Los efectos de la propafenona, 5 μ mol/L, sobre la cinética de activación de la $I_{K,s}$ fue estudiada en 8 células perfundidas con una solución que contenía 30 μ mol/L de La^{3+} . La Figura 7A muestra la amplitud de las colas a -30 mV tras aplicar pulsos despolarizantes desde -40 mV hasta +30 mV de duración creciente (0,1-10 s) cada 30 seg en presencia y en ausencia de propafenona. En estas condiciones, la cinética de activación se ajustaba a una función monoexponencial. La constante de tiempo de activación fue de $3,3 \pm 0,2$ seg en ausencia de fármaco y de $3,2 \pm 0,3$ s en presencia de éste, lo que indicaba que la propafenona no modificaba la cinética de activación de la $I_{K,s}$. Sin embargo, la propafenona retrasaba el comienzo de la activación en $100,2 \pm 19,6$ mseg, medido por la intersección del ajuste con el eje de abscisas, lo que sugería que ya existía un cierto grado de bloqueo de la $I_{K,s}$ antes de que el canal se abriera. La Figura 7B muestra las amplitudes de las colas en escala ampliada en uno de los 8 experimentos realizados en presencia de 5 μ mol/L de propafenona. A 10 μ mol/L, la propafenona retrasaba el comienzo de la activación en $110,9 \pm 28,9$ ms, pero

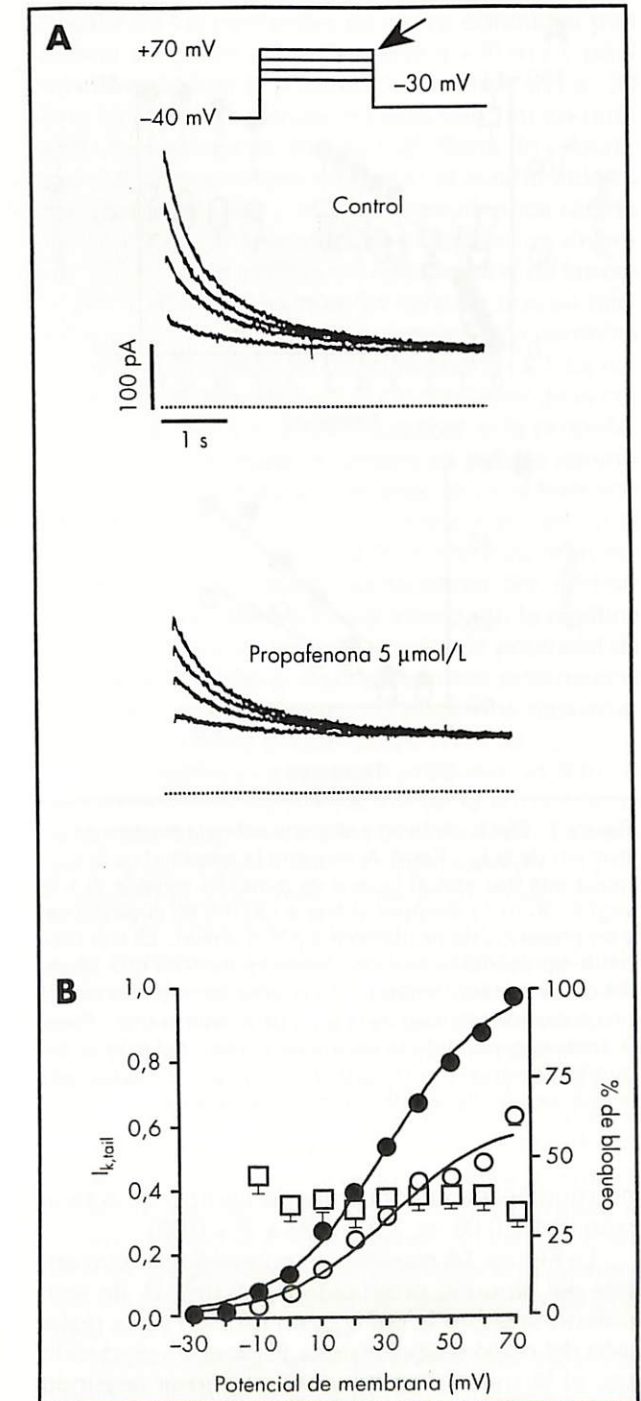


Figura 6. Efectos voltaje-dependientes de la propafenona sobre la $I_{K,s}$. Panel A: Trazos de la corriente de cierre sobrepuestos obtenidos tras fijar el potencial de membrana a -30 mV después de aplicar pulsos despolarizantes de 5 seg desde -40 mV hasta +10, +30, +50 y +70 mV. La línea punteada indica el nivel 0 de corriente. Panel B: Dependencia de voltaje de la activación de la $I_{K,s}$ en ausencia (●) y en presencia (○) de propafenona, 5 μ mol/L. La línea continua representa el ajuste de los datos experimentales utilizando la ecuación de Boltzmann: $I_K/I_{K,max} = 1/(1 + \exp[(V_h - V_m)/k])$. Los cuadrados representan el porcentaje de bloqueo de la $I_{K,tail}$ a cada potencial de membrana.

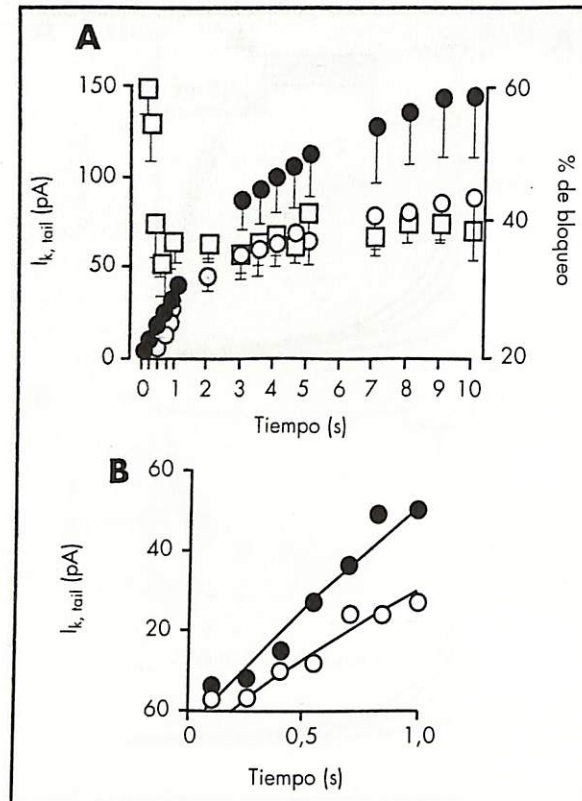


Figura 7. Efecto de la propafenona sobre la cinética de activación de la $I_{K,s}$. Panel A: muestra la amplitud de la $I_{K,tail}$ registrada tras aplicar pulsos de duración variable (0,1-10 seg) a +30 mV y después volver a -30 mV en ausencia (●) y en presencia de propafenona (○), 5 $\mu\text{mol/L}$. La línea continua representa la función monoexponencial que ajusta los datos experimentales. Los cuadrados representan el porcentaje de bloqueo de la $I_{K,tail}$ para cada tiempo. Panel B: hemos expandido la escala de tiempo del primer segundo. Obsérvese el retraso en la activación medido por la intersección del ajuste con el eje de abscisas.

no modificaba la constante de tiempo de activación ($3,4 \pm 0,08$ vs. $3,3 \pm 0,09$ s, $P > 0,05$).

La Figura 7A muestra en cuadrados el porcentaje del bloqueo producido por 5 $\mu\text{mol/L}$ de propafenona sobre la del $I_{K,tail}$ en función de la duración del pulso despolarizante. El bloqueo producido por el fármaco disminuye en el primer segundo del pulso hasta +30 mV. La Tabla I muestra el porcentaje de inhibición de la $I_{K,s}$ medido sobre las corrientes de cierre generadas tras aplicar pulsos despolarizantes de 0,4, 4 y 10 seg. Ello indica que el bloqueo producido por la propafenona no aumenta con la duración del pulso despolarizante. Para caracterizar mejor las interacciones tiempo-dependientes de la propafenona sobre la $I_{K,s}$, analizamos el curso temporal de su deactivación. En situación control la cinética de deactivación de la $I_{K,tail}$ tras aplicar un pulso desde -40 hasta 30 mV

se ajustaba a una función biexponencial. En 8 células, la propafenona no modificaba las constantes de tiempo rápida (τ_r) ($325,4 \pm 20,2$ ms vs. $340,1 \pm 30,1$ ms), ni la lenta (τ_l) ($1.591,2 \pm 349,2$ vs. $1.994,2 \pm 359$ ms, $P > 0,05$) de deactivación. La propafenona, 10 $\mu\text{mol/L}$, tampoco modificaba la cinética de deactivación ($\tau_r = 213,8 \pm 56,4$ vs. $282,5 \pm 78,3$ mseg y $\tau_l = 1.655,5 \pm 220,1$ vs. $2.027,7 \pm 386,8$ mseg, $P > 0,05$, $n = 6$). Estos resultados indicaban que el bloqueo de la $I_{K,s}$ no era voltaje-dependiente, no aumentaba al incrementar la duración del pulso despolarizante y que retrasaba el comienzo de la activación de esta corriente. Por ello podemos concluir que la propafenona bloquearía los canales K_s cuando se encuentran en el estado cerrado.

DISCUSIÓN

En este trabajo hemos analizado en miocitos ventriculares aislados de cobaya los efectos de la propafenona, un potente bloqueante del estado activo del canal de Na^+ con cinética lenta (1, 8), sobre los dos componentes de la corriente de K^+ rectificadora tardía, $I_{K,r}$ e $I_{K,s}$. Ambos componentes pueden distinguirse por su cinética de activación, rectificación y sensibilidad a fármacos (15, 26, 31, 32). La $I_{K,r}$ se activa rápidamente con despolarizaciones moderadas (entre -40 y 0 mV), su relación corriente-voltaje muestra rectificación interna a potenciales > 10 mV y se bloquea con E-4031 (15) y dofetilida (31, 32). La $I_{K,s}$ se activa más lentamente a potenciales positivos a 0 mV, pero es mucho mayor que la $I_{K,r}$ cuando se ha activado totalmente, su rectificación es mínima o ausente y es insensible a dos fármacos antes mencionados (15).

Efectos de la propafenona sobre la I_K

La propafenona bloquea la I_K de forma concentración y voltaje-dependiente, siendo el bloqueo de la $I_{K,max}$ y de la $I_{K,tail}$ más marcado tras pulsos despolarizantes débiles. Por tanto, desplaza 5 mV en sentido despolarizante la curva de activación de la I_K . Además, los efectos de la propafenona sobre la I_K eran tiempo-dependientes, siendo el bloqueo significativamente mayor tras pulsos cortos (0,1-1 seg) que tras pulsos largos. Puesto que $I_{K,r}$ se activa a niveles más negativos y presenta una cinética más rápida de la $I_{K,s}$ (15), los efectos de la propafenona sugieren que el fármaco bloquea preferentemente el componente de activación rápida, la $I_{K,r}$.

Ello fue confirmado con el test de la envoltura de las corrientes de cierre. Como ha sido descrito previamente (15, 25), en miocitos ventriculares de cobayo la I_K parece deberse a la activación de dos tipos distintos de canales. La propafenona inhibía de forma dosis-dependiente el cociente $\Delta I_{K,tail}/\Delta I_{K,max}$ para pulsos despolarizantes comprendidos entre 0,1 y 1 seg, de tal forma que a 5 $\mu\text{mol/L}$ inhibía completamente la $I_{K,r}$. Estos resultados indicaban que la propafenona era un potente bloqueante de los canales K_r y confirmaba resultados previos obtenidos en miocitos auriculares de conejo (12), donde la I_K presenta sólo un componente ($I_{K,r}$) (14). Duan y cols. (12) demostraban que la propafenona bloqueaba la $I_{K,r}$ por unirse preferentemente al estado abierto del canal. En estos experimentos no hemos analizado la dependencia de tiempo y voltaje del bloqueo de la $I_{K,r}$, por lo que no podemos conocer qué estado del canal K_r bloquea la propafenona en miocitos ventriculares de cobayo.

Efectos de la propafenona sobre la $I_{K,s}$

Con el fin de analizar los efectos de la propafenona sobre la $I_{K,s}$, los miocitos se perfundieron con 30 $\mu\text{mol/L}$ de La^{3+} . A esta concentración, el La^{3+} bloqueaba completamente la $I_{K,r}$ (26). Nuestros resultados indican que la propafenona producía un bloqueo concentración-dependiente de la $I_{K,s}$, siendo menos potente para inhibir esta corriente que para bloquear los canales K_r . Además el bloqueo de la $I_{K,s}$ no dependía del voltaje del pulso aplicado. Así, el bloqueo de la $I_{K,tail}$ no difería significativamente para despolarizaciones pequeñas (-20 mV) o marcadas (+70 mV). Por ello, a las dos concentraciones ensayadas (5 y 10 $\mu\text{mol/L}$), la propafenona no modificaba los valores de V_h y k de la curva de activación de la $I_{K,s}$. Este hallazgo es similar al obtenido en miocitos auriculares de conejo para la $I_{K,r}$ (12). La ausencia de efectos voltaje-dependientes sobre la $I_{K,r}$ e $I_{K,s}$ diferencia a la propafenona de otros fármacos antiarrítmicos del grupo Ic, por ejemplo, flecainida y encainida, que producen un bloqueo voltaje-dependiente de la $I_{K,r}$ en miocitos ventriculares aislados de gato (13).

La propafenona, 5 y 10 $\mu\text{mol/L}$, no modificaba la cinética de activación. Idénticos resultados se obtuvieron cuando se calculaba la cinética de activación graficando la amplitud de la $I_{K,max}$ frente a la duración del pulso despolarizante. Ello indicaría que la propafenona no modifica la cinética de deactivación de las corrientes de cierre, lo que fue confirmado cuando se analizaron sus efectos sobre el proceso de deactivación. La propafenona no modificaba la constante de tiempo de deacti-

vación de las corrientes de cierre obtenidas tras aplicar un pulso despolarizante a +30 mV y posteriormente fijar el potencial de membrana a -30 mV. Un hallazgo similar ha sido descrito en miocitos auriculares de conejo (12). Sería de esperar que los fármacos que bloquean el estado abierto de los canales K_s y exhiben una cinética rápida de recuperación del bloqueo indujeran un enlentecimiento en la cinética de deactivación de las corrientes de cierre, ya que los canales que se desbloquean durante el cierre generan una corriente de salida retrasando su curso temporal (32). La ausencia de efectos sobre el curso temporal de la corriente de cierre se podría explicar si la propafenona: a) no se uniese a canales en estado abierto y b) se uniese al estado abierto, pero el fármaco exhibe una cinética lenta de desbloqueo del canal o si los canales unidos al fármaco pudieran cerrarse durante el pulso repolarizante. Sin embargo, dado que no hemos caracterizado la cinética de deactivación a distintos niveles de potencial de membrana y tras pulsos a distintos potenciales con distintas duraciones, no podemos descartar ninguna de estas posibilidades teóricas.

La propafenona también producía un retraso en el comienzo de activación de la corriente de unos 100 mseg. Resultados similares han sido obtenidos con imipramina (23), indicando que la propafenona bloquea preferentemente un estado cerrado del canal K_s . La propafenona no producía más bloqueo a niveles despolarizados (cuando más canales se encuentran abiertos) y no modificaba las constantes de tiempo de activación y deactivación. Más aún, el bloqueo no aumentaba durante la aplicación de un pulso despolarizante. Todo ello sugeriría que la propafenona bloquea la $I_{K,s}$ por unirse, preferentemente, a un estado cerrado del canal. Sin embargo, debido a la lenta cinética de activación de la $I_{K,s}$, es difícil evaluar la interacción entre un bloqueante del estado abierto y los canales K_s , particularmente si el fármaco exhibe una cinética rápida de asociación a los mismos (33).

Desafortunadamente, en un estrecho rango de concentraciones la propafenona bloquea numerosos canales iónicos cardíacos que pueden jugar un importante papel en la repolarización del potencial de acción cardíaco, por ejemplo I_{Na} , I_{Ca} , I_{to} , $I_{K,r}$, $I_{K,s}$ e I_{K1} (8, 9, 12). Por tanto, sus efectos sobre diversos tejidos cardíacos (fibras musculares auriculares y ventriculares, fibras de Purkinje) y a distintas frecuencias cardíacas (en ritmo sinusal o durante la taquicardia) sería el resultado de sus efectos voltaje- y tiempo-dependientes contradictorios sobre cada corriente individual. Además, debería indicarse que los resultados en miocitos

ventriculares de cobayo (en los que existen $I_{K,r}$ e $I_{K,s}$) son bien distintos de los encontrados en otras especies (gato, conejo) (13, 32), donde sólo existe la $I_{K,r}$. Recientemente, se ha demostrado que la $I_{K,s}$ está presente en las células musculares auriculares humanas, y su amplitud y cinética sugiere que su papel en la fase 3 de repolarización de este tejido cardíaco podría ser más importante que la de la $I_{K,r}$ (20). Sin embargo, aún desconocemos el posible papel de los canales K_s en la repolarización de los miocitos ventriculares humanos.

Agradecimientos

Deseamos agradecer a los Drs. L. M. Hondegem, P. M. Bennett y J. A. Sánchez-Chapula por sus valiosos comentarios.

BIBLIOGRAFÍA

1. TAMARGO J, VALENZUELA C, DELPÓN E. New insights into the pharmacology of sodium channels blockers. *Eur Heart J*. 1992; 13: 2-13.
2. FUNCK-BRENTANO C, KROEMER H K, LEE T J, RODEN D M. Propafenone. *N Engl J Med*. 1990; 313: 518-525.
3. BRYSON H M, PALMER K J, LANGTRY H D, FITTON A. Propafenone. A reappraisal of its pharmacology, pharmacokinetics and therapeutic use in cardiac arrhythmias. *Drugs*. 1993; 45: 85-135.
4. KOHLHARDT M, SEIFERT C. Inhibition of V_{max} of the action potential by propafenone and its voltage-, time- and ph-dependence in mammalian ventricular myocardium. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1980; 315: 55-62.
5. DELGADO C, TAMARGO J, TEJERINA T. Electrophysiological effects of propafenone in non-treated and in propafenone pretreated guinea-pig atrial and ventricular muscle. *Br J Pharmacol*. 1985; 86: 765-775.
6. LEDDA F, MANTELLI L, MANZINI S, AMERINI S, MUGELLI A. Electrophysiological and antiarrhythmic properties of propafenone in isolated cardiac preparations. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1981; 3: 1162-1173.
7. TAMARGO J. Propafenone slows conduction and produces a nonuniform recovery of excitability between Purkinje and ventricular muscle fibers. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1993; 22: 203-207.
8. KOHLHARDT M, FICHTNER H, FRÖBE U, HERZIG J W. On the mechanism of drug-induced blockade single cardiac Na^+ channels. *Circ Res*. 1989; 64: 867-881.
9. DELGADO C, TAMARGO J, HENZEL D, LORENTE F. Effects of propafenone on calcium current in guinea-pig ventricular myocytes. *Br J Pharmacol*. 1993; 108: 721-727.
10. SATOH H, HASHIMOTO K. Effect of propafenone on the membrane currents of rabbit sino-atrial node cells. *Eur J Pharmacol*. 1984; 99: 185-191.
11. DUKES I, VAUGHAN WILLIAMS E. The multiple modes of action of propafenone. *Eur Heart J*. 1984; 5: 115-125.
12. DUAN A, FERMINI B, NATTEL S. Potassium blocking properties of propafenone in rabbit atrial myocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 264: 1113-1123.
13. COLATSKY T J, FOLLMER C H, STARMER C F. Channel specificity in antiarrhythmic drug action: Mechanism of potassium channel block and its role in suppressing and aggravating cardiac arrhythmias. *Circulation*. 1990; 82: 2235-2242.
14. FERMINI B, NATTEL S. Evidence for a delayed rectifier potassium current, I_K , in rabbit atrial myocytes. *Biophys J*. 1991; 59: 266A.
15. SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Two components of cardiac delayed rectifier K^+ current. Differential sensitivity to block by class III antiarrhythmic agents. *J Gen Physiol*. 1990; 96: 195-215.
16. ESCANDE D, COULOMBE A, FAIVRE J F, DEROUBAIX E, CORABOEUF E. Two types of transient outward currents in adult human atrial cells. *Am J Physiol*. 1987; 252: H142-H148.
17. SHIBATA E F, DRURY T, REFSUM H, ALDRETE V, GILES W. Contributions of a transient outward current to repolarization in human atrium. *Am J Physiol*. 1989; 257: H1773-H1781.
18. NATTEL S, WANG Z, FERMINI B. Three types of delayed rectifier potassium currents in human atrial cardiomyocytes. *Biophys J*. 1993; 64: A393.
19. FEDIDA D, WIBLE B, WANG Z, FERMINI B, FAUST F, NATTEL S, BROWN A M. Identity of a novel delayed rectifier current from human heart with a cloned K^+ channel current. *Circ Res*. 1993; 73: 210-216.
20. WANG Z, FERMINI B, NATTEL S. Delayed rectifier outward current and repolarization in human atrial myocytes. *Cir Res*. 1993; 73: 276-285.
21. DELPÓN E, VALENZUELA C, CASIS O, PÉREZ O, TAMARGO J. Effects of propafenone on $I_{K,s}$ and $I_{K,r}$ in guinea-pig ventricular myocytes. *Biophys J*. 1993; 64: A314.
22. DELPÓN E, TAMARGO J, SÁNCHEZ-CHAPULA J. Further characterization of the effects of imipramine on plateau membrane currents in guinea-pig ventricular myocytes. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*. 1991; 344: 645-652.
23. VALENZUELA C, SÁNCHEZ-CHAPULA J, DELPÓN E, PÉREZ O, ELIZALDE A, TAMARGO J. Imipramine (IMI) blocks $I_{K,r}$ and delays $I_{K,s}$ activation in guinea pig ventricular myocytes. *Circ Res*. 1994; 74: 687-699.
24. VALENZUELA C, PÉREZ O, CASIS O, DUARTE J, PÉREZ-VIZCAINO F, DELPÓN E, TAMARGO J. Effects of lisinipril on electromechanical properties and membrane currents in guinea-pig cardiac preparations. *Br J Pharmacol*. 1993; 109: 873-879.
25. BALSER J, BENNETT P, RODEN D. Time-dependent outward current in guinea pig ventricular myocytes. *J Gen Physiol*. 1990; 96: 835-863.
26. SANGUINETTI M, JURKIEWICZ N. Lanthanum blocks a specific component of I_K and screens membrane surface charge in cardiac cells. *Am J Physiol*. 1990; 259: H1881-H1889.
27. HORN R, MARTY A. Muscarinic activation of ionic currents measured by a new whole-cell recording method. *J Gen Physiol*. 1988; 92: 145-159.
28. SALA S, PARSEY R, COHEN A, MATTESON D. Analysis and use of the perforated patch technique for recording ionic currents in pancreatic β -cells. *J Membrane Biol*. 1991; 122: 177-187.
29. WALLESTEIN S, ZUCKER C, FLEISS J. Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res*. 1980; 47: 1-9.
30. MATSUURA H, EHARA T, IMOTO Y. An analysis of the delayed outward current in single ventricular cells of the guinea-pig. *Pflügers Arch*. 1987; 410: 596-603.
31. JURKIEWICZ N, SANGUINETTI M. Rate-dependent prolongation of cardiac action potentials by methanesulfonanilide class III antiarrhythmic agent. Specific block of rapidly activating delayed rectifier K^+ current by dofetilide. *Circ Res*. 1993; 72: 75-83.
32. CARMELIET E. Voltage- and time-dependent block of the delayed K^+ current in cardiac myocytes by dofetilide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992; 262: 809-817.
33. DUKES I, CLEEMANN L, MORAD M. Tedisamil blocks the transient and delayed rectifier K^+ currents in mammalian cardiac and glial cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990; 254: 560-569.

El intervalo S-A topoestimulado: una nueva guía cartográfica en la ablación con catéter de vías accesorias auriculoventriculares ocultas

Pace mapping S-A interval: a new guide for catheter ablation of concealed accessory pathways

Hospital General Gregorio Marañón
Madrid

José Luis Merino Lloréns ¹
Jesús Almendral Garrote ²
Rafael Peinado Peinado ¹
Ángel Arenal Maiz ³
Julián Pérez Villacastín ³
Luis Tercedor Rodríguez ⁴
Juan Luis Delcán Domínguez ⁵

RESUMEN

Con el objetivo de evaluar un método para localizar la inserción ventricular de las vías accesorias (VAc) ocultas, se estimuló eléctricamente el ventrículo izquierdo con el catéter de ablación desde diferentes puntos, tratando de encontrar el menor intervalo estímulo-auriculograma, medido en un registro endocavitario de referencia.

Métodos: Se incluyeron en el estudio 11 pacientes con una VAc izquierda oculta y taquicardia auriculoventricular ortodrómica refractaria al tratamiento farmacológico. El intervalo SA se midió en los trazados obtenidos del seno coronario medio. Se excluyó de forma rutinaria la captura auricular directa con la disminución progresiva de la intensidad del estímulo, hasta observarse un incremento brusco en el intervalo de conducción VA.

Resultados: El menor intervalo SA se encontró en todos los pacientes menos en uno en el anillo mitral en la posición en la que la aplicación de radiofrecuencia eliminó la conducción por la VAc de forma definitiva ($63,7 \pm 18,2$ vs $80,7 \pm 23,3$ ms, $p < 0,001$). Existió una tendencia de un menor intervalo SA en las posiciones en las que la aplicación de radiofrecuencia fue exitosa con respecto a en las que fracasó, aunque sin alcanzarse diferencias estadísticamente significativas ($63,7 \pm 18,2$ vs $75,6 \pm 28,5$ ms, $p = 0,09$). La ablación se completó con éxito con una media de $1,7 \pm 1,1$ aplicaciones de energía en 3 pacientes en los que el procedimiento se guió de forma exclusiva mediante el intervalo S-A topoestimulado, frente a $4,9 \pm 5$ en los que se realizó mediante el método convencional con análisis posterior de dicho intervalo.

Conclusiones: 1) La inserción ventricular de VAc ocultas izquierdas puede ser identificada mediante la medición del intervalo SA topoestimulado. 2) Este método puede ser utilizado en la ablación de estas VAc de forma exclusiva o en combinación con el método estándar.

Palabras clave: Taquicardia supraventricular, vía accesoria oculta, ablación con catéter, cartografía, topoestimulación.

Merino Lloréns J L, Almendral Garrote J, Peinado Peinado R, Arenal Maiz A, Pérez Villacastín J, Tercedor Rodríguez L, Delcán Domínguez J L

El intervalo S-A topoestimulado: una nueva guía cartográfica en la ablación con catéter de vías accesorias auriculoventriculares ocultas
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 24-30

Correspondencia:

José Luis Merino Lloréns
Unidad de Arritmias. UMQ de Cardiología
Hospital General La Paz
P. de la Castellana, 261. 28046 Madrid

ABSTRACT

In order to evaluate a method to localize the accessory pathway (AP) ventricular insertion, left ventricular pacing was performed at the ablation catheter from several sites, searching for the shortest stimulus to atrial electrogram interval (SA) measured on a reference channel.

Methods: 11 patients with a left concealed accessory pathway and drug refractory tachycardia were included in the study. The SA interval was measured on the tracings recorded from the middle coronary sinus. Atrial direct capture was routinely excluded with the gradual decrease of the pacing intensity until a sudden increase of the VA interval was observed.

Results: In ten patients the shortest SA was found at the ablation successful site ($63,7 \pm 18,2$ vs $80,7 \pm 23,3$ ms, $p < 0,001$). There was a trend of a lesser SA interval in effective sites compared to ineffective sites, although the difference was not statistically significant ($63,7 \pm 18,2$ vs $75,6 \pm 28,5$ ms, $p = 0,09$). The SA method was used in three patients as the only guide for ablation, successfully accomplished in all three with an average of $1,7 \pm 1,1$ energy applications in contrast to $4,9 \pm 5$ applications in patients with the standard approach and later measurement of the SA interval.

Conclusions: 1) The ventricular insertion of left concealed AP can be accurately localized with the pacemapping SA interval method. 2) It may be used combined with or as an alternative to the conventional approach on left concealed AP ablation.

Key words: Supraventricular tachycardia, concealed accessory pathway, catheter ablation, pace-mapping.

Merino Lloréns J L, Almendral Garrote J, Peinado Peinado R, Arenal Maiz A, Pérez Villacastín J, Tercedor Rodríguez L, Delcán Domínguez J L

Pace Mapping S-A interval: a new guide for catheter ablation of concealed accessory pathways
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 24-30

¹ Médico Adjunto. Unidad Arritmias. Hospital La Paz. Madrid.

² Jefe Sección. Unidad Arritmias.

³ Médico Adjunto. Unidad Arritmias.

⁴ Médico Adjunto. Unidad Arritmias. Hospital Virgen de las Nieves. Granada.

⁵ Jefe Departamento Cardiología.

INTRODUCCIÓN

En 1984 Morady et al. (1) describieron la eliminación de vías accesorias auriculoventriculares (VAc) con la aplicación de choques de corriente continua intracardiácos mediante un catéter introducido transvenosamente. A partir de ese momento esta técnica ha experimentado un importante desarrollo y así, en los últimos años, se ha sustituido la fuente de energía terapéutica, utilizándose actualmente la energía térmica generada por radiofrecuencia. Se han descrito resultados excelentes en las principales series (2-4), con porcentajes de éxito de alrededor del 95%, una baja incidencia de recurrencias y complicaciones y una mortalidad del procedimiento prácticamente nula.

A pesar de estos excelentes resultados, actualmente persisten algunos problemas por resolver. El principal de ellos lo constituye la dificultad de localizar con el catéter de ablación el punto preciso a nivel del anillo auriculoventricular (AV) en el que la aplicación de radiofrecuencia elimine de forma definitiva la conducción eléctrica a través de la VAc. Esta dificultad origina que los tiempos medios del procedimiento y de radioscopia se prolonguen en ocasiones excesivamente. La situación se agrava si la VAc es oculta, es decir conduce exclusivamente de forma retrógrada. Esto origina que actualmente su localización sólo pueda hacerse durante taquicardia reentrante AV ortodrómica (TO) o estimulación eléctrica ventricular continua, cartografiando su inserción auricular retrógrada más precoz (1-5) o cartografiando su cuerpo principal, mediante la detección de potenciales de VAc. A pesar de este enfoque cartográfico dirigido fundamentalmente a la localización de la inserción auricular de la VAc, la mayoría de los autores libera la energía en el lado ventricular del anillo auriculoventricular, lo que podría ser inadecuado si la VAc sigue un curso oblicuo y podría explicar el porcentaje menor de éxito (64%) encontrados por algunos autores en la ablación de estas VAc (6). Actualmente, no se dispone de ningún método aceptado que permita localizar la inserción ventricular de las VAc ocultas, aunque algunos autores han propuesto la abolición transitoria de la conducción por la VAc mediante bloqueo inducido mediante estimulación eléctrica subumbral (7).

Este estudio se planteó para desarrollar un método nuevo que permitiera cartografiar y localizar la inserción ventricular de las VAc de conducción exclusivamente retrógrada. La hipótesis básica del trabajo consistió en que la estimulación eléctrica ventricular con el catéter de ablación conllevaría

teóricamente intervalos de conducción retrógrada ventriculoatrial (VA) más cortos cuanto más cerca estuviera el punto de estimulación de la inserción ventricular de la VAc. De esta forma, se estimularía el miocardio ventricular de diferentes puntos del anillo AV y, en las inmediaciones de donde se observará un menor tiempo de conducción auricular, se encontraría la inserción ventricular de la VAc y, por consiguiente, la liberación de energía mediante radiofrecuencia produciría la abolición definitiva de su conducción eléctrica.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en el estudio a pacientes portadores de una VAc izquierda referidos a nuestro centro para la realización de un procedimiento de ablación con catéter mediante radiofrecuencia y sin conducción anterógrada por la VAc en el momento del procedimiento. Con estos criterios se estudiaron finalmente 11 pacientes, 4 varones y 7 mujeres, con una edad media de 34 ± 13 años y sin cardiopatía estructural (Tabla I). Todos ellos presentaban una VAc lateral izquierda, que en 10 era oculta y en uno manifesta sin conducción anterógrada al inicio y durante el procedimiento. Todos ellos presentaron crisis de TO recurrente, a pesar del tratamiento farmacológico antiarrítmico ($1,9 \pm 1,4$ fármacos utilizados). Todos los pacientes recibieron información verbal y escrita sobre el procedimiento, y dieron su consentimiento para el mismo de forma escrita.

Estudio electrofisiológico

El estudio electrofisiológico se realizó inmediatamente antes y en conjunción con la ablación durante el mismo procedimiento, en ayunas y con suspensión de toda medicación antiarrítmica más de cinco vidas medias antes. Los pacientes recibieron premedicación antes de comenzar el estudio con 10 mg de cloruro morfíco y 0,5 mg de escopolamina intramuscular. Se introdujo transvenosamente bajo control fluoroscópico 3 catéteres multipolares con una distancia interelectrodo entre 1 y 5 mm, que se situaron en la aurícula derecha alta (ADA), región del haz de His (HIS) y apex de ventrículo derecho (AVD). Así mismo, se introdujo en el seno coronario un catéter 6F decapolar (USCI®) con distancia entre pares de electrodos de 10 mm. La estimulación eléctrica se realizó me-

Tabla I. Características clínicas y parámetros de la vía accesoria de los pacientes estudiados (AL: anterolateral, FA: fibrilación auricular, L: lateral, Localiz.: localización, LC: longitud de ciclo, M: mujer, P: posterior, PL: posterolateral, Taq.: taquicardia, TO: taquicardia, AV: reentrante ortodrómica, V: varón)

N.º paciente	Edad (años)	Sexo	Tipo Taq.	LC Taq. (ms)	Localiz. VAc
1	43	M	TO	280	L
2	19	M	TO	260	L
3	13	V	TO	280	PL
4	27	M	TO	360	AL
5	27	M	TO	290	L
6	63	V	TO	330	L
7	40	M	TO	310	AL
8	37	M	TO	430	L
9	37	M	TO	430	L
10	42	V	FA	260	L
11	31	V	TO, FA	300	P
Media	34 ± 13			321 ± 61	

diente un estimulador programable (UHS 20, Biotronik®) con intensidad de estímulo hasta 20 mAmp y duración de estímulo hasta 2,9 ms. Se registraron de 2 a 4 derivaciones de ECG convencional de superficie, así como de 3 a 8 derivaciones bipolares intracardíacas y de 1 a 4 derivaciones unipolares intracardíacas. Las derivaciones bipolares se filtraron entre 30 y 500 Hz y con un filtro de 50 Hz. Las derivaciones unipolares se obtuvieron mediante el enfrentamiento del electrodo explorador y un electrodo de referencia situado en la cava inferior, filtrándose entre 0,05 y 2.500 Hz. Los registros se inscribieron mediante un registrador fotográfico (Honeywell® VR12) a una velocidad de papel de 100 mm/s.

Los parámetros funcionales y de localización de la VAc y de inducción de taquicardia fueron analizados mediante los métodos y criterios previamente descritos por Wellens et al. (8).

Cartografía activación convencional

Después de la localización preliminar de la VAc, se realizó cartografía más precisa con un cateter explorador introducido de forma retrógrada por la arteria femoral derecha en el ventrículo izquierdo a través de la válvula aórtica. Este cateter fue un tetrapolar 7F con electrodo distal de 4 mm, electrodos proximales de 1 mm, distancia interelectrodo de 1 mm y distancia entre pares de electrodos de 5 mm (Polaris Mansfield/Webster® o RF Ablatr CardioRhythm Medtronic®).

En la elección del punto de liberación de energía de radiofrecuencias se utilizaron en todos los

pacientes, salvo en tres, los criterios actualmente aceptados de presencia de potenciales auriculares y ventriculares estables en ritmo sinusal y detección de la actividad auricular retrógrada más precoz o de un potencial de VAc durante taquicardia AV ortodrómica o bajo estimulación continua ventricular (1-5).

Cartografía estimulación bajo valoración

Con el método cartográfico (intervalo SA topoestimulado) bajo valoración, la estimulación se realizó bipolarmente, empleando el par de electrodos distal del cateter de ablación y una de longitud de ciclo constante (400-500 ms) para todas las posiciones exploradas. La estimulación se inició con 1 ms de duración y 20 mAmp de intensidad de estímulo y, sin interrumpirla, se disminuyó progresivamente la intensidad del estímulo hasta observarse pérdida de la captura ventricular. Se descartó en cada posición la presencia de captura eléctrica directa auricular mediante la obtención de conducción VA 2:1 con disminución de la longitud de ciclo de estimulación o por observarse, con la disminución progresiva de la intensidad del estímulo, un incremento brusco del intervalo VA y un cambio de morfología de los electrogramas auriculares, sugestivos de cambio de la activación auricular de captura eléctrica directa a conducción ventriculoatrial.

Para el análisis de las posiciones se utilizó el intervalo SA topoestimulado, considerando como el intervalo de tiempo transcurrido entre el artefacto del estímulo y el auriculograma local retró-

grado y medido en un registro estable de referencia, generalmente el del seno coronario medio.

El protocolo de estimulación se realizó en todas aquellas posiciones exploradas mediante el método cartográfico clásico, siempre que el operador del cateter de ablación considerara que éste se encontraba lo suficientemente estable como para poder estimular desde él con poco riesgo de desplazamiento del mismo.

El análisis del intervalo SA generalmente se realizó posteriormente una vez terminado el procedimiento, no guiando la ablación en ningún paciente, salvo en tres. En estos tres pacientes no se realizó el método cartográfico convencional, por lo que el método del intervalo SA topoestimulado fue la única guía para la ablación. En ellos, el protocolo se realizó estimulando desde distintos puntos del anillo mitral, inicialmente separados entre sí, pero sucesivamente más próximos al punto de menor intervalo SA obtenido. Se seleccionó para la aplicación de energía de radiofrecuencia el punto del anillo mitral donde se obtuvo un menor intervalo SA, después de explorar al menos 5 posiciones.

Ablación

Para la ablación se utilizó energía de radiofrecuencia (Radionics, Burlington® o Atakr, CardioRhythm Medtronic®), liberada entre el electrodo distal del cateter explorador y un parche electrodo cutáneo situado en la espalda del paciente. Se liberó durante 30-60 segundos una corriente de radiofrecuencia de 20-35 vatios o con límite de temperatura en 70 °C, cuando se utilizó un cateter con posibilidad de monitorización de ésta. En todos los pacientes se comprobó la abolición definitiva de la conducción eléctrica a través de la VAc mediante estimulación eléctrica ventricular a los 30 minutos de terminada la última aplicación de radiofrecuencia.

Estadística

Para el análisis de resultados se ha utilizado la comparación de medias de la prueba de t de Student para datos pareados y no pareados.

RESULTADOS

El método cartográfico de topoestimulación se pudo realizar en todos los pacientes. No se presentaron dificultades técnicas importantes durante el mismo, aunque ocasionalmente el cateter de ablación se desplazó de la posición de estudio con

la estimulación. Se descartó fácilmente la presencia de captura auricular eléctrica directa con la disminución progresiva de la intensidad de estimulación, hasta observarse un «salto» o incremento brusco del intervalo SA con cambio de la morfología de los electrogramas auriculares (Figura 1). Adicionalmente, la presencia de captura auricular eléctrica directa sirvió para confirmar la adecuada posición ventricular izquierda del cateter de ablación a nivel del anillo mitral. Ocasionalmente, y a pesar de registrarse electrogramas ventriculares de suficiente amplitud, no fue posible la captura ventricular en determinadas posiciones del anillo mitral, incluso con el empleo de energías máximas de estimulación (amplitud de 20 mAmp, duración de estímulo de 2,9 ms).

Se evaluaron un total de 97 posiciones (8,8 ± 5,2 posiciones/paciente). El menor intervalo SA se encontró en todos los pacientes, menos en uno, en la posición de éxito. En este paciente, la aplicación de radiofrecuencia en la posición en que se obtuvo el intervalo SA más corto abolió transitoriamente la conducción eléctrica por la VAc.

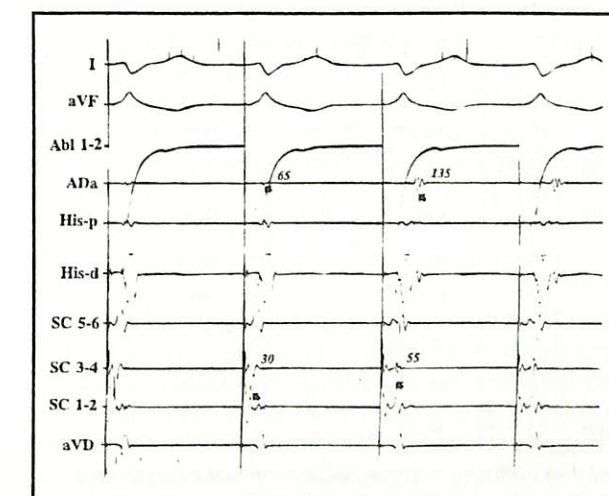


Figura 1. «Salto» del intervalo SA topoestimulado. Se muestra el registro electrofisiológico obtenido durante estimulación ventricular continua desde el cateter de ablación con disminución progresiva de la intensidad del estímulo a nivel del anillo mitral. Los dos primeros complejos estimulados presentan captura auricular eléctrica directa, mostrando, tanto en el registro del seno coronario medio (30 ms) como en el de aurícula derecha alta (65 ms), un intervalo estímulo-auriculograma (SA) corto. En los dos últimos complejos, se pierde la captura auricular directa con la disminución de la intensidad de estimulación, observándose una prolongación llamativa del intervalo SA (55 y 135 ms) y un cambio de la morfología de los auriculogramas (Abl: cateter de ablación, ADa: aurícula derecha alta, aVD: apex de ventrículo derecho, SC: seno coronario, felcha: componente del auriculograma tomado para la determinación del tiempo de activación local).

El intervalo SA medio medido en el registro intracavitario con auriculograma más precoz, generalmente el SC medio, fue significativamente menor en la posición de éxito que en el resto de posiciones evaluadas ($63,7 \pm 18,2$ vs $80,7 \pm 23,3$ ms, $p < 0,001$) situadas a una distancia media de $0,7 \pm 0,3$ cm (Figura 2) de la posición de éxito (Tabla II). Cuando sólo se estudiaron las posiciones en las que se aplicó radiofrecuencia, también se observó un intervalo SA menor en las posiciones de éxito con respecto a las de fracaso, aunque estas diferencias no llegaron a alcanzar diferencias estadísticamente significativas ($63,7 \pm 18,2$ vs $75,6 \pm 28,5$ ms, $p = 0,09$) (Figura 3). Una vez terminada con éxito la ablación, se observó un incremento muy importante en el intervalo SA topoestimulado con respecto al valor previo en la posición de éxito (Figura 3).

El procedimiento de ablación se realizó con éxito en todos los pacientes, incluyendo a los tres en los que el único método de cartografía empleado fue la medición del intervalo SA estimulado.

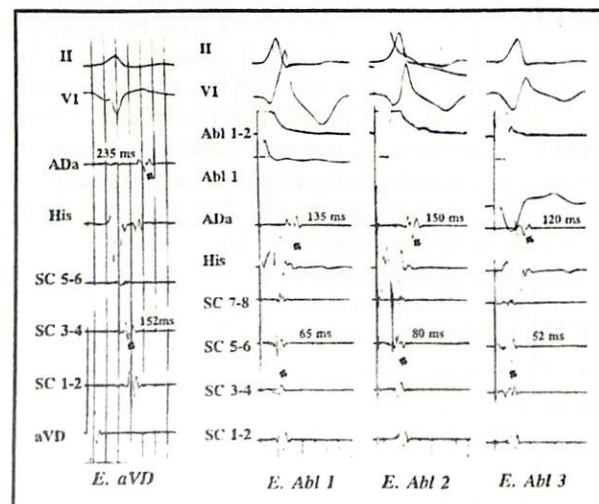


Figura 2. Medición del intervalo SA topoestimulado en la ablación de un paciente con una vía accesoria (VAc) oculta posterior izquierda. Se muestran los registros electrofisiológicos obtenidos durante estimulación ventricular continua desde el cateter de aVD (E. aVD) y el cateter de ablación situado en distintas posiciones del anillo mitral posterior y separadas 5 mm entre sí (E. Abl 1, 2 y 3). El menor intervalo SA, tanto en el registro del seno coronario medio (52 ms) como en el de la aurícula derecha alta (120 ms), se obtuvo en la posición en la que la liberación de radiofrecuencia (E. Abl 3) abolió la conducción por la VAc. La estimulación desde el aVD mostró un intervalo SA mucho mayor que la estimulación a nivel del anillo mitral (Abl: cateter de ablación, ADa: aurícula derecha alta, aVD: apex de ventrículo derecho, SC: seno coronario, flecha: componente del auriculograma tomado para la determinación del tiempo de activación local).

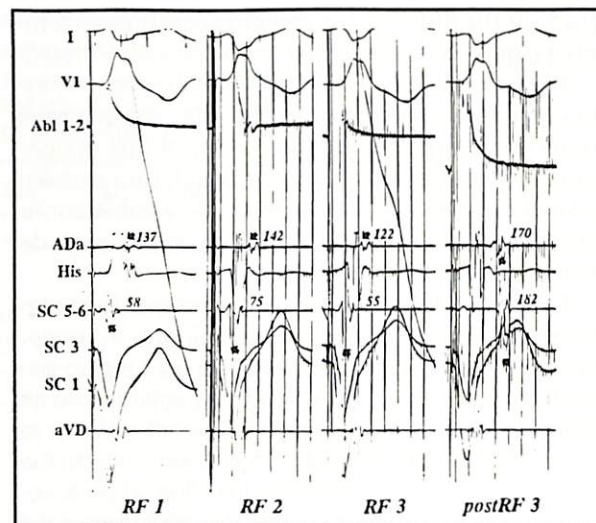


Figura 3. Medición del intervalo SA topoestimulado en la ablación de un paciente con una vía accesoria (VAc) oculta anterolateral izquierda. Se muestran los registros electrofisiológicos obtenidos durante estimulación ventricular continua desde el cateter de ablación situado en las posiciones del anillo mitral en las que se aplicó radiofrecuencia (RF 1, 2 y 3). El último registro (postRF 3) se obtuvo sin desplazar el cateter de ablación de la posición RF3, una vez aplicada con éxito la radiofrecuencia. El menor intervalo SA, tanto en el registro del seno coronario medio (55 ms) como en el de la aurícula derecha alta (122 ms), se obtuvo en la posición de éxito antes de la liberación de radiofrecuencia (RF 3). La estimulación posterior en ese mismo punto, una vez ablacionada la VAc, muestra un incremento llamativo del intervalo SA topoestimulado (Abl: cateter de ablación, ADa: aurícula derecha alta, aVD: apex de ventrículo derecho, SC: seno coronario, flecha: componente del auriculograma tomado para la determinación del tiempo de activación local).

El número medio de aplicaciones de radiofrecuencia fue de $4 \pm 4,5$ por paciente. En los pacientes en los que la cartografía se basó en el método convencional se realizaron de media $4,9 \pm 5$ aplicaciones, mientras que en los tres pacientes en los que el método del SA fue la única guía para la ablación, ésta se realizó con éxito con una media de $1,7 \pm 1,1$ aplicaciones de radiofrecuencia.

DISCUSIÓN

La localización precisa del punto de aplicación de energía es un determinante esencial en la ablación con cateter mediante radiofrecuencia. El elevado tiempo medio de radioscopia no conlleva un riesgo apreciable a largo plazo para el paciente (3), pero si es causa de dosis acumulativas significativas de radiación para el personal que trabaja en este tipo de procedimientos, habiéndose sugerido un número máximo de 15 procedimientos

Tabla II. Características del procedimiento de ablación de los pacientes estudiados (Activ. auric.: tiempo de activación auricular retrógrada en ms en el cateter de ablación con respecto al auriculograma más precoz, C: convencional, Línea Crtg: longitud cartografiada en cm del anillo mitral mediante el intervalo SA topoestimulado, ND: no disponible, N.º RF: número de aplicaciones de radiofrecuencia realizadas, Pos Ev: número de posiciones evaluadas mediante el intervalo SA topoestimulado, SA éxito y previos: intervalo SA topoestimulado en ms respectivamente en la posición de éxito y como media de las posiciones previamente evaluadas)

N.º paciente	Tipo mapeo	Activ. auric	N.º pos. ev.	SA éxito	SA previos	Línea Crtg (cm)	N.º RF
1	C	-5	16	35	51 ± 12	$0,4 \pm 0,4$	5
2	C	-5	4	64	81 ± 10	$0,7 \pm 0,6$	4
3	C	5	8	75	90 ± 11	$1,4 \pm 0,9$	1
4	C	-45	10	80	99 ± 90	$1,1 \pm 0,6$	17
5	C	15	4	45	63 ± 13	$0,5 \pm 0,5$	3
6	C	-5	5	70	87 ± 40	$0,5 \pm 0,5$	3
7	C	-5	6	52	71 ± 11	$0,9 \pm 0,5$	3
8	SA	ND	9	100	137 ± 14	$0,4 \pm 0,4$	1
9	C	0	4	50	60 ± 20	$0,7 \pm 0,6$	3
10	SA	ND	20	72	74 ± 90	$0,3 \pm 0,2$	3
11	SA	ND	1	55	75 ± 12	$0,7 \pm 0,4$	1
Media		$5,6 \pm 17$	$8,8 \pm 5,2$	64 ± 18	81 ± 23	$0,7 \pm 0,3$	$4 \pm 4,5$

mensuales como primer operador (10). Por otro lado, se ha referido un aumento de la incidencia de ciertas arritmias, como la fibrilación auricular, tras aplicaciones de radiofrecuencia a nivel auricular (11), por lo que es importante conveniente limitar su número al mínimo. Por todo esto, actualmente la investigación en el campo de la ablación con cateter no va encaminada tanto al incremento del porcentaje de éxito de la técnica, hoy en día ya muy alto, como a la mejora del procedimiento en sí.

La localización de VAc ocultas se realiza hasta la fecha mediante marcadores electrofisiológicos obtenidos por cartografía de activación. Estos marcadores, aunque eficaces, son relativamente imprecisos. Así, Calkins et al. (9) encuentran en la ablación de VAc ocultas, que la fibrilación de radiofrecuencia en puntos en los que todos los marcadores eran adecuados, presentaba una probabilidad de éxito del 82%, pero cuando aisladamente se consideraban los marcadores, la probabilidad máxima de éxito era de tan solo un 30%. Por tanto, es importante encontrar nuevos marcadores más precisos o que puedan complementar a los actualmente disponibles.

El estudio que aquí se presenta sobre la valoración del método cartográfico del intervalo SA topoestimulado demuestra la utilidad de éste en la ablación de VAc ocultas izquierdas. El intervalo SA fue menor en las posiciones de éxito que en las de fracaso, aunque la diferencia no fue estadísticamente significativa. Esto último estuvo proba-

blemente en relación con, por un lado, el número limitado de pacientes del estudio y, por otro lado, con el que las aplicaciones de energía se realizaron en puntos muy cercanos entre sí. De todas formas, el mínimo intervalo SA topoestimulado se encontró, en prácticamente todos los pacientes, en el punto en el que la aplicación de radiofrecuencia fue exitosa y las diferencias, con respecto a la media de intervalos SA encontrados en las posiciones exploradas previamente, si alcanzó diferencias estadísticamente significativas. Por lo tanto, creemos que este estudio demuestra que es posible realizar cartografía por estimulación para la localización del área de inserción de VAc ocultas izquierdas, aunque no demuestra por completo su capacidad de discriminar entre puntos en los que la aplicación de radiofrecuencia puede ser exitosa. De cualquier manera, hay que considerar también que la cartografía clásica mediante la medición del tiempo de activación auricular retrógrada en el cateter de ablación tampoco discrimina en las principales series entre posiciones de éxito y de fracaso (9).

La cartografía mediante la medición del intervalo SA topoestimulado ofrece dos ventajas principales sobre la cartografía de activación convencional. En primer lugar, se dirige a localizar la inserción ventricular de la VAc frecuente a la localización de la inserción auricular de la cartografía convencional, con las implicaciones, especialmente en VAc de curso oblicuo, que ello conlleva como se comentó previamente. En segundo lu-

gar, la medición del intervalo SA es sencilla y se realiza fácilmente entre el artefacto de estimulación y un componente fijo del auriculograma de referencia que no suele encontrarse oculto y fusionado con el ventriculograma local. En la cartografía activación convencional muchas veces es difícil decidir cuál es el tiempo de activación del auriculograma retrógrado bipolar en el cateter explorador, dado que éste cambia en cada nueva posición, puede estar fusionado con el ventriculograma local o poseer múltiples componentes de semejante importancia.

Es importante recalcar que la realización de este método cartográfico fue sencilla y no implicó un incremento significativo del tiempo de cartografía, ni presentó consecuencias no deseadas ni complicaciones, excepción hecha del desplazamiento esporádico del cateter explorador, que también ocurre con el método cartográfico clásico durante TO o durante estimulación continua desde el apex de ventrículo derecho.

Ocasionalmente no fue posible obtener captura eléctrica ventricular en determinadas posiciones del anillo mitral, aun con intensidades máximas de estimulación. No podemos explicar este fenómeno, aunque probablemente esté en relación con la presencia a nivel del anillo mitral de zonas de esqueleto fibroso pobres en tejido miocárdico excitable.

No fue necesaria la estimulación a una longitud de ciclo mínima, en la que no se presentará conducción VA fusionada por la VAc y por el sistema específico de conducción, dado que el intervalo SA se midió en el registro del seno coronario medio, donde la actividad auricular local dependió siempre de la conducción retrógrada por la VAc. No obstante, creemos que es conveniente descartar la fusión en la conducción VA, para así disponer de una medición adicional del intervalo SA en el registro de la aurícula derecha alta.

El método del intervalo SA topoestimulado presenta como limitación fundamental, el que a priori no se conoce el intervalo SA mínimo requerido para que la aplicación de radiofrecuencia sea eficaz. De todas formas, hay que admitir que esta limitación la comparte el método cartográfico convencional, dado que en éste tampoco se sabe el tiempo de activación auricular retrógrada crítico en el cateter de ablación. Esta limitación obliga en los dos métodos a explorar previamente una zona relativamente amplia del anillo AV.

Como conclusión y por lo comentado anteriormente, creemos que la utilidad de la medición del intervalo SA topoestimulado debe tenerse en cuenta en la ablación de pacientes con VAc ocultas y que este método no debe ser considerado

como excluyente del procedimiento convencional, sino como un complemento de éste.

Agradecimientos

Queremos expresar nuestro agradecimiento a las diplomadas en enfermería M.^ª Fe de Miguel y Estrella Munilla, sin cuya colaboración entusiasta día a día no habría sido posible la realización de este trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- MORADY F, SCHEINMAN M. Transvenous catheter ablation of a posteroseptal pathway in a patient with the Wolff-Parkinson-White syndrome. *N Engl J Med.* 1984; 210: 705-707.
- JACKMAN W M, WANG X, FRIDAY K J, ROMAN C A, MOUNTON K P, BECKMAN K J, et al. Catheter ablation of accessory atrioventricular pathways (Wolff-Parkinson-White syndrome) by radiofrequency current. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1605-1611.
- CALKINS H, LANGBERG J, SOUSA J, EL-ATASSI R, LEON A, KOU W H, et al. Radiofrequency catheter ablation of accessory atrioventricular connections in 250 patients. *Circulation.* 1992; 85: 1337-1346.
- KUCK K, SCHÜLLER M, GEIGER M, SIEBELS J, DUCKE W. Radiofrequency current catheter ablation of accessory atrioventricular pathways. *Lancet.* 1991; 324: 162-168.
- JACKMAN W, FRIDAY K J, FITZGERALD D M, BOWMAN A J, YEUNG-LAI-WAH J A, LAZZARA R. Localization of left free-wall and posteroseptal accessory pathways by direct recording of accessory pathways by direct recording of accessory pathway activation. *PACE.* 1989; 12: 204-214.
- CHEN X, BORGGREFE M, SHENASA M, HAVERKAMP W, HINDRICKS G, BREITHARDT G. Characteristics of Local Electrogram Prediction Successful Transcatheter Radiofrequency Ablation of Left-Sided Accessory Pathways. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 20: 656-665.
- SHENASA M, HINDRICKS G, BORGGREFE M. Value of subthreshold stimulation for the identification of targets sites during radiofrequency catheter ablation of accessory pathways. *Circulation.* 1992; 86 (supl. 1): 722.
- WELLEN H J J, BRUGADA P, FARRÉ J, ROY D, BÄR F W, GORGELS A P, DEN DULK K. Diagnosis and treatment of concealed accessory pathways in patients suffering from paroxysmal AV junctional tachycardia. En: Rosenbaum M, Elizari M V (eds). *Frontiers of cardiac arrhythmias.* The Hague, Martinus Nijhoff, 1983; 773-797.
- CALKINS H, KIM Y N, SCHMALTZ S, SOUSA J, EL-ATASSI R, LEON A, et al. Electrogram Criteria for Identification of Appropriate Target Sites for Radiofrequency Catheter Ablation of Accessory Atrioventricular Connections. *Circulation.* 1992; 85: 565-573.
- CALKINS H, NIKLASON L, SOUSA J, EL-ATASSI R, LANGBERG J, MORADY F. Radiation Exposure During Radiofrequency Catheter Ablation of Accessory Atrioventricular Connections. *Circulation.* 1991; 84: 2376-2382.
- BORGGREFE M, SEIDL K, SHENASA M, HAVERKAMP W, HINDRICKS G, BREITHARDT G. Incidence of atrial fibrillation after successful ablation accessory bypass tracts in the Wolff-Parkinson-White syndrome. *Am J Cardiol.* 1992; 70: 200-204.

Análisis del coste-beneficio de la ablación por radiofrecuencia de las taquicardias paroxísticas supraventriculares en un hospital universitario de Barcelona

Cost-benefit analysis of radiofrequency ablation of paroxysmal supraventricular tachycardias in a university hospital in Barcelona

Unidad de Arritmias
Servicio de Cardiología
Hospital Clínic
Universidad de Barcelona

Josep Brugada, MD
Xavier Navarro, MD
Mariona Matas, RN
Francisco Navarro-López, MD

INTRODUCCIÓN

Las causas más comunes de taquicardia paroxística supraventricular son las taquicardias por reentrada nodal seguidas de las taquicardias supraventriculares mediadas por una vía accesoria aurículo-ventricular (1).

La ablación mediante radiofrecuencia se ha convertido en el tratamiento habitual de los pacientes con taquicardias paroxísticas supraventriculares (TPSV), pero, en la actualidad, no disponemos todavía de información adecuada acerca del impacto sanitario y socio-económico del tratamiento mediante ablación por radiofrecuencia en nuestro país. Sin esta información es difícil llegar a conclusiones para justificar que se fomente activamente, desde los estamentos sanitarios, la ablación como tratamiento de elección en todos estos pacientes.

OBJETIVO

El trabajo tiene como objetivo: a) estudiar el coste-beneficio de la ablación mediante radiofrecuencia de las TPSV y b) valorar el impacto sanitario y socio-económico de la ablación percutánea de las TPSV y determinar la eficacia, los beneficios y la rentabilidad de ésta desde el punto de vista médico, social y económico.

MÉTODOS

Diseño del estudio

Éste es un estudio prospectivo iniciado el 1 de enero de 1993, que incluye a todos aquellos pacientes ingresados en la Unidad de Arritmias del Servicio de Cardiología del Hospital Clínic de Bar-

Correspondencia:
Dr. Josep Brugada
Unidad de Arritmias
Servicio de Cardiología
Hospital Clínic
Villarreal 170, 08036 Barcelona

celona, para estudio, valoración y tratamiento de la TPSV producidas por la presencia de una vía accesoria aurículo-ventricular (AV) o de taquicardias mediadas por una reentrada nodal. Hasta hoy se han estudiado y completado el seguimiento de 100 pacientes consecutivos. En el momento del ingreso al hospital se les practicó un electrocardiograma (ECG), una radiografía de tórax y una analítica de urgencias (hemograma, glicemia, ionograma y creatinina) y se les realizó un cuestionario encaminado a recoger todos los datos relacionados con el impacto sanitario, social y económico de su enfermedad.

Hemos evaluado retrospectivamente el coste sanitario, económico y social de la enfermedad hasta el momento en el que el paciente se incluye al estudio. El cálculo del coste incluye el número de hospitalizaciones previas, la duración de éstas y los exámenes complementarios realizados hasta entonces. Finalmente, se estudia el coste económico de los tratamientos preventivos recibidos y su efectividad clínica.

Estos datos se comparan de forma prospectiva con el coste sanitario, económico y social del tratamiento mediante ablación. Para calcular estos gastos se consideramos el día del ingreso en nuestro hospital para ablación de la TPSV como fecha de inclusión. Se incluye el coste del procedimiento teniendo en cuenta la tasa de efectividad, las posibles complicaciones, los tratamientos alternativos en caso de fracaso del tratamiento, los exámenes complementarios, seguimiento clínico (un año), hospitalizaciones y tratamientos, si son necesarios.

Con este diseño, cada paciente será su propio control.

Estudio electrofisiológico

Todos los pacientes han sido sometidos a un estudio electrofisiológico diagnóstico tras dar su consentimiento por escrito. El estudio se realizó tras suspender los fármacos antiarrítmicos por un período equivalente a cinco veces su vida media. Se insertó un catéter cuadripolar 6F y uno bipolar 5F en la vena femoral y se posicionó en la aurícula derecha alta o en el ventrículo, según las necesidades de estimulación, y a lo largo del anillo tricuspídeo para la medición del electrocardiograma de His. Se realizó una estimulación programada auricular y ventricular mediante un sistema de medición y estimulación electrofisiológica acoplado a un ordenador (PC-EMS del «Cardiovascular Research Institute of Maastricht, Holanda, conectado

a un ordenador PC a 50 Mhz, con 8 Mb de RAM y 250 Mb de disco duro, una pantalla de alta resolución NEC 6FG de 21" y una impresora láser HP III). Se utilizaron técnicas estándar para evidenciar la presencia de la vía accesoria (VA) aurículo-ventricular y para confirmar su participación en el mecanismo de circuito de la taquicardia (2, 3), así como la presencia de doble vía nodal y de la taquicardia por reentrada nodal (2, 3). Mediante la pantalla y el equipo de registro en papel continuo (Mingograph) obtenemos una visión o impresión continua de los registros intracardíacos y del ECG, así como una grabación en tiempo real mediante el disco duro y el equipo informático.

Procedimiento de ablación

Después de complementar la parte diagnóstica del estudio electrofisiológico, se realizó la ablación mediante radiofrecuencia de la vía accesoria o del circuito de reentrada de la TRN (vía lenta o vía rápida) durante la misma sesión (4-6). La ablación mediante radiofrecuencia se realizó utilizando un catéter 8F (Ablatr, Mariner; Medtronic Cardiorhythm) introducido a través de la vena femoral hasta el anillo tricuspídeo, en las VA derechas o en las TRN y por la arteria femoral hasta el anillo mitral, en las VA izquierdas. Se realizó un mapeo previo en caso de las VA localizando el lugar de inserción. Realizada la ablación se comprobó la efectividad de la misma mediante la estimulación programada auricular y ventricular, y en caso de las TRN tras la administración de Isoproterenol (2 µgr/min). Se utilizó la desaparición de la onda delta en aquellos pacientes con preexcitación manifiesta por la VA como criterio de éxito de la ablación. En las TRN se utilizó como criterios de éxito de la ablación, la no inducción de la taquicardia y la no aparición de ecos nodales, ni en condiciones basales ni tras la administración de Isoproterenol. Para comprobar la efectividad a corto plazo del método, se realizó un Holter de 24 horas a aquellos pacientes con VA de conducción intermitentes u ocultas y a las TRN. A todos los pacientes se les realizó un ECG al ingreso al hospital y otro al alta.

Para comprobar la efectividad del método a largo plazo, se realizó el seguimiento al mes, a los tres meses y al año mediante la interrogación clínica y el ECG, además de las pruebas complementarias necesarias. Si pasado un año no hay recurrencias clínicas o electrocardiográficas, son dados de alta definitivamente.

Gastos de la ablación

Se revisaron todos los gastos hospitalarios y profesionales derivados del procedimiento. Se han incluido todos aquellos gastos relacionados con el tratamiento de las taquicardias durante el ingreso (ECG, analíticas, radiografías, ecocardiografías, medicación y estudio electrofisiológico), además se han incluido los gastos generados por el seguimiento para el control a largo plazo de la eficacia del método de la ablación (ECG, visitas médicas, posibles tratamientos y pruebas complementarias).

Gastos previos a la ablación

Mediante un cuestionario dirigido, se recogieron los datos para valorar los gastos realizados en el sistema sanitario por cada paciente, desde el inicio de su sintomatología, derivada de las manifestaciones producidas por sus TPSV, hasta el día de inclusión al protocolo. Se incluyeron todos aquellos gastos referentes a visitas a urgencias, ingresos hospitalarios, pruebas complementarias realizadas (ECG, Holter de 24 horas, ecografías, pruebas de esfuerzo, cateterismos, estudios electrofisiológicos), visitas de control con el cardiólogo o con el médico de cabecera y tratamiento realizados.

Los gastos totales estimados por hospitalizaciones y pruebas complementarias se calcularon según las tarifas del Hospital Clínic de Barcelona del año 1993, y los de los fármacos antiarrítmicos utilizados, según el precio del mercado recogido en el Vademecum Internacional de 1993.

RESULTADOS

Características de los pacientes

Las características clínicas de la muestra (100 pacientes) se resumen en la Tabla I. La media de edad fue de $41,3 \pm 15,6$ años (11-82), 44 hombres y 56 mujeres. La duración media de los síntomas era de $16,5 \pm 15,4$ (0-68). Había diferencias entre la media de edad del grupo de VA y de TRN ($38,4 \pm 12,6$ años vs $45,8 \pm 18,6$ años; $p < 0,05$) y en el número de años transcurridos desde el diagnóstico de la enfermedad hasta la realización de la ablación entre ambos grupos ($9,9 \pm 12,4$ años vs $3,6 \pm 5,4$ años; $p < 0,001$).

De los 61 pacientes con VA, 8 tenían dos VA. La distribución anatómica de las VA fue la siguiente: 29 izquierdas (42%), 2 derechas (3%), 18 septales (26%), 8 anteriores (11%) y 12 parahisianas (17%).

Eficacia de la ablación

La ablación mediante radiofrecuencia se consiguió en 90 de los 100 pacientes (90%) en la primera sesión, 8 en dos sesiones (8%) (5 VA y 3 TRN) y 2 (VA) están pendientes de que se programe un nuevo estudio (2%), pero se mantienen asintomáticos bajo tratamiento farmacológico. Por tanto, la eficacia final del procedimiento de la ablación en nuestro hospital es del 98% hasta el día de hoy (96,7% VA y 100% TRN). Un paciente con TRN tuvo una complicación del procedimiento de ablación (1%), se realizó un bloqueo del nodo aurí-

Tabla I. Características clínicas de los 100 pacientes

	VA	TRN
Número	61	39
Edad (años)	$38,4 \pm 12,6$ (16-67)	$45,8 \pm 18,6$ (11-82)*
Sexo	36 M/25 H	8 M/31 H
Edad de inicio síntomas (años)	$22,2 \pm 13,4$ (3-61)	$29,1 \pm 20$ (3-82)
Duración síntomas (años)	$16,4 \pm 15,0$ (0-60)	$16,8 \pm 16,3$ (0-68)
Frecuencia de los síntomas (episodios/año)	$21,5 \pm 69,1$ (0-365)	$23,8 \pm 61,8$ (1-360)
Duración de los episodios (min)	$113,4 \pm 275,8$ (1-1.800)	$86,1 \pm 129,7$ (1-720)
Número de años desde el diagnóstico a la RF	$9,9 \pm 12,4$ (0-50)	$3,6 \pm 5,4$ (0-18)**
Número de fármacos antiarrítmicos	$1,5 \pm 1,2$ (0-5)	$2,0 \pm 1,8$ (0-8)
Años con tratamiento farmacológico	$5,1 \pm 8,3$ (0-39)	$3,7 \pm 5,8$ (0-30)

Los datos se expresan como media \pm SD (rango). * $p < 0,05$; ** $p < 0,001$.

culo-ventricular al abordar dicha TRN por la vía rápida, el paciente requirió un marcapasos permanente.

Gastos

Los datos del gasto hospitalario, honorarios, gastos del procedimiento de ablación y gastos totales se muestran en la Tabla II. La media de los gastos de la ablación es de 522.250 ± 179.424 pts., que incluye los gastos de estancia hospitalaria, pruebas complementarias, seguimientos y fármacos 190.375 ± 80.900 más los gastos del pro-

Tabla II. Gastos de la ablación. Los datos se expresan en pesetas

	Media (pts.)	SD (pts.)
Estancia hospitalaria (3,1 \pm 1,5 días)	102.125	60.011
Pruebas complementarias	48.125	29.432
Seguimiento	39.000	29.432
Fármacos	1.125	5.283
Subtotal	190.375	
Honorarios (60% del tiempo)	136.750	
Catéteres de diagnóstico (0,28 cat/abl/pac)	27.500	
Catéteres de ablación (0,41 cat/abl/pac)	67.250	
Material desechable	37.500	
Subtotal procedimiento de ablación	331.875	
Gastos totales ablación	522.250	

Tabla III. Gastos antes de la ablación. Los datos se expresan en pesetas

		Media (pts.)	SD (pts.)
Ingresos hospitalarios	1,1 \pm 3 (0-20)		
Estancia en el hospital	5 \pm 11 (0-100) días	248.270	420.846
Urgencias	6,2 \pm 8,3 (0-43)		
Pruebas complementarias		229.704	270.000
Visitas médicas		204.045	442.054
Fármacos	1,7 \pm 1,5 (0-8) 4,6 \pm 7,4 (0-39) años	75.296	208.023
Total gastos antes de la ablación		757.315	968.017

cedimiento de ablación en sí 331.875 ± 100.000 . La media de la estancia hospitalaria para todos los pacientes fue de $3,1 \pm 1,5$ (rango 2-10).

Gastos previos a la ablación

El número de ingresos hospitalarios, visitas a urgencias, visitas médicas, número y duración de los tratamientos farmacológicos y su coste asociado se muestra en la Tabla III. Los gastos medios totales previos a la ablación son de 757.315 ± 968.017 . La duración media de los síntomas es de $16,5 \pm 15,4$ años (0-68).

Seguimiento

Los pacientes han sido seguidos al mes, tres meses y al año desde la ablación, para evaluar la eficacia a largo plazo del procedimiento. El seguimiento medio hasta hoy es de $19,2 \pm 4,5$ (11-27) meses. Sólo dos pacientes (2%) están pendientes en estos momentos de que se programe un nuevo estudio, pero se mantienen asintomáticos bajo tratamiento farmacológico.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio indican que los gastos sanitarios ocasionados por pacientes con TPSV son elevados, como un promedio estimado en los últimos años de 522.250 pts. Se han realizado, en otros países, varios estudios (7-12) analizando el coste de la ablación mediante radiofrecuencia de las TPSV, e incluso comparándola con la cirugía.

Tabla IV. Estudios previos realizados del coste de la ablación. Datos en US\$

	Media	DE
Buitler et al. 1990 (11 pac VA)	14.116	4.493
Buitler et al. 1991 (25 pac VA)	14.919	6.740
Kalbfleisch et al. 1992 (15 pac VA)	15.893	3.338
Kalbfleisch et al. 1993 (30 pac VA)	10.183	1.082
Ching Man et al. 1993 (40 pac TRN)	10.547	1.062
Christopher et al. 1994 (10 pac TRN)	12.149	2.518
Navarro et al. (1994) (61 pac VA + 39 TRN)	6.57	4.179

Tabla V. Resultados comparativos de los costes previos a la ablación y de la ablación

	Pre-ablación (pts.)	Ablación (pts.)
Estancia hospitalaria	248.270*	102.125
Pruebas complementarias	229.704*	48.125
Visitas médicas	204.045*	39.000
Fármacos	75.296*	1.125
Procedimiento		331.875
Gastos totales	757.315**	522.250

Los estudios previos realizados por otros autores muestran cifras mucho mayores (ver Tabla IV). Hemos de tener en cuenta que dichos estudios han sido realizados en países donde el sistema sanitario es diferente al nuestro, y por tanto las cifras no pueden tomarse como referencia en España, aunque muestran también la reducción que significa la ablación sobre el coste sanitario.

La ablación no sólo es un método eficaz como tratamiento curativo sino que resulta en una enorme reducción de los gastos sanitarios a largo plazo. Los gastos de la ablación han sido significativamente menores que los gastos antes de la ablación en cuanto a estancia hospitalaria, pruebas complementarias, visitas médicas y fármacos ($p < 0,001$) (ver Tabla V), y a pesar del aumento del procedimiento de la ablación en 331.875 pts., la diferencia entre los gastos totales previos a la ablación y los costes totales de la ablación sigue siendo estadísticamente significativa ($p < 0,05$).

Si comparamos los gastos acumulados con el número de años con TPSV, observamos (Figura 1) que los pacientes con VA alcanzan los gastos de la ablación en 12,5 años y los pacientes con TRN en 9,5 años.

La referencia precoz para ablación de los pacientes con TPSV disminuirá drásticamente los gastos totales de la enfermedad.

BIBLIOGRAFÍA

1. WU D, DENES P, AMAT-Y-LEON F, et al. Clinical, electrocardiographic and electrophysiologic observations in patients with paroxysmal supraventricular tachycardia. *Am J Cardiol.* 1978; 41: 1045-1051.
2. JOSEPHSON M E, SEIDES S F. *Clinical Cardiac Electrophysiology. Techniques and Interpretations.* Philadelphia: Lea & Febiger, 1979; 147-190, 211-245.
3. EVALUACIÓN ELECTROFISIOLÓGICA DE LAS ARRITMIAS. Clínicas Cardiológicas de Norteamérica, 1986; vol. 3.
4. HUGH CALKINS J S, EL-ATASSI R, ROSENHECK S, DE BUITLER M, H KOU W, KADISH A H, LANGBERG J J, MORADY F. Diagnosis and Cure of the Wolff-Parkinson-White Syndrome or Paroxysmal Supraventricular Tachycardias During a Single Electrophysiologic Test. *N Engl J Med.* 324: 1612-1618.
5. WARREN M JACKMAN, XUNZHANG WANG, KAREN J FRIDAY, CARLOS A ROMÁN, KRIEGER P MOULTON, KAREN J BECKMAN, JAMES H McCLELLAND, NICHOLAS TWINDALE, ANDREW HAZLITT, MICHAEL I PRIOR, P DAVID MARGOLIS, JAMES D CALAME, EDWARD D OVERHOLT, RALPH LAZZARA. Catheter Ablation of Accessory Atrioventricular Pathways (Wolf-Parkinson-White Syndrome) by Radiofrequency Current. *N Engl J Med.* 1991; 324: 1605-1611.

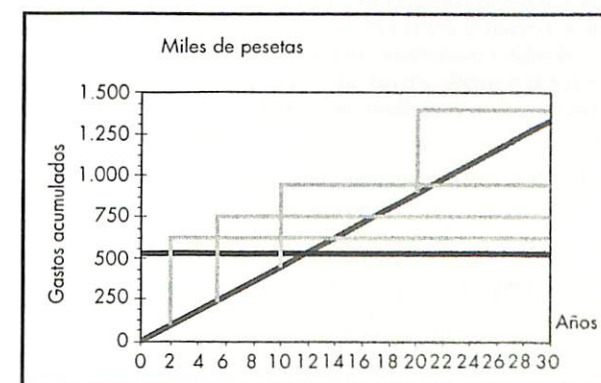


Figura 1. Comparamos los gastos acumulados totales (negro) en función de los años con TPSV. Además se muestran los gastos acumulados en pacientes ablacionados a los 2, 5 y 10 años (gris claro) desde el inicio de los síntomas. Aunque la ablación incrementa súbitamente los gastos acumulados por cada paciente, la curación prevendrá nuevos gastos.

6. WARREN M JACKMAN, KAREN J BECKMAN, JAMES H McCLELLAND, XUNZHANG WANG, KAREN KI FRIDAY, CARLOS A ROMÁN, KRIEGH P MOULTON, NICHOLAS TWIDALE, H ANDREW HAZLITT, MICHAEL I PRIOR, JESS OREN, EDWARD D OVERHOLT, RALPH LAZZARA. Treatment of supraventricular Tachycardia due to Atrioventricular Nodal Reentry by Radiofrequency Catheter Ablation of Slow-Pathway Conduction. *N Engl J Med.* 1992; 327: 313-318.
7. MICHAEL DE BUITLEIR, EDWARD L BOVE, STEPHEN SCHAMALTZ, ALAN H KADISH, FRED MORADY. Cost of Catheter Versus Surgical Ablation in the Wolf-Parkinson-White Syndrome. *Am J Cardiol.* 1990; 66: 189-192.
8. MICHAEL DE BUITLER, JOAO SOUSA, STEVEN F BOLLING, RAFAEL EL-ATASSI, HUGH CALKINS, JONATHAN J LANBERG, WILLIAM H KOU, FRED MORADY. Reduction in Medical Care Cost Associated with Radiofrequency Catheter Ablation of Accessory Pathways. *Am J Cardiol.* 1991; 68: 1656-1661.
9. STEVEN J KALBFLEISCH, HUGH CALCKINS, JONATHAN J LANGBERG, RAFAEL EL-ATASSI, ÁNGEL

- LEÓN, MARK BORGANELLI, FRED MORADY. Comparison of the Cost Radiofrequency Catheter Modification of The Atrioventricular Node and Medical Therapy for Drug-Refractory Atrioventricular Node Reentrant Tachycardia. *J Am Coll Cardiol.* 1992; 19: 1583-1587.
10. STEVEN J KALBFLEISCH, RAFAEL EL-ATASSI, HUGH CALKINS, JONATHAN J LANBERG, FRED MORADY. Safety, Feasibility and Cost of Outpatients Radiofrequency Catheter Ablation of Accessory Atrioventricular Connections. *J Am Coll Cardiol.* 1993; 21: 567-570.
11. CHING MAN K, J KALBFLEISCH S, D HUMMELM J, D WILLIAMSON B, R VORPERAIN V, STRICKBERGEN S A, J LANBERG J, MORADY F. Safety and Cost of Outpatients Radiofrequency Ablation of the Slow Pathway in Patients with Atrioventricular Nodal Reentrant Tachycardia. *Am J Cardiol.* 1993; 72: 1323-1324.
12. CHRISTOPHER L CASE MD, PAUL C GILLETTE MD, FRED A CAWFORD MD, BARBARA J KNCK LPN. Comparison on Medical Care Cost Between Successful Radiofrequency Catheter Ablation and Surgical Ablation of Accessory Pathways in the Pediatric Age Group. *Am J Cardiol.* 1994; 73: 600-601.

Efecto de la inhibición de la síntesis de isoprenoides sobre el ciclo celular de células musculares lisas

Effect of isoprenoid synthesis inhibition on cellular cycle of smooth muscle cells

Centre d'Investigació Cardiovascular
CSIC-Hospital Sant Pau, UAB, Barcelona
Càtedra Recerca Cardiovascular Catalana-Occidente

José Martínez-González ¹
Odabella Varela ²
Lina Badimon ³

RESUMEN

En este trabajo se estudió el papel del mevalonato y sus derivados (isoprenoides) en el control de la proliferación celular. Para ello se examinó el efecto de un inhibidor de la HMG-CoA reductasa (Lovastatina) sobre la síntesis de DNA y la expresión de *c-fos* en células musculares lisas humanas de arteria pulmonar *in vitro*. La lovastatina disminuye el índice de proliferación de las células musculares lisas humanas. La inhibición de la proliferación celular, evaluada como síntesis de DNA, fue dosis dependiente con un valor IC₅₀ de 11 µM. La inhibición fue revertida totalmente mediante la adición de mevalonato 500 µM. La respuesta de *c-fos* a los factores de crecimiento séricos no se vio afectada por el tratamiento con lovastatina a una concentración (25 µM) que bloquea el 80% de la síntesis de DNA. Estos resultados sugieren que en células quiescentes, tratadas con lovastatina, la exposición a factores de crecimiento inhibe la entrada de la célula en fase S, pero no parece afectar a la inducción temprana de genes como *c-fos* implicados en la respuesta a estímulos mitogénicos.

Palabras clave: Células musculares lisas, inhibidores de la HMG-CoA reductasa, isoprenoides, ciclo celular.

Martínez-González J, Varela O, Badimon L
Efecto de la inhibición de la síntesis de isoprenoides sobre el ciclo celular de células musculares lisas
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 37-43

Correspondencia:
Prof. Lina Badimon
Dept. Patología Molecular y Terapéutica
CID (CSIC)
Jordi Girona, 18-26 Lab. 624
08034 Barcelona

ABSTRACT

The role of mevalonate and its products (isoprenoids) in the control of cellular proliferation was examined by investigating the effect of a HMG-CoA reductase inhibitor (Lovastatin) on DNA synthesis and *c-fos* expression of cultured smooth muscle cells (SMC) from human pulmonary artery. Lovastatin decreased the growth rate of human SMC. The inhibition of cell growth, evaluated as DNA synthesis, was dose-dependent with IC₅₀ 11 µM. The inhibition of cell growth was completely prevented by addition of 500 µM mevalonate. *c-fos* signaling response to serum growth factors was not affected by 25 µM lovastatin treatment. This lovastatin concentration block 80% of cell proliferation. These results suggest that in quiescent cells lovastatin treatment block the entrance of cells in S phase induced by growth factors. However, it does not seem to affect expression of early induction genes such as *c-fos*, implicated in signaling response to mitogens.

Key words: Smooth muscle cells; HMG-CoA reductase inhibitors, isoprenoids, cell cycle.

Martínez-González J, Varela O, Badimon L
Effect of isoprenoid synthesis inhibition on cellular cycle of smooth muscle cells
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 37-43

¹ Investigador Institut de Recerca de l'Hospital de la Sta. Creu i San Pau, Barcelona.
² Becaria Predoctoral del Fondo de Investigaciones Sanitarias de la Seguridad Social
³ Director Centre d'Investigació Cardiovascular, CSIC-Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau de Barcelona

INTRODUCCIÓN

Los inhibidores de la HMG-CoA reductasa (estatinas) son agentes hipolipemiantes de gran eficacia y tolerancia. Estos fármacos reducen los niveles plasmáticos de lipoproteínas de baja densidad (LDL) e incrementan ligeramente las lipoproteínas de alta densidad (HDL) (1-3). Recientemente, estudios clínicos han puesto de manifiesto que el tratamiento crónico con inhibidores de la HMG-CoA reductasa favorece la regresión y reduce la progresión de la aterosclerosis coronaria (4).

La HMG-CoA reductasa cataliza la formación de mevalonato que es el principal punto de regulación de la ruta de síntesis de isoprenoides (5). Numerosas moléculas como el colesterol, dolicol, ubiquinona, hemo A, proteínas isopreniladas y otros productos esenciales para las células incorporan grupos isoprenoides en su estructura (5). En células humanas de la línea T24, aisladas de un carcinoma de vejiga, se ha comprobado que la inhibición de la actividad HMG-CoA reductasa con compuestos como las estatinas causa el bloqueo del ciclo celular en G₁ (6). Este bloqueo no es superado si se adiciona colesterol, dolicol o ubiquinona exógenos. Además, dado que la viabilidad celular no se ve afectada, no parece deberse a una depleción de hemo A (7). De todas las proteínas que incorporan grupos isoprenoides post-traduccionamente, al menos dos grupos, las proteínas *ras* y la subunidad γ de las proteínas G, están implicadas en la transducción de señales (8, 9). Es conocido que p21^{ras} y la subunidad γ de las proteínas G para ser activas necesitan asociarse a la membrana plasmática a través de cadenas de isoprenoides. Por tanto, la proliferación celular requiere al menos dos tipos de productos derivados del mevalonato, uno de ellos es el colesterol, esterol presente en todas las membranas de las células animales, y el otro las proteínas isopreniladas que participan en los mecanismos de transducción de señales que controlan el crecimiento celular (10).

En este estudio evaluamos el efecto que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa ejercen sobre la proliferación *in vitro* de células musculares lisas humanas, y su vinculación con el bloqueo de los mecanismos moleculares implicados en la proliferación celular. Para determinar si el tratamiento con estatinas afecta a la transducción de señales desencadenadas por mitógenos se evaluaron los niveles de *c-fos* en respuesta a factores de crecimiento. Los resultados indican que los inhibidores de la HMG-CoA reductasa inhiben la proliferación celular inducida por mitógenos séricos de

forma dosis dependiente. Sin embargo, en las mismas condiciones de cultivo, no parecen ejercer efecto significativo sobre la expresión de genes de inducción temprana como *c-fos*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Lovastatina

La lovastatina fue suministrada por Merck Sharp & Dohme de España S.A. La forma activa de la lovastatina se preparó a partir de la lactona (forma inactiva). Una solución etanólica de la lactona fue calentada a 50 °C durante 2 horas, posteriormente fue diluida con agua y se ajustó el pH con ácido clorhídrico. La solución acuosa fue distribuida en alícuotas y congelada a -20 °C.

Cultivos celulares

Se aislaron células musculares lisas vasculares (CMLV) a partir de fragmentos de arteria pulmonar humana procedentes de corazones transplantados. Se eliminó la capa grasa y el tejido conjuntivo adherido. La adventicia fue extirpada cuidadosamente y la superficie interior del vaso fue raspada para eliminar las células endoteliales. Después de haber seccionado la capa media en pequeños pedazos de 1 mm, las CMLV se obtuvieron mediante el método de explantación (11, 12). Las células fueron cultivadas en medio 199 (M199) suplementado con 5% de suero de feto de ternera (FCS), 5% de suero humano, 2 mM L-glutamina, penicilina G (75 U/ml), estreptomycin (50 µg/ml) y Fungizone (GIBCO) (2,5 µg/ml), a 37 °C en atmósfera de CO₂ (5%). Después de 2-3 semanas las células comenzaron a migrar de los explantes y cuando alcanzaron la confluencia fueron subcultivadas en el mismo medio. En los experimentos se utilizaron células en subcultivo entre los pasajes (3-7).

Las CMLV fueron caracterizadas inmunológicamente mediante inmunofluorescencia indirecta (13). Se utilizaron anticuerpos monoclonales de ratón anti-alfa actina humana (marcador de células musculares) (Dako A/S) y anti-factor de von Willebrand humano (marcador de células endoteliales) (Dako A/S) y anti-proteína de superficie de fibroblastos humanos (marcador de fibroblastos). Como anticuerpo secundario se utilizó un anticuerpo de cabra anti-IG de ratón marcado con fluoresceína (Dako A/S).

La viabilidad celular fue valorada mediante el test de exclusión de azul de tripano y conteo en cámara de Neubauer.

Este estudio se ha realizado con la aprobación del Comité de Ética del Centro y en concordancia con los principios de la declaración de Helsinki (1975, 1983).

Determinación de la síntesis de DNA

La proliferación celular se analizó a través de la síntesis *de novo* de DNA a partir de timidina tritiada. Este tipo de experimentos se efectuó en placas de 24 pocillos (Falcon). Las células, sembradas a razón de 50.000/ml, se cultivaron durante 48 horas y posteriormente se indujo quiescencia incubándolas 48 horas más en un medio con 0,4% de FCS. Finalmente, las células sincronizadas fueron estimuladas con 10% FCS en presencia de 0,5 µCi de [6-³H] timidina (27 Ci/mmol, Amersham) por ml, y de concentraciones variables de lovastatina. El tiempo de captación de timidina fue de 24 horas.

Las monocapas de células fueron lavadas con tampón fosfato salino, fijadas con metanol 95%, y por último tratadas con ácido tricloroacético al 10%. El residuo de las placas se disolvió con NaOH (0,3 N) y se determinó la radioactividad de una alícuota mediante un contador (LKB Rack-beta 1217) utilizando como líquido de centelleo OptiPhase «HiSafe» II (LKB).

La [³H]timidina incorporada al DNA se normalizó por la cantidad de proteína (dpm/mg de proteína) determinada por el método de Bradford (14). La actividad antiproliferativa de los inhibidores se expresó como el tanto por ciento de incorporación de timidina respecto a los controles.

Preparación y análisis de RNA

La preparación de RNA total de CMLV se realizó utilizando como solución de extracción UltraspecTM (Biotecx), solución tampón que contiene una mezcla de agentes desnaturizantes que inactivan las RNAsas. Las muestras de RNA fueron cuantificadas determinando la absorbancia a 260 nm, y posteriormente fueron analizadas mediante la técnica de «Northern blot» (15). El RNA fue fraccionado en geles de agarosa desnaturizantes (200 mM MOPS, pH 7,4 1 mM EDTA y 3% de formaldehído). Por último, se transfirió por capilaridad a filtros de nylon NitranTM (Schleider & Schuell) y se fijó mediante irradiación con luz UV (16). A continuación los filtros fueron prehibridados, e hibridados con la sonda marcada radioactivamente (15). Como sonda se utilizó el CDNA del protooncogen *c-fos* de rata (17). El marcaje de la sonda se efectuó con [α -³²P]dATP (3.000 Ci/mmol,

Amersham) mediante «Random Primer DNA Labeling Kit» (Boehringer Mannheim). Posteriormente, la sonda marcada se separó de los nucleótidos no incorporados mediante gel filtración en columnas de Sephadex G-50 (NickTM columns, Pharmacia). Por último, los filtros se expusieron a placas autorradiográficas tipo Agfa Curix RP2 a -80 °C con pantallas intensificadoras (Du Pont-NEN Cronex). La intensidad de las señales obtenidas en las autorradiografías fue cuantificada mediante un densitómetro (Molecular Dynamics Computing Densitometer).

Análisis estadísticos

Los resultados fueron analizados mediante el análisis de la varianza (ANOVA). Los resultados se expresan normalmente como el valor medio \pm SEM (error estándar de la media).

RESULTADOS

Las CMLV aisladas por el procedimiento de explantes fueron caracterizadas mediante inmunofluorescencia indirecta. Se consiguió un monocultivo de células que únicamente eran reconocidas por anticuerpos específicos contra α -actina muscular (Figura 1). Los marcajes para discriminar fibroblastos o células endoteliales fueron negativos. Por lo tanto, se trataba de exclusivamente de células musculares lisas, sin contaminación por otras células vasculares.

El efecto de la lovastatina sobre la proliferación de las CMLV se determinó en células quiescentes a las que se adicionó concentraciones crecientes de lovastatina durante 24 horas. Con el rango de concentraciones de lovastatina utilizadas en estos experimentos (2 a 50 µM) no se vió afectada la viabilidad celular. Además, como se observa en la Figura 2 fenotípicamente las células no sufren alteración al ser cultivadas con estas concentraciones de lovastatina.

La lovastatina suprime la proliferación de las células musculares lisas, estimada mediante la síntesis *de novo* de DNA, en experimentos de captación de timidina tritiada (Figura 3). El efecto inhibitorio se observó a concentraciones superiores a 2 µM LOV y fue concentración dependiente. La concentración de 25 µM, sin causar muerte celular significativa, produjo un bloqueo casi completo de la proliferación celular (80%) inducida por adición de 10% de FCS. A concentraciones superiores a 50 µM la lovastatina fue claramente citotóxica. El valor IC₅₀ para la lovastatina fue de 11

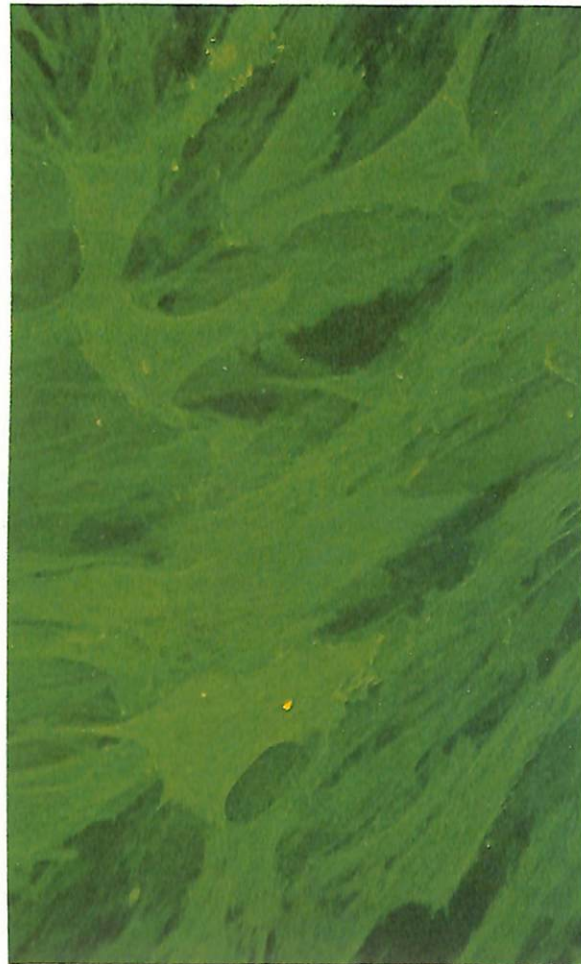


Figura 1. Microfotografía de células musculares lisas de arteria pulmonar humana teñidas por inmunofluorescencia con anticuerpos anti-alfa actina. Las células fueron sembradas en cámaras de poliestireno tipo Chamber Slide™ (Nunc) y posteriormente teñidas mediante inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos anti-alfa actina humana.

μM cuando las células se estimulaban con 10% de FCS. La inhibición fue revertida totalmente mediante la adición de mevalonato, a una concentración final de 500 μM , conjuntamente con el inhibidor (Figura 4).

Para determinar si la lovastatina afecta a los mecanismos de transducción de señales que promueven la proliferación de las CMLV, utilizamos como marcador de la eficacia de dichos mecanismos los niveles de expresión de pro-oncogen nuclear *c-fos*.

Primeramente, para precisar el momento de máxima expresión de *c-fos* en las CMLV, determinamos como incrementan en el tiempo sus niveles de mRNA cuando CMLV quiescentes se estimulan con suero humano. Como se observa en la Figura 5 la expresión de este gen de inducción temprana aumentó de forma prácticamente inmediata después de la estimulación con suero y

alcanza el máximo a los 30 minutos. Al cabo de 2 horas el nivel de expresión recupera el valor basal, prácticamente indetectable por esta técnica. En los experimentos de inducción de *c-fos* las monocapas de células fueron procesadas para la obtención de RNA 30 minutos después de la adición de los mitógenos sobre los cultivos quiescentes. La concentración de lovastatina utilizada fue de 25 μM y las células fueron cultivadas de igual modo que en los experimentos precedentes de proliferación. En la Figura 6 se recoge el resultado de cuantificar mediante densitometría la intensidad de las bandas de hibridación de *c-fos* obtenidas en las autorradiografías de los experimentos de «Northern blot». En dicha Figura se observa que la expresión de *c-fos* en las células tratadas con lovastatina no sufrió una modificación significativa respecto a los controles (células no tratadas con inhibidor o tratadas simultáneamente con el inhibidor y mevalonato).

DISCUSIÓN

Nuestros datos sugieren que las CMLV tratadas con lovastatina se vuelven refractarias al estímulo con factores de crecimiento, de modo que no se produce la respuesta proliferativa que éstos normalmente desencadenan. Es importante destacar que las concentraciones con las cuales se consigue bloqueo casi completo de la proliferación son muy superiores (aproximadamente en 2 órdenes de magnitud) a las utilizadas habitualmente en la terapia antihipercolesterolémica. No tenemos evidencia que las poblaciones celulares tratadas con el inhibidor sufriesen crecimiento descompensado, que caracterizan a la mayoría de drogas antitumorales que inducen quiescencia profunda (18). El bloqueo de la proliferación es el resultado de un efecto específico del inhibidor en la síntesis de algún derivado del mevalonato necesario para la progresión normal a través del ciclo celular.

El papel del mevalonato en el ciclo celular ha sido tradicionalmente discutido en el contexto de la supresión de la síntesis de colesterol. Sin embargo, la mayoría de las células utilizan colesterol exógeno del suero (5). Además, diversos estudios anteriores han demostrado que productos finales de la vía como el colesterol, el dolicol o la ubiquinona no parecen ser los responsables del efecto citostático de estos fármacos (7). En estudios más recientes algunos autores han considerado las proteínas isopreniladas como las moléculas a través de las cuales la vía de síntesis de isoprenoides estaría directamente implicada en el ciclo celular. Las

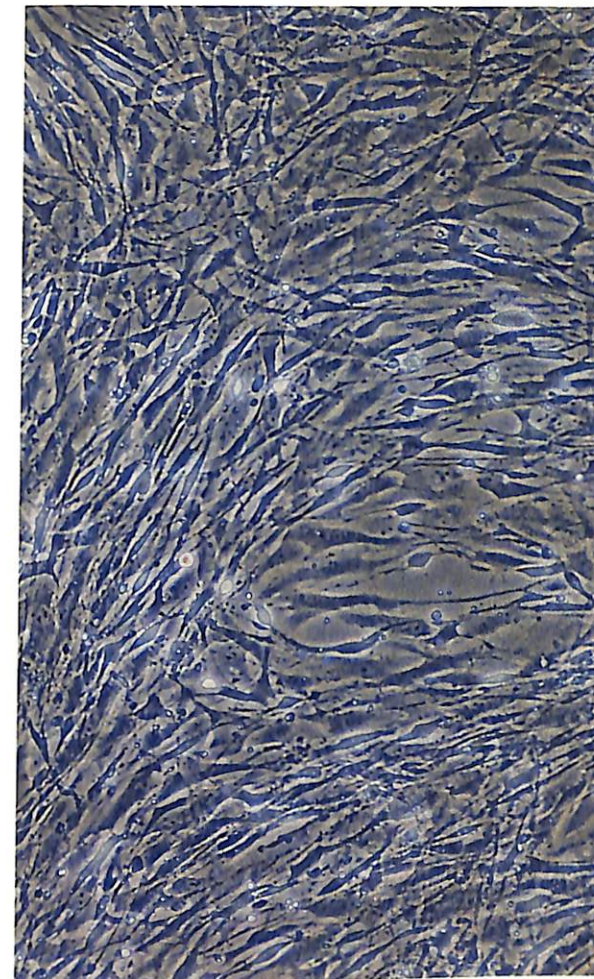


Figura 2. Microfotografía de contraste de fases de células musculares lisas de arteria pulmonar humana. Las células quiescentes fueron tratadas con 25 μM lovastatina durante 24 horas (A) o sin tratamiento alguno (B).



proteínas isopreniladas para ser activas necesitan anclarse a la membrana, donde participan en los mecanismos de transducción de señales, mediante cadenas de 15 o 20 carbonos (grupos farnesilo o geranilo) (19, 20). Por tanto, estas proteínas serían los candidatos más probables que se verían afectados por una pérdida de actividad biosintética de la vía de síntesis del mevalonato (10).

Para poner de manifiesto la conexión entre bloqueo del ciclo celular por los inhibidores de la HMG-CoA reductasa y la isoprenilación de estas proteínas evaluamos el efecto de los inhibidores sobre los niveles de mRNA de *c-fos*. Esta respuesta es claramente el resultado de la transducción de señal de la membrana plasmática al núcleo. Además, *c-fos* es necesario para la progresión a través del ciclo celular (21) lo que lo convierte en un buen índice de la eficiencia de los mecanismos de transducción de señales. Los resultados obtenidos indican que la lovastatina inhibe la entrada de

la célula en fase S (fase de síntesis de DNA), pero no parece afectar a la inducción temprana de genes como *c-fos* implicados en la respuesta a estímulos mitogénicos. En otros tipos celulares que proliferan más activamente que las CMLV se ha puesto de manifiesto cierto efecto de los inhibidores de la HMG-CoA reductasa sobre los niveles de *c-fos* inducidos por determinados factores de crecimiento (22). Los resultados obtenidos en este estudio no descartan la posibilidad de que los mecanismos de transducción de señales activados por estos factores de crecimiento en las CMLV, sean más susceptibles de ser interferidos por los inhibidores de la HMG-CoA reductasa en otras condiciones de cultivo en que las células proliferan más activamente. Las concentraciones de lovastatina necesarias para bloquear la proliferación de las CMLV son muy superiores a las alcanzadas en plasma cuando es utilizada como fármaco hipocolesterolémico. Ello podría explicar el fracaso

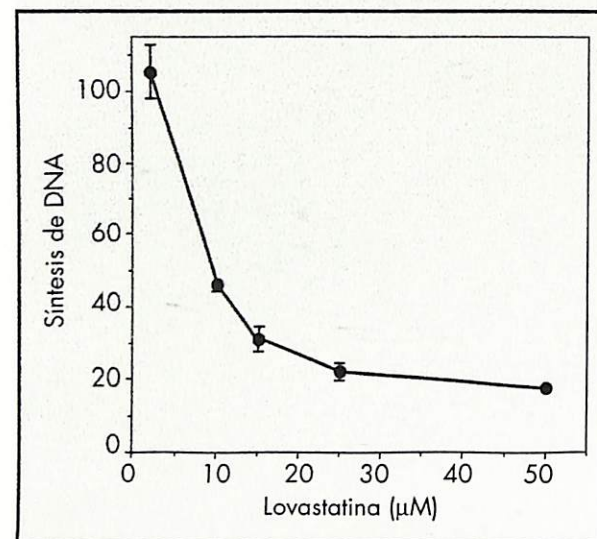


Figura 3. Efecto de concentraciones crecientes de lovastatina en la síntesis de DNA de células musculares lisas de arteria pulmonar humana. Se representa el porcentaje de incorporación de timidina tritiada en células tratadas con concentraciones crecientes de lovastatina respecto a células control (sin tratamiento con el inhibidor). Los resultados fueron corregidos según el contenido de proteína celular y se expresan como la media \pm el error estándar de la media de duplicados procedentes de tres experimentos independientes. Las condiciones experimentales se detallan en Materiales y Métodos.

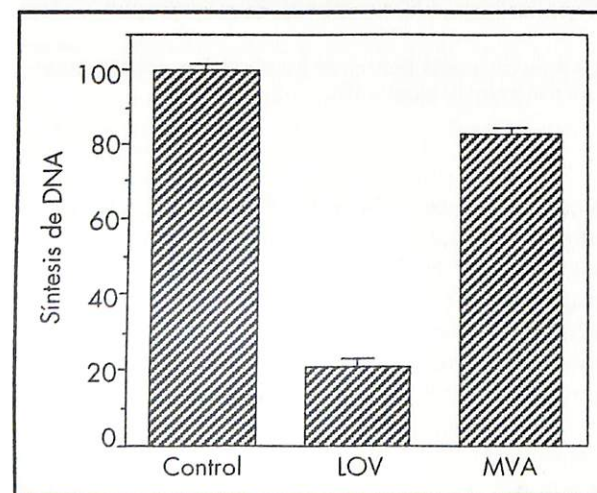


Figura 4. Reversión por mevalonato de la inhibición de la proliferación por lovastatina. Las células musculares lisas fueron tratadas durante 24 horas con 15% de suero humano (control); 15% de suero humano y 25 μM lovastatina (LOV); y 15% de suero humano, 25 μM lovastatina y 500 μM mevalonato (MVA). Se representa el porcentaje de la incorporación de timidina tritiada en células tratadas con concentraciones crecientes de lovastatina respecto a células control. Los resultados se expresan como la media \pm el error estándar de la media de duplicados procedentes de tres experimentos independientes.

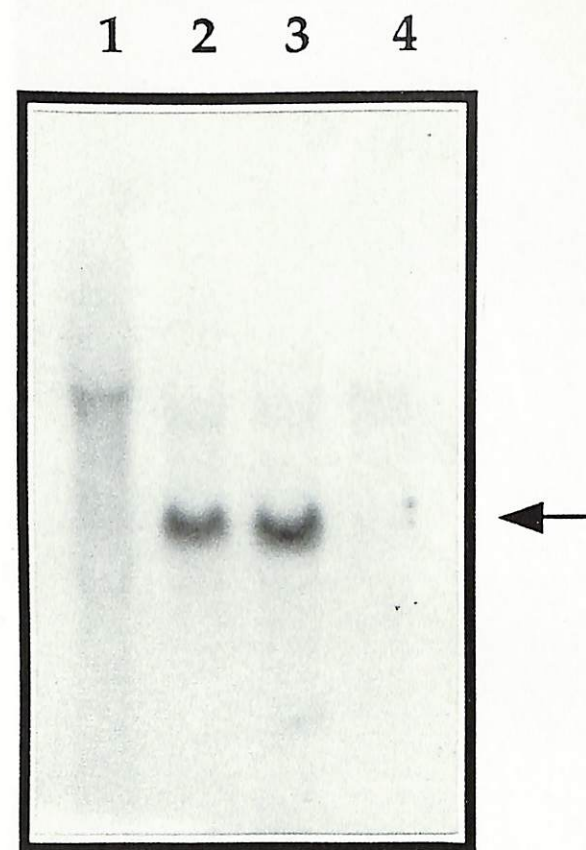


Figura 5. Expresión de *c-fos* en células musculares lisas estimuladas con 15% de suero humano. Las células se sembraron a una densidad de 10.000 células/cm² y se mantuvieron durante 48 horas en las condiciones de cultivo indicadas en Materiales y Métodos. Posteriormente se indujo quiescencia de las células por incubación de las mismas con 0,4% de FCS durante 48 horas. Se muestra los niveles de mRNA de *c-fos* en células quiescentes (carril 1), y a los 30, 60 y 120 minutos de la inducción de los cultivos con 15% de suero humano (carriles 2, 3 y 4, respectivamente).

de la lovastatina en un estudio multicéntrico en el que se ha utilizado para prevenir la restenosis post-angioplastia (23). En modelos animales con dosis muy elevadas estos fármacos reducen la hiperplasia de la íntima después de dilatación con balón (24). Estos efectos de las estatinas se han vinculado a la inhibición de la proliferación de la célula muscular lisa. El nivel exacto de bloqueo del ciclo celular por los inhibidores de la HMG-CoA reductasa en células musculares lisas humanas debe caracterizarse para poder diseñar estrategias correctas de utilización en las diversas patologías que cursan con cambios en la actividad proliferativa celular.

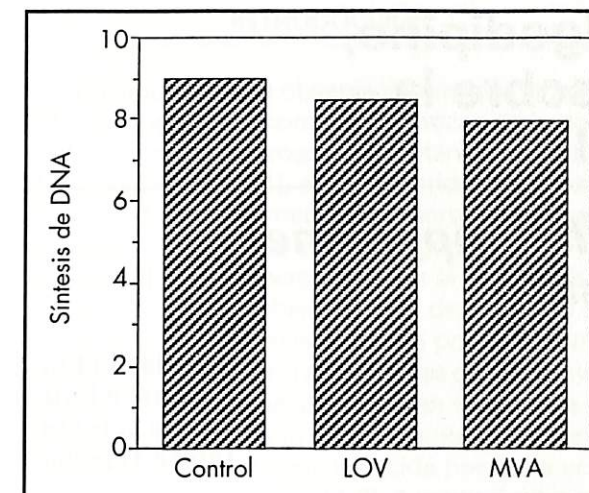


Figura 6. Efecto de la lovastatina sobre los niveles de mRNA de *c-fos*. Las células quiescentes fueron tratadas durante 24 horas con 25 μM lovastatina (LOV); con 25 μM lovastatina más 500 μM mevalonato (MVA) o sin tratamiento (control). Posteriormente las células fueron estimuladas con 15% suero humano durante 30 minutos. El mRNA de *c-fos* fue determinado mediante «Northern blot» y las autorradiografías cuantificadas por densitometría. Se representa el resultado de la cuantificación de las bandas de hibridación de *c-fos* en unidades densitométricas arbitrarias.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Equipo de Trasplante Cardíaco del Departamento de Cardiología del Hospital de la Sta. Creu i Sant Pau su colaboración. Este trabajo ha sido realizado gracias a la ayuda concedida por el FIS 92/0114, Merck Sharp & Dohme de España S.A. y la Fundación MAPFRE Medicina.

BIBLIOGRAFÍA

- HENWOOD J M, HEEL R C. Lovastatin. A preliminary review of its pharmacodynamic properties and therapeutic use in hyperlipidaemia. *Drugs*. 1988; 36: 429-454.
- TODD P A, GOA K L. Simvastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolemia. *Drugs*. 1990; 40: 583-607.
- MCTAVISH D, SORKIN E M. Pravastatin. A review of its pharmacological properties and therapeutic potential in hypercholesterolemia. *Drugs*. 1991; 42: 65-89.
- WATERS D, HIGGINSON L, GLADSTONE P, KIMBALL B, LE M M, BOCCAZZI S J, LESPERANCE J. Effects of monotherapy with an HMG-CoA reductase inhibitor on the progression of coronary atherosclerosis as assessed by serial quantitative arteriography. The Canadian Coronary Atherosclerosis Intervention Trial. *Circulation*. 1994; 89: 959-968.
- GOLDSTEIN J L, BROWN M S. Regulation of the mevalonate pathway. *Nature*. 1990; 343: 425-430.
- JAKOBISIAK M, BRUNO S, SKIERSKI J S, DARZYNKIEWICZ Z. Cell cycle-specific effects of lovastatin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1991; 88: 3628-3632.
- MALTESE M A, SHERIDAN K M. Differentiation of neuroblastoma cells induced by an inhibitor of mevalonate synthesis: relation of neurite outgrowth and acetylcholinesterase activity to changes in cell proliferation and blocked isoprenoid synthesis. *J Cell Physiol*. 1985; 125: 540-558.
- HANCOCK J F, MAGEE A I, CHILDS J E, MARSHALL C J. All ras proteins are polyisoprenylated but only some are palmitoylated. *Cell*. 1989; 57: 1167-1177.
- SANFORD J, CODINA J, BIRNBAUMER L. Gamma-subunits of G proteins, but not their α - or β -subunits, are polyisoprenylated. *J Biol Chem*. 1991; 266: 9570-9579.
- REPKO E M, MALTESE W A. Post-translational isoprenylation of cellular proteins is altered in response to mevalonate availability. *J Biol Chem*. 1989; 264: 9945-9952.
- ROSS R. The smooth muscle cell II. Growth of smooth muscle in culture and formation of elastic fibers. *J Cell Biol*. 1971; 50: 172-186.
- VARELA O, ROYO T, BADIMON L. Actividad proliferativa producida por la trombina en células musculares lisas de origen porcino y humano. *Clin Invest Arterios*. 1993; 5: 52-52.
- SKALLI O, ROPRAZ P, TRZECIAK A, BENZONANA G, GILLESSEN D, GABBIANI G A. A monoclonal antibody against alpha-smooth muscle actin: a new probe for smooth muscle differentiation. *J Cell Biol*. 1986; 103: 2787-2796.
- BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Bio Chem*. 1976; 72: 248-254.
- SAMBROOK J, FRISCH E F, MANIATIS T. En: *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- KHANDJIAN E W. UV crosslinking of RNA to nylon membrane enhances hybridization signals. *Molec Biol Rep*. 1986; 11: 107-117.
- MILLER A D, CURRAN T, VERMA I M. *c-fos* protein can induce cellular transformation: a novel mechanism of activation of a cellular oncogene. *Cell*. 1984; 36: 51-60.
- TRAGANOS F, DARZYNKIEWICZ Z, MELAMED M R. The ratio of RNA to total nucleic content as a quantitative measure of unbalanced cell growth. *Cytometry*. 1982; 21: 212-218.
- FUKADA Y, TAKAO T, OHGURO H, TORU Y, AKINO T, SHIMONISHI Y. Farnesylated gamma-subunit of photoreceptor G protein indispensable for GTP-binding. *Nature*. 1990; 346: 658-660.
- LEONARD S, BECK L, SINENSKY M. Inhibition of isoprenoid biosynthesis and the post-translational modification of pro-p21^{ras}. *J Biol Chem*. 1990; 265: 5157-5160.
- EISMAN R N. En: Weinberg R A (ed). *Oncogenes and the Molecular Origins of Cancer*. New York: Cold Spring Harbor Press, 1989; 175-221.
- VINCENT T S, WULFERT E, MERLER E. Inhibition of growth factor signaling pathways by lovastatin. *Biochem Biophys Res Commun*. 1991; 180: 1284-1289.
- LOVASTATIN RESTENOSIS TRIAL GROUP. Lovastatin restenosis trial: results in patients with cholesterol over 200 mg/dl. *J Am Coll Cardiol Program and Abstracts of Original Contributions*. 1994; 829-833.
- GELLMAN J, EZEKOWITZ M D, SAREMBOCK J L, AZRIN M A, NOCHOMOWITZ L E, LERNER E, HANDENSCHILD C C. Effect of lovastatin on intimal hyperplasia after balloon angioplasty: a study in an atherosclerotic hypercholesterolemic rabbit. *J Am Coll Cardiol*. 1991; 17: 251-259.

Estudio de los efectos de elgodipino, una nueva dihidropiridina, sobre la aterosclerosis experimental

Effects of elgodipine, a new dihydropyridine, on experimental atherosclerosis

Departamento de Farmacología
Facultad de Medicina
Universidad Complutense
Madrid (España)

Marcela del Río¹
Emilio Ruiz²
Rosa Lorente³
Teresa Tejerina⁴

RESUMEN

En el presente estudio se investigaron los efectos de elgodipino, una nueva dihidropiridina, sobre el desarrollo de lesiones ateroscleróticas en conejos alimentados con una dieta enriquecida con 1% de colesterol por un período de 16 semanas. Elgodipino fue añadido a la dieta en dos concentraciones distintas que correspondieron a dosis de 0,3 y 1 mg/kg/día. A lo largo del tratamiento el consumo de la dieta y el peso corporal de los animales fue semejante entre los distintos grupos (control y experimentales). Elgodipino no alteró de forma significativa los niveles séricos de colesterol y triglicéridos o el porcentaje de área cubierta por lesiones en la aorta. A pesar de la ausencia de efectos sobre los parámetros anteriormente mencionados, elgodipino a la dosis de 1 mg/kg/día disminuyó el contenido de calcio en la aorta desde $3,90 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{mg}$ (en el control hipercolesterolémico) hasta $1,61 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0,01$). Además, elgodipino (0,3 y 1 mg/kg/día) deprimió de forma estadísticamente significativa la hiperreactividad a 5-HT observada en la arteria coronaria proximal de conejos hipercolesterolémicos controles.

En experimentos «in vitro», elgodipino (10^{-7}M y 10^{-5}M) inhibió en forma dependiente de la concentración la respuesta proliferativa inducida por suero fetal bovino en la línea celular de músculo liso de aorta de rata A10 y en cultivos primarios de aorta de conejo hipercolesterolémico (16 semanas de dieta enriquecida) evaluada tanto en términos de síntesis de ADN como de número de células ($P < 0,05$ en ambos casos para elgodipino 10^{-7}M). La expresión de ARNm de *c-fos* y *c-jun* inducida también por suero fetal bovino no fue afectada por elgodipino. Nuestros resultados indican que el tratamiento crónico con elgodipino fue capaz de prevenir dos eventos asociados a la aterosclerosis, por un lado el incremento en el contenido de calcio vascular y por el otro la hiperreactividad coronaria. Finalmente, elgodipino produjo un potente efecto inhibitorio de la proliferación del músculo liso vascular en cultivo. Este efecto antiproliferativo podría contribuir a la regresión de la hiperplasia y/o hipertrofia observada tanto en la aterosclerosis como en la hipertensión arterial.

Palabras clave: Aorta, coronaria, hipercolesterolemia, conejos, cultivos celulares, oncogenes.

Del Río M, Ruiz E, Lorente R, Tejerina T
Estudio de los efectos de elgodipino, una nueva dihidropiridina, sobre la aterosclerosis experimental
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 44-51

Correspondencia:

Marcela del Río
Dpto. de Farmacología
Facultad de Medicina
UCM. Madrid, España

ABSTRACT

The effects of elgodipine on the development of atherosclerosis in rabbits maintained on a 1% cholesterol-enriched diet for a 16 week period has been examined. Elgodipine was supplemented to the diet at two different levels to corresponding doses of 0.3 and 1 mg/kg/day. Throughout the treatment, dietary consumption and body weight gains were comparable among the experimental and control groups. Elgodipine had no significant effect on serum cholesterol, triglycerides or on the percentage of aorta covered by lesions. Despite the lack of effect of the drug on the above mentioned parameters, its administration produced a significant decrease of the calcium content of the aorta from $3,90 \pm 0,35 \mu\text{g}/\text{mg}$ (hypercholesterolemic control) to $1,61 \pm 0,19 \mu\text{g}/\text{mg}$ ($P < 0,01$). In addition, elgodipine (0.3 and 1 mg/kg/day) significantly reduced the hyperreactiveness to 5-HT in the proximal coronary artery.

In «in vitro» studies elgodipine (10^{-7}M y 10^{-5}M) concentration-dependently inhibited the proliferative responses in the A10 line and in primary cultured of rabbit hypercholesterolemic smooth muscle cells induced by foetal calf serum, in terms of both DNA syntheses and cell number. The expression of foetal calf serum-induced *c-fos* and *c-jun* mRNA levels was unaffected by elgodipine. Our results indicate that elgodipine is able to prevent the increase in vascular calcium content and the hyperresponsiveness of the coronary artery. Finally, elgodipine markedly decreased the proliferation of cultured smooth cells. The antimotogenic actions of elgodipine may contribute to the regression of the hyperplasia and/or hypertrophy associated with atherosclerosis and hypertension.

Key words: Aorta, coronary, hypercholesterolemia, rabbits, tissue culture, oncogene.

Del Río M, Ruiz E, Lorente R, Tejerina T
Effects of elgodipine, a new dihydropyridine, on experimental atherosclerosis
Mapfre Medicina, 1996; 8 (Supl. III): 44-51

- ¹ Doctor en Farmacia. Becario postdoctoral
- ² Becario predoctoral
- ³ Médico interno residente
- ⁴ Profesor Titular de Farmacología

INTRODUCCIÓN

Basándose en la observación de que tanto las fibras musculares como las elásticas de la aorta del hombre con aterosclerosis están altamente infiltradas de calcio (1), se ha sugerido que la calcificación de la capa media de la aorta podría jugar un papel importante en la patogénesis de la enfermedad (2). Un incremento en el contenido de calcio vascular también ha sido demostrado durante la aterosclerosis inducida por dietas enriquecidas en colesterol en animales de experimentación (3-5). Diversos estudios han señalado a los antagonistas de calcio como agentes capaces de inhibir la aterosclerosis inducida por dieta en la aorta torácica de conejo (6, 7). A pesar de que, distintas hipótesis, han sido propuestas para explicar este efecto, el(los) mecanismo(s) exactos siguen aún sin ser conocidos.

Elgodipino es una nueva dihidropiridina bloqueante de la entrada de calcio cuya mayor ventaja sobre otros antagonistas es la de presentar un efecto potente, duradero y altamente vasoselectivo (8-10). El presente estudio fue diseñado para investigar los posibles efectos antiaterogénicos de elgodipino. Para ello se analizaron las acciones del fármaco sobre el desarrollo de aterosclerosis en conejos hipercolesterolémicos. Teniendo en cuenta que, la proliferación anormal del músculo liso vascular es fundamental en el desarrollo del atero-roma y que el calcio intracelular así como la expresión temprana de protooncogenes juegan un papel importante en los mecanismos de crecimiento celular (11), también fueron motivo de estudio los efectos de elgodipino sobre la proliferación del músculo liso en cultivo inducida por suero fetal bovino así como sobre la expresión de ARNm de los genes *c-fos* y *c-jun*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se emplearon para el estudio conejos New Zealand White machos de pesos comprendidos entre 1,8-2,0 kg, a los cuales se les sometió a una dieta hiperlipemiente por un período de 16 semanas. Los animales fueron suministrados por Biocentre S.A. Barcelona, España y se mantuvieron en nuestro estabulario, en jaulas individuales durante siete días antes de comenzar los protocolos específicos y durante la totalidad del experimento.

Dieta y tratamiento

Los animales se separaron en cuatro grupos de diez conejos cada uno, estableciéndose el si-

guiente esquema: Grupo I (GI): control normal; Grupo II (GII): control hipercolesterolémico, dieta enriquecida con colesterol (1%); Grupo III (GIII): dieta enriquecida con colesterol (1%) + ELG 0,3 mg/kg/día y Grupo IV (GIV): dieta enriquecida con colesterol (1%) + ELG 1 mg/kg/día.

Todos los animales se alimentaron con la dieta estándar por lo menos una semana antes de comenzar el experimento. La dieta estándar y la dieta enriquecida con colesterol fueron suministradas por Panlab S.L. Barcelona, España y por U.A.R. París, Francia respectivamente. El agua y las dietas se administraron «ad libitum». El consumo de comida se monitorizó diariamente durante la primera semana y posteriormente semanalmente tanto en los grupos experimentales como controles, mientras que el peso de cada conejo se determinó semanalmente.

Al finalizar se 16.^a semana del estudio, los conejos se anestesiaron con éter etílico y se sacrificaron por exanguinación, disecando rápidamente la arteria aorta y coronaria proximal. La arteria aorta se destinó para los estudios de contenido de colesterol y calcio en tejido y para el estudio morfológico del daño tisular. La arteria coronaria proximal se empleó para los estudios de reactividad vascular que se llevaron a cabo según un protocolo descrito anteriormente (12).

Determinación de parámetros bioquímicos, histológicos y de presión arterial

La extracción de sangre se realizó en la arteria marginal de la oreja, posteriormente el suero se separó por centrifugación y se conservó a -75°C hasta el momento en que se realizaron las distintas determinaciones. Las concentraciones séricas de colesterol total, HDL-colesterol, LDL-colesterol y triglicéridos así como la valoración del colesterol aórtico se realizaron empleando reactivos comerciales (Medical Analysis, INC). La determinación del contenido de calcio en la pared arterial se evaluó por absorción atómica. El estudio del daño aórtico se realizó previa tinción con tetroxido de Osmio según un método anteriormente descrito (13). La superficie macroscópica interior fue morfológicamente analizadas utilizando un planímetro CUE2.

Cultivos celulares y estudios de proliferación

Se emplearon para el estudio cultivos primarios provenientes de células musculares de aorta de conejos pertenecientes al grupo II (control hipercolesterolémico) así como la línea celular de

aorta de rata A10 (ATCC). Los cultivos primarios se prepararon por un método enzimático (colagenasa tipo II), tanto éstos como la línea celular se cultivaron en Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) adicionado de 10% de suero fetal bovino (FCS). Los efectos de elgodipino (ELG) sobre el crecimiento inducido por FCS se investigaron cuantificando la síntesis de ADN mediante incorporación de bromodeoxiuridina (BrdU) y el número de células por medio de un hemocitómetro empleando en ambos casos un protocolo análogo al descrito anteriormente (11, 14). Resumiendo el procedimiento consistió en incubar cultivos subconfluentes y quiescentes (48 horas en DMEM + 0,1% albúmina) con 10% de FCS en ausencia y presencia de las distintas concentraciones de ELG por un período de 17 horas. Al concluir el estímulo proliferativo, se añadió al medio BrdU (10 μ M) incubándose las células por un período adicional de 6 horas. Finalmente, las células se fijaron en formalinaacetona (1:1) visualizándose la incorporación por medio de un anticuerpo monoclonal anti-BrdU y el complejo avidina-biotina-peroxidasa (Vectastain ABC kit). El número de células fue determinado en presencia y ausencia de ELG (10^{-7} M y 10^{-5} M) en el sexto día de estímulo de crecimiento, después una suave tripsinización y mediante un hemocitómetro. La expresión de los genes *c-fos* y *c-jun* se analizó en la línea celular A10 por northern blot. Nuevamente células subconfluentes y quiescentes fueron incubadas en DMEM + 10% de FCS en presencia y ausencia de ELG (10^{-7} M y 10^{-5} M) por 0,5 horas (*c-fos*) y una hora (*c-jun*). Al final de la incubación el ARNm total fue aislado, separado en un gel de agarosa y transferido a una membrana de nylon para posteriormente ser hibridado con las sondas ($[^{32}$ P] DNA probes) correspondientes.

Análisis estadístico de los resultados

Los datos experimentales han sido expresados como media \pm error estándar de la misma ($x \pm$ E.S.M.) para un determinado número (n) de experimentos. La comparación de las medias se realizó utilizando un test ANOVA de dos vías, considerando significativas aquellas diferencias en las que $P < 0,05$.

RESULTADOS

Efectos de elgodipino sobre la curva concentración-respuesta a 5-HT en la arteria coronaria proximal

En la Figura 1 se muestra el efecto del tratamiento crónico con ELG (0,3 y 1 mg/kg/día) sobre

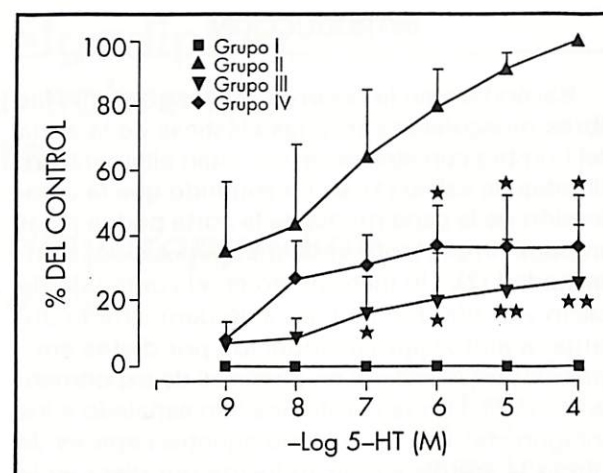


Figura 1. Efectos de ELG sobre la curva concentración-respuesta a 5-HT en arteria coronaria proximal. Conejos control GI, control-hipercolesterolémicos GII, tratados con ELG 0,3 mg/kg/día GIII y ELG 1 mg/kg/día GIV. Cada punto representa la media \pm SEM de 8-10 experimentos.

la respuesta contráctil inducida por concentraciones acumulativas de 5-HT (10^{-9} M- 10^{-4} M) en la arteria coronaria proximal de conejos hipercolesterolémicos. Las concentraciones inducidas en el grupo control hipercolesterolémico (no tratado) fueron significativamente mayores que las obtenidas con el mismo agonista en el grupo alimentado con la dieta estándar (Figura 1), encontrándose la curva concentración-respuesta desplazada hacia arriba y hacia la izquierda ($P < 0,01$). Por el contrario, el tratamiento con ELG (GIII y GIV) produjo un desplazamiento de la curva hacia valores control ($P < 0,05$, comparado con el grupo hipercolesterolémico no tratado).

Efectos de elgodipino sobre el perfil lipídico, el daño tisular y el contenido de colesterol y calcio en aorta

Al comienzo del estudio la concentración de colesterol total sérico fue de aproximadamente 150 mg/dl e incrementó gradualmente durante las primeras seis semanas en todos los grupos a excepción del grupo alimentado con dieta estándar. Durante el estudio no hubo diferencias estadísticamente significativas en la concentración de colesterol entre los grupos experimentales y el control hipercolesterolémico (GII) (Figura 2). Tampoco se observaron cambios importantes en la distribución de colesterol en LDL o HDL (resultado no mostrado). La Figura 3 muestra la concentración

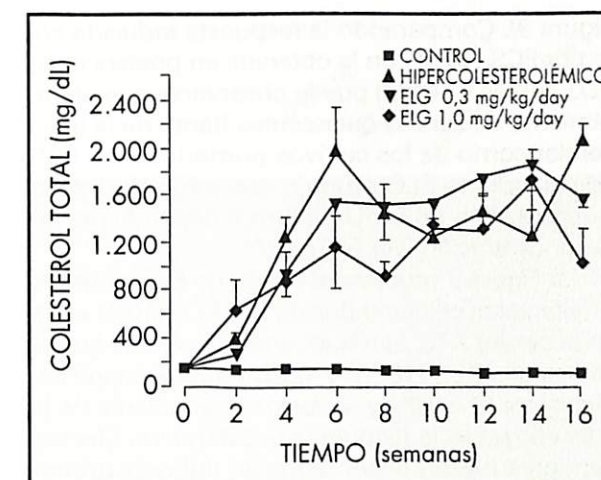


Figura 2. Concentración plasmática de colesterol total en función del tiempo de tratamiento. Cada punto representa la media \pm E.S.M. de cada grupo.

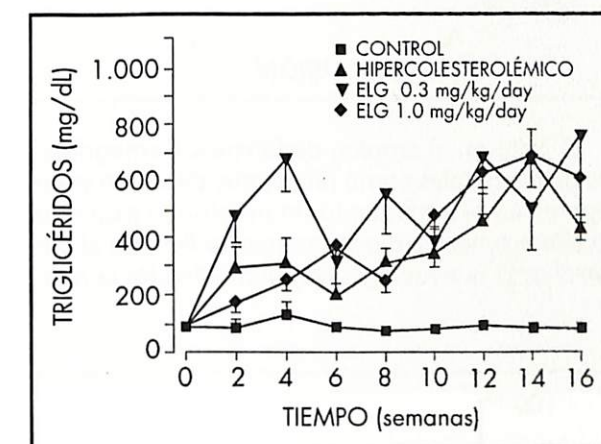


Figura 3. Concentración plasmática de triglicéridos en función del tiempo de tratamiento. Cada punto representa la media \pm E.S.M. de cada grupo.

de triglicéridos media en cada grupo en función del tiempo de tratamiento. Como puede observarse este parámetro resultó altamente variable. Dicha variabilidad en los datos dificultó el análisis; sin embargo cuando se midió el área bajo la curva, correspondiente bien a los grupos experimentales (dieta enriquecida + distintas dosis de ELG) o al control-hipercolesterolémico (GII) se observó que éstas eran muy similares. Esto indicaría que la administración de ELG tampoco altera consistentemente la concentración plasmática de triglicéridos. Observaciones similares han sido rea-

lizadas por otros autores, con respecto a otros antagonistas de calcio, en modelos equivalentes (15). Tampoco se detectaron variaciones significativas entre el control-hipercolesterolémico y los grupos tratados con ELG en el contenido de colesterol en la aorta, en el porcentaje de área de dicha arteria cubierta por lesiones ateroscleróticas o en el peso de los conejos (Tabla I). Finalmente, cuando se analizó el contenido de calcio en las arterias aortas de los distintos grupos de conejos se observó que el mismo estaba significativamente aumentado en los grupos que recibieron la dieta hipercolesterolémica: GII, III y IV con $P < 0,01$ respecto al grupo alimentado con dieta estándar, GI, en donde el nivel de calcio fue de $0,39 \pm 0,07 \mu$ g/mg de tejido. Sin embargo, en este caso la administración de ELG a la dosis más elevada (1 mg/kg/día) disminuyó los niveles de calcio en la pared arterial (desde $3,90 \pm 0,35 \mu$ g/mg de tejido en el control-hipercolesterolémico hasta $1,61 \pm 0,19 \mu$ g/mg tejido) ($P < 0,01$) (Figura 4).

Tabla I

	Contenido de colesterol en aorta (μ g/mg tejido seco)	Peso corporal a las 16 semanas	Área cubierta por lesiones (%)
Grupo I	$7,6 \pm 1,2$	3.997 ± 180	$0,7 \pm 0,0$
Grupo II	$111,2 \pm 9,8$	3.627 ± 159	$95 \pm 2,0$
Grupo III	$141,2 \pm 3,5$	3.296 ± 72	$97 \pm 3,0$
Grupo IV	$135,7 \pm 9,8$	3.389 ± 121	$93 \pm 6,0$

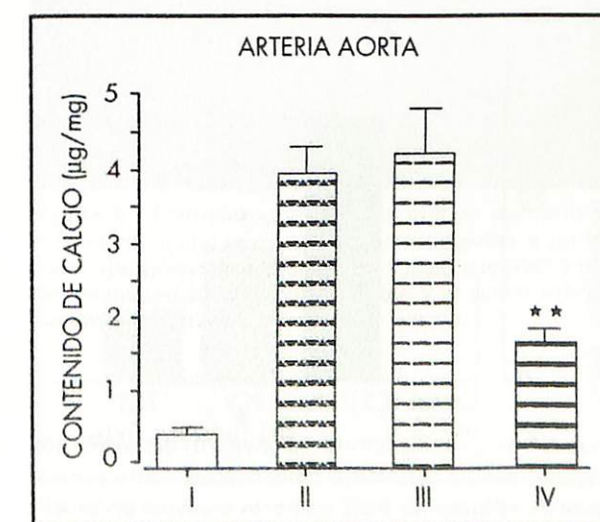


Figura 4. Efecto de ELG sobre el contenido aórtico de calcio. Cada barra representa la media \pm SEM de cada grupo. Para detalle sobre tratamientos ver Figura 1. ** $p < 0,01$. Comparados con el control normal.

Efectos de elgodipino *in vitro* sobre el crecimiento del músculo liso vascular

Los efectos de ELG sobre la incorporación de BrdU en la línea celular A10 y en cultivos primarios de aorta de conejos hipocolesterolémicos se muestran en las Figuras 5 y 6 respectivamente (ver

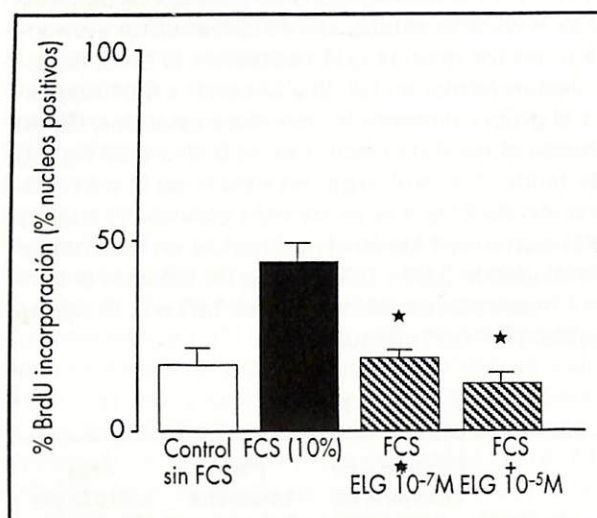


Figura 5. Efecto de ELG sobre la incorporación de BrdU en la línea celular de aorta de rata A10 durante la estimulación con FCS 10%. Los datos que se muestran representan la media \pm SEM (n = tres experimentos independientes en duplicado). * $P < 0,05$ vs FCS 10%.

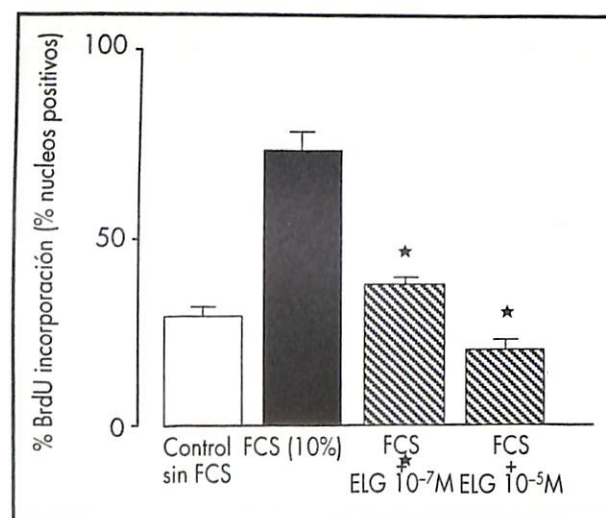


Figura 6. Efecto de ELG sobre la incorporación de BrdU en cultivos primarios de aorta de conejo hipercolesterolémico durante la estimulación con FCS 10%. Los datos que se muestran representan la media \pm SEM (n = tres experimentos independientes en duplicado). * $P < 0,05$ vs FCS 10%.

Figura 9). Comparando la respuesta inducida sólo por FCS (10%) con la obtenida en presencia de ELG (10^{-7} M y 10^{-5} M) puede observarse que el tratamiento de células quiescentes (tanto de la línea celular como de los cultivos primarios) con FCS adicionado de ELG produjo una inhibición de la incorporación de BrdU de forma dependiente de la concentración (ver Figura 10).

La Figura 7 muestra el efecto de ELG sobre la proliferación celular inducida por FCS (10%) en la línea celular A10. El tratamiento de células quiescentes con ELG (10^{-7} M y 10^{-5} M) inhibió significativamente ($P < 0,05$) y en forma dependiente de la concentración la respuesta proliferativa. Efectos similares fueron observados en cultivos primarios.

Como se muestran en la Figura 8, el análisis por northern blot reveló que el tratamiento con ELG (10^{-7} M y 10^{-5} M) no afectó la expresión de los oncogenes *c-fos* y *c-jun* inducida por FCS (10%) en la línea celular A10.

DISCUSIÓN

El éxito en el empleo de fármacos antagonistas de calcio tales como nifedipina, diltiazem y verapamil en el tratamiento de un amplio espectro de alteraciones cardiovasculares ha llevado al desarrollo de nuevos agentes, derivados de la mis-

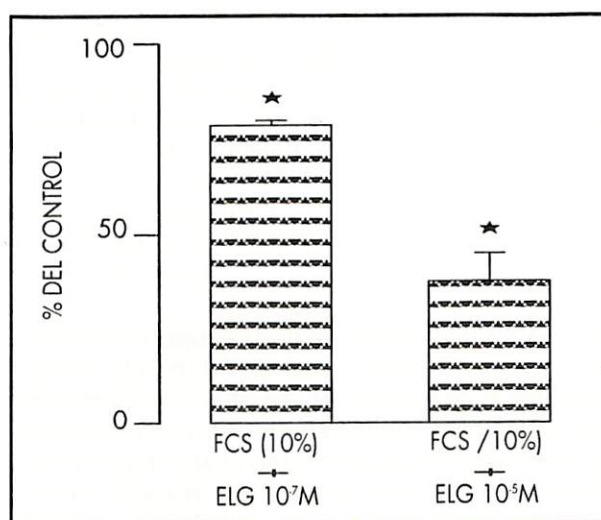


Figura 7. Efecto de ELG sobre la proliferación de la línea celular de aorta de rata A10. El número de células en el sexto día de estímulo con FCS 10% en condiciones control fue $9,7 \pm 0,5 \times 10^{-4}$ M/ml. Los datos que se muestran representan la media \pm SEM (n = tres experimentos independientes en duplicado). * $P < 0,05$.

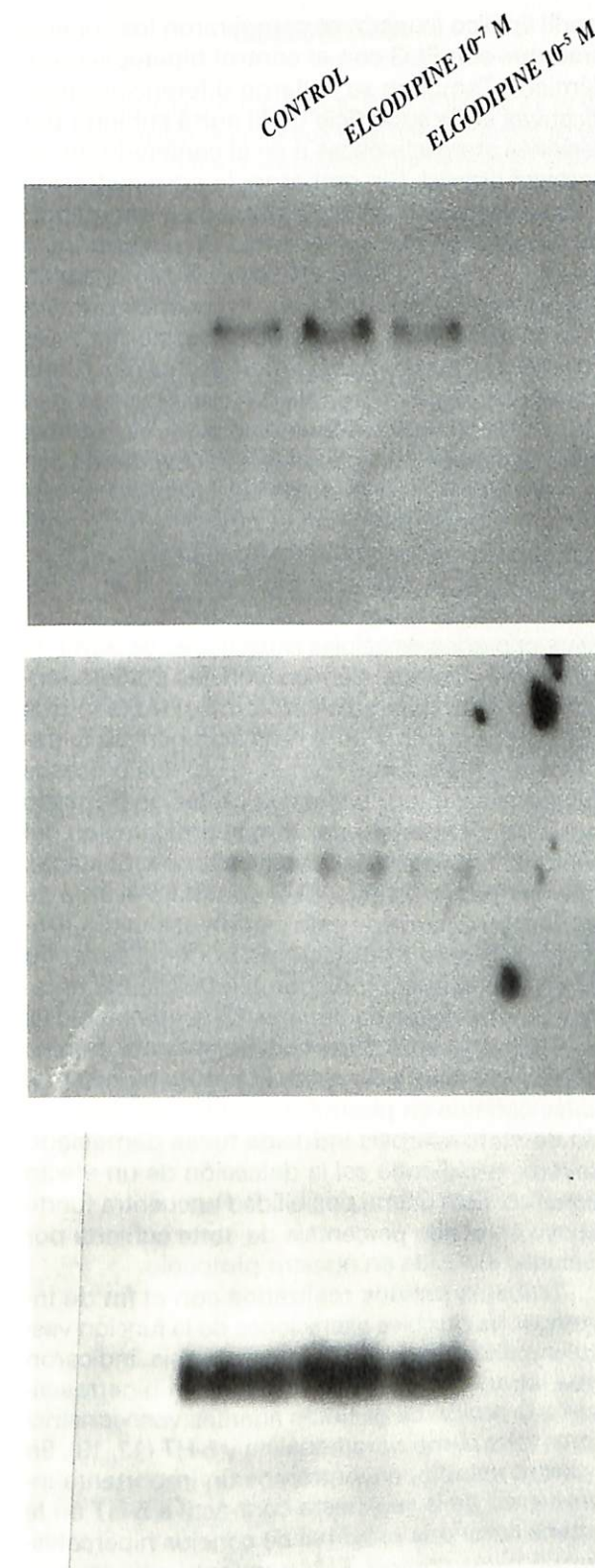


Figura 8. Efecto de ELG sobre la expresión inducida por FCS de *c-fos* y *c-jun* en la línea celular de aorta de rata A10. ARN total (10 μ g) fue sometido a análisis por northern blot empleando sondas para *c-fos* (panel superior) y *c-jun* (panel medio). En el panel inferior se muestra el ARN ribosomal (7S).

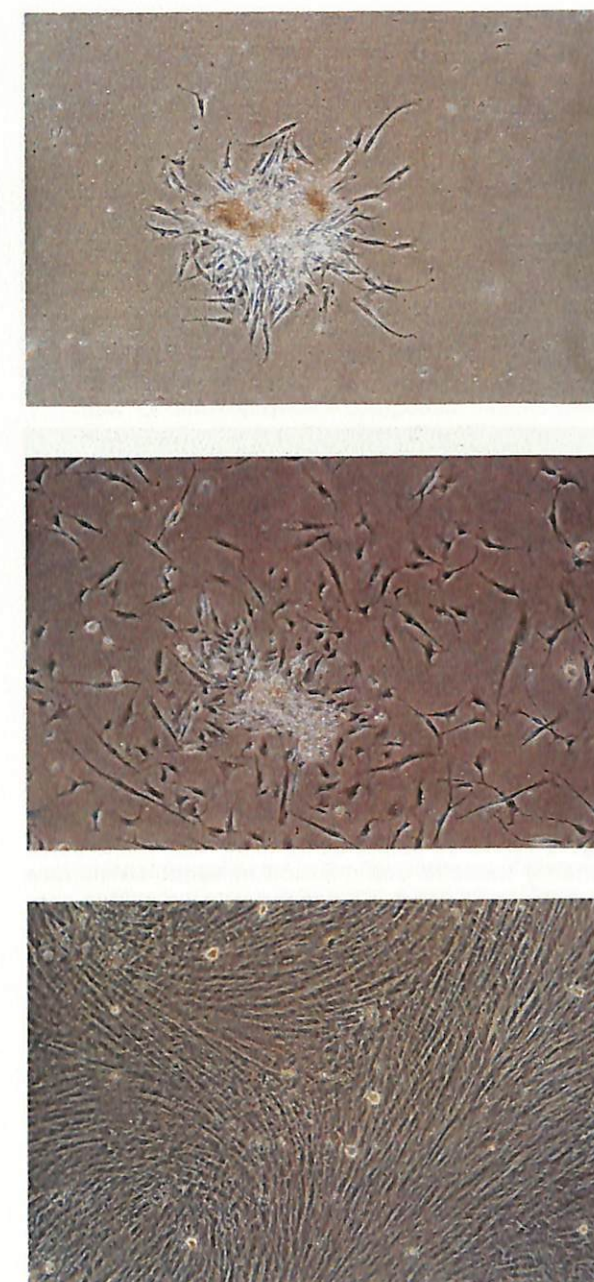


Figura 9. Fotomicrografía de un cultivo primario de células musculares de aorta pertenecientes a un conejo hipercolesterolémico. Los paneles superior y medio muestran células proliferantes y el panel inferior células estacionarias en el cuarto pasaje.

ma clase de drogas. La investigación se ha centrado particularmente en optimizar en los antagonistas de calcio su selectividad tisular/vascular así como sus propiedades farmacocinéticas. Elgodipino es un ejemplo de una nueva dihidropiridina (8, 9) capaz de generar un potente efecto vasodilatador coronario, sin deprimir significativamente

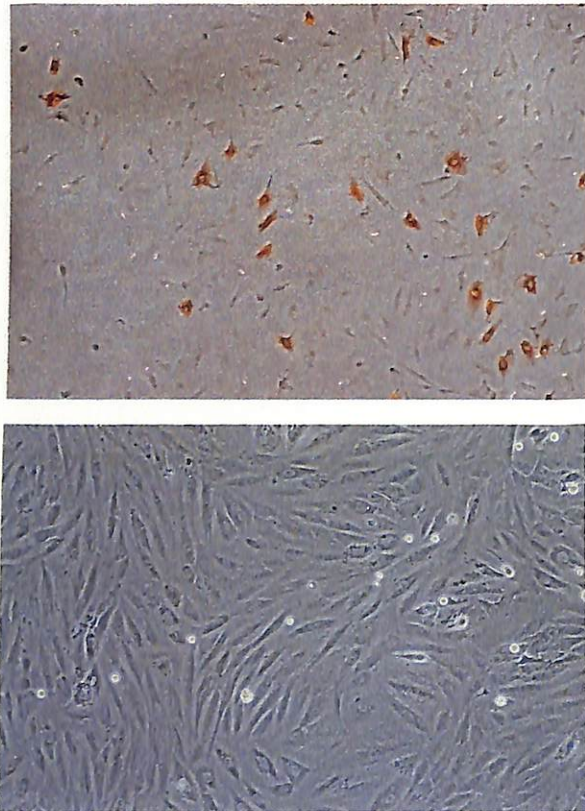


Figura 10. Línea celular de aorta de rata A10. El panel superior muestra una reacción inmunohistoquímica para BrdU. El panel inferior muestra un cultivo confluente de A10.

la contractilidad cardíaca (16). Más aún, en estudios recientes realizados por nuestro laboratorio elgodipino ha demostrado, frente a otros antagonistas de calcio, la ventaja de poseer un efecto potente, duradero y altamente vasoselectivo (particularmente sobre la arteria coronaria) (10). Teniendo en cuenta estos antecedentes, y el hecho de que numerosos antagonistas de calcio han demostrado un efecto benéfico sobre el proceso aterosclerótico, nos planteamos como objetivo del presente estudio el analizar las posibles acciones de elgodipino sobre la aterosclerosis inducida en conejos por una dieta rica en colesterol.

De nuestro trabajo se desprende por un lado, que la administración de una dieta enriquecida con 1% de colesterol produce un importante incremento en los niveles séricos de colesterol total, alcanzando en la mayoría de los casos valores alrededor de diez veces superiores a los de los conejos alimentados con la dieta estándar. Por otro lado, se observó que el tratamiento con ELG no alteró de forma estadísticamente significativa el

perfil lipídico (cuando se compararon los conejos tratados con ELG con el control hipercolesterolémico). Tampoco se hallaron diferencias significativas en la superficie de la aorta cubierta por lesiones ateroscleróticas o en el contenido de colesterol arterial. Sin embargo, la administración crónica de ELG (1 mg/kg/día) produjo una importante reducción en el contenido de calcio aórtico (>50%, $P < 0,01$). Este efecto de ELG es particularmente importante si se tiene en cuenta, que tan pronto como las alteraciones ateroscleróticas se establecen comienza a acumularse calcio, y que existe una excelente correlación entre la severidad de la enfermedad y el contenido de calcio arterial; correlación que no se observa tan claramente con por ejemplo: el contenido de colesterol (17). Estas observaciones, junto con el potente efecto anti-mitogénico observado (aproximadamente 50% de inhibición de la proliferación) tanto en la línea celular de músculo liso de aorta (A10) como en cultivos primarios de células musculares de aorta de conejo hipercolesterolémico (conejos pertenecientes al control hipercolesterolémico) indican que ELG podría deprimir durante la aterogénesis (a través de un mecanismo común, o no) dos procesos fundamentales, por un lado la captación de calcio por la pared arterial y por otro la proliferación del músculo liso vascular. Cabe resaltar, no obstante, que en nuestro estudio, ELG no redujo el área de aorta aterosclerótica; esto podría atribuirse fundamentalmente a dos factores: primero, teniendo en cuenta la baja biodisponibilidad de los antagonistas de calcio en conejos (2) a que las dosis de ELG empleadas durante el tratamiento crónico fuesen inferiores a las necesarias para alcanzar niveles óptimos en plasma; segundo, a que el grado de aterosclerosis inducida fuese demasiado severo, impidiendo así la detección de un efecto benéfico. Esta última posibilidad encuentra fuerte apoyo en el alto porcentaje de aorta cubierta por lesiones inducida en nuestro protocolo.

Trabajos previos realizados con el fin de investigar las posibles alteraciones de la función vascular sufridas durante la aterosclerosis, indicaron que las arterias ateroscleróticas eran hiperreactivas a la acción de distintos agentes vasoconstrictores tales como noradrenalina y 5-HT (12, 18). En nuestro estudio, encontramos un importante incremento de la respuesta contráctil a 5-HT en la arteria coronaria proximal de conejos hipercolesterolémicos control. El tratamiento crónico con ELG (0,3 y 1 mg/kg/día) deprimió de forma estadísticamente significativa esta hiperreactividad. Esto último es nuevamente alentador, si se considera la importancia que tiene el vasoespasmo coronario en la enfermedad cardíaca.

BIBLIOGRAFÍA

- BLUMLEIN S L, SIEVERS R, KIDD P, PARMLEY W W. Mechanism of protection from atherosclerosis by verapamil in the cholesterol-fed rabbit. *Am J Cardiol.* 1984; 54: 884-889.
- KEOGH A M, SCHROEDER J S. A review of calcium antagonists and Atherosclerosis. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990; 16 (suppl 6): S28-S35.
- FLECKENSTEIN A, FLECKENSTEIN-GRUN G. Cardiovascular protection by calcium antagonists. *Eur Heart J.* 1980; 1 (suppl B): 15.
- WHITTINGTON-COLEMAN P J, CARRIER O. Effects of agents altering vascular calcium in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis.* 1970; 12: 15-24.
- KRMSCH D M, CHAN C T. The effect of agents interfering with soft tissue calcification and cell proliferation on calcific fibrous fatty plaques in rabbits. *Circ Res.* 1978; 42: 562-571.
- KOIBUCHI Y, SAKAI S, MIURA S, ONO T, SHIBAYAMA F, OHTSUKA M. Suppression of atherogenesis in cholesterol-fed rabbits treated with nilvadipine, a new vasoselective calcium entry blocker. *Atherosclerosis.* 1989; 79: 147-155.
- SKEPPER J N, KAPPAGODA C T. The effect of concurrent administration of isradipine on the development of fatty streaks in the cholesterol-fed rabbit: a morphometric study. *Atherosclerosis.* 1992; 96: 17-31.
- TEJERINA T, GONZÁLEZ P, LÓPEZ J, TAMARGO J. An in vitro evaluation of oxodipine (IQB-837) with its derivatives IQB-852, IQB-872 and IQB-875. Florencia: 4th Intern Symposium on Calcium Antagonists, 1989; 256.
- TAMARGO J, LÓPEZ-SENDÓN J, DELPÓN E, GONZÁLEZ-MORALES M, DE MIGUEL E. Cardiovascular effects of the new dihydropyridine derivative elgodipine. *Arzneim Forsch.* 1991; 41: 895-900.
- TEJERINA T, CHULIA M T, DEL RÍO. Effects of Elgodipine on different blood vessels. *Eur J Pharmac (Holland).* 1995; 285: 115-122.
- HIRATA Y, EGUCHI S, TSUJINO M. Effects of Manidipine on DNA and protein synthesis in cultured vascular smooth muscle and endothelial cells and on protooncogene expression. *Blood Pressure.* 1992; 1 (suppl 3): 30-35.
- SIMONSEN U, PRIETO D, MULVANY M J, EHRNROTH E, KORSGAARD N, NYBORG N C B. Effect of induced hypercholesterolemia in rabbits on functional responses of isolated large proximal and small distal coronary arteries. *Arterioscl Thromb.* 1992; 12 (3): 381-392.
- McMANUS J F A, MOWRY R W. Técnica Histológica. *Atika.* 1968; 136-140.
- DEL RÍO M, CHULIA T, TEJERINA T. Elgodipine, a new 1,4-dihydropyridine compound, inhibits vascular smooth muscle cell proliferation. XII International Congress of Pharmacology, Montreal (Canada) P1.13. 062. *Canadian J Physiol Pharmacol.* 1994; 72 (suppl 1): 160.
- STEIN Y, STEIN O, DELPLANQUE B, FESMIRE J D, LEE D M, ALAUPOVIC P. Lack of effect of probucol on atheroma formation in cholesterol-fed rabbits kept at comparable plasma cholesterol levels. *Atherosclerosis.* 1989; 75: 145-155.
- SASSEN L M A, SOEI L K, KONING M M G, VERDOUW P D. The central and regional cardiovascular responses to intravenous and intracoronary administration of the phenylidihydropyridine elgodipine in anaesthetized pigs. *Br J Pharmacol.* 1990; 99: 355-363.
- FLECKENSTEIN M, FREY M, THIMM G, FLECKENSTEIN G. Excessive mural calcium overload: a predominant causal factor in the development of stenosing coronary plaques in humans. *Cardiovasc Drugs and Therap.* 1990; 4: 1006.
- ROSENDORFF C, HOFFMAN J I E, VERRIER E D, ROULEAU J, BOERBOOM L E. Cholesterol potentiates the coronary artery response to norepinephrine in anesthetized and conscious dogs. *Cir Res.* 1981; 48 (3): 320-329.

Plaquetas, fibrinógeno y fibrina en la arteriosclerosis coronaria acelerada

Platelets, fibrinogen and fibrin in accelerated coronary atherosclerosis

Centro de Investigación Cardiovascular
CSIC-HSCSP-UAB
Barcelona
Cátedra de Recerca Cardiovascular
Catalana-Occidente

Teresa Royo Bargués ¹
María Berrozque Martínez ²
Matilde Vidal Tramunt ³
Juan José Badimon Maestro ⁴
Lina Badimon Maestro ⁵

RESUMEN

La interacción de la plaqueta con la pared vascular lesionada se inicia con la perfusión después de la intervención de revascularización. La reestenosis post-angioplastia se puede definir como un proceso que se inicia a partir de un reconocimiento celular temprano que regularía la respuesta lesiva a la intervención de perfusión. Los objetivos específicos de este trabajo se han centrado en la caracterización *in vivo* de la interacción de elementos celulares, como la plaqueta, y proteínas de la sangre (fibrinógeno y fibrina) con la pared vascular post-angioplastia en el modelo porcino. Se han estudiado mediante técnicas inmunohistoquímicas arterias coronarias procedentes de cerdos que fueron tratados con angioplastia y sacrificados a diferentes tiempos desde el momento de la intervención. La inmunodetección de plaquetas se realizó con anticuerpos policlonales que reconocen específicamente las plaquetas de origen porcino. El fibrinógeno fue inmunomarcado con anticuerpos policlonales comerciales, en tanto que la fibrina se identificó con anticuerpos monoclonales cedidos por el grupo de Gaffney. Los resultados obtenidos indican que no sólo las plaquetas, sino también el fibrinógeno y la fibrina están siempre presentes en la zona de dilatación aunque en distinta proporción relativa, y superior respecto a los controles. El fibrinógeno, que es una proteína soluble, penetra en la pared vascular lesionada y podría favorecer el estímulo mitogénico sobre las células musculares lisas vasculares. Las plaquetas (células secretoras de factores de crecimiento) y el fibrinógeno podrían jugar un papel determinante en la arteriosclerosis acelerada post-angioplastia, como iniciadores de los eventos crónicos.

Palabras clave: Plaqueta, fibrinógeno, fibrina, célula muscular lisa vascular, anticuerpos, coronarias, arteriosclerosis acelerada, reestenosis.

Royo Bargués T, Berrozque Martínez M, Vidal Tramunt M, Badimon Maestro J J, Badimon Maestro L
Plaquetas, fibrinógeno y fibrina en la arteriosclerosis coronaria acelerada
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 52-65

Correspondencia:

Profesora Lina Badimon
Dept. Patología Molecular y Terapéutica
CID (CSIC)
Jordi Girona, 18-26
08034 Barcelona

ABSTRACT

Platelet interaction to damaged vessel wall occurs with reperfusion after revascular interventions. Restenosis post-angioplasty could be defined as an early cellular recognition that could regulate the response to the reperfusion intervention. The specific objectives of this work were focused on the *in vivo* characterization of the interaction of cellular elements (platelets) and blood proteins (fibrinogen and fibrin) with the vascular vessel wall postangioplasty in the porcine model. We have studied by immunohistochemistry coronary arteries from angioplasty-treated pigs sacrificed at different time intervals after intervention. The immunodetection of platelets was performed by polyclonal antibodies raised against porcine platelets. Fibrinogen was immunolabeled with a commercial polyclonal antibody, while fibrin was identified by a monoclonal antibody given by Gaffney's group. Our results show that not only platelets but also fibrinogen and fibrin are always present on the dilated area although in different relative proportions, and increased with respect to controls. Fibrinogen, which is a soluble protein, penetrates into the injured vessel wall and may increase the mitogenic stimuli on vascular smooth muscle cells. Both platelets (growth factor secreting cells) and fibrinogen may play a determinant role in accelerated atherosclerosis post-angioplasty, as early triggers of the chronic events.

Key words: Platelet, fibrinogen, fibrin, vascular smooth muscle cells, antibodies, coronaries, accelerated atherosclerosis, restenosis.

Royo Bargués T, Berrozque Martínez M, Vidal Tramunt M, Badimon Maestro J J, Badimon Maestro L
Platelets, fibrinogen and fibrin in accelerated coronary atherosclerosis
Mapfre Medicina, 1997; 8 (Supl. III): 52-65

¹ Investigador Institut de Recerca Hospital de la Sta. Creu i San Pau, Barcelona

² Becaria Predoctoral Laboratorios Glaxo/CSIC

³ Técnico Superior del Consejo Superior de Investigaciones Científicas

⁴ Associate Professor Medicine, Cardiovascular Institute, Mount Sinai Hospital, New York, USA

⁵ Director del Centro de Investigación Cardiovascular, CSIC-HSCSP-UAB, Barcelona

INTRODUCCIÓN

La migración de las células musculares lisas vasculares (CMLV) de la pared arterial desde la capa media a la íntima y su proliferación en la íntima son los mecanismos principales de la formación acelerada de placas ateroscleróticas en las arterias coronarias tras intervenciones de preservación miocárdica (angioplastia mediante balón o láser, aterectomía, pontajes coronarios) y después de trasplante cardíaco. Este proceso conocido como reestenosis ocurre en un 30-40% de las intervenciones coronarias, lo que significa que se trata de una complicación secundaria a la intervención de gran gravedad y para la cual no existe un abordaje terapéutico efectivo hasta el momento actual.

En el conjunto de intervenciones cardiovasculares destaca la angioplastia o técnica de recanalización vascular mediante balón por ser de aplicación muy frecuente y técnicamente muy bien establecida, y que permite unos resultados favorables inmediatos para el paciente post-intervención. No obstante, la reestenosis es la mayor limitación de la angioplastia mediante balón.

La angioscopia coronaria realizada inmediatamente después de la angioplastia muestra desgarros y fisuras en la placa aterosclerótica y trombo mural asociado (no identificable por angiografía) en el 70-80% de los pacientes que reciben dosis estándar de heparina e inhibidores plaquetarios habituales (1). Por tanto, la existencia de un trombo mural suboclusivo ocurre en la mayoría de pacientes a pesar de la terapia anticoagulante y administración de inhibidores de plaquetas. Tales observaciones en humanos son consistentes con estudios experimentales realizados en el modelo porcino que muestran que la administración de heparina con o sin inhibidores de plaquetas no previene en su totalidad la formación de trombo mural suboclusivo después de angioplastia con balón (2, 3).

Especímenes de aterectomía procedentes de lesiones reestenóticas obtenidas entre los 15-30 primeros días post-angioplastia muestran la presencia de trombo en un 65% de los pacientes e hiperplasia intimal de CMLV en el 75% de los pacientes. No hay relación entre la presencia de trombo y el tipo de terapia antitrombótica administrada (4). Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica se ha puesto en evidencia la presencia de células del mesenquima primitivo (tinción positiva para vimentina) que no se han diferenciado aún en fibroblastos, o CMLV. En especímenes de pacientes con reestenosis obtenidos por aterectomía 30 días después de la angioplas-

tia, se ha observado más colágeno y matriz extracelular, presumiblemente sintetizada por fibroblastos y CMLV.

Muestras procedentes de autopsias de pacientes que murieron en diferentes periodos post-angioplastia y por causas diversas relacionadas mostraron fisuras, desgarros y disecciones dentro o alrededor de la placa, en la pared arterial normal, y en la lámina interna dentro de la túnica media, así como la presencia asociada de trombo intraluminal o intramural suboclusivo. El trombo estaba asociado a roturas o desgarros en la placa o en zonas normales de la pared del vaso.

La proliferación y migración de las CMLV desencadenadas por la lesión arterial aguda son procesos independientes y pueden dividirse en tres fases, a partir de datos experimentales. La fase I representa la primera etapa de proliferación e hipertrofia y alcanza un máximo a las 48 horas en células musculares lisas de la media. La fase II es la fase intermedia de proliferación de las células musculares lisas y se extiende entre los 4 y los 14 días. Las CMLV migran desde la media a la íntima, y aproximadamente la mitad proliferan dentro de la íntima. La fase III o más tardía de la proliferación se inicia a partir de las dos semanas. En esta etapa la proliferación es menor y predomina la hipertrofia y producción de matriz extracelular (5-8).

Los mecanismos de proliferación celular, especialmente en relación a la arteriosclerosis acelerada, requieren de un exhaustivo estudio. Inhibidores específicos de factores de crecimiento deben ser evaluados en modelos animales de lesión arterial que reproduzcan muy fielmente la lesión en humanos y deben ser probados con o sin terapia antitrombótica específica. Finalmente, los estudios en el modelo porcino o en primates nos aproximan más estrechamente a los eventos que tienen lugar en la patología humana (9).

El objetivo de este trabajo es estudiar los eventos agudos inducidos por la revascularización en el desarrollo de la hiperplasia en un modelo experimental de relevancia para la patofisiología humana.

MATERIAL Y MÉTODOS

Modelo animal y técnica operatoria

Se seleccionó el cerdo como modelo experimental debido a que su sistema de coagulación, anatomía cardiovascular y perfil lipoproteico se asemeja más estrechamente al modelo humano

que el resto de animales de experimentación (10). En este modelo animal se desarrolla arteriosclerosis espontáneamente y la enfermedad puede ser incluso sintomática, incluyendo infartos cerebrales y de miocardio (11-13). Además, las características topográficas y patológicas de las lesiones son muy similares a las observadas en humanos. La ausencia de lesiones arterioscleróticas en el momento de la intervención, lo que podría considerarse una desventaja del modelo propuesto, ha sido cuidadosamente seleccionado para obtener datos claros sobre la interacción plaqueta/pared vascular y la respuesta de crecimiento de la CMLV.

La técnica de angioplastia en el modelo experimental porcino se ha usado con anterioridad en nuestro grupo en estudios de interacción plaqueta/pared vascular en angioplastia de las carótidas y coronarias, y en estudios sobre trombosis y arteriosclerosis (14-18). Los animales, de la raza Yorkshire Albino de 30-35 kg, fueron anestesiados con pentobarbital (10 mg/kg de peso), e intubados y ventilados mecánicamente con aire. La angioplastia se realizó en las arterias coronarias usando un balón de 4 mm de diámetro y 20 mm de longitud. Se realizaron 3 inflaciones a 8 atmósferas durante 15 seg, con 60 seg de descanso entre inflaciones. En los animales sometidos a angioplastia se controlaron las constantes cardíacas y respiratorias, y se mantuvieron con respiración asistida hasta el momento de la necropsia (14-18).

Tiempos de estudio

Los tiempos de estudio seleccionados entre la realización de la angioplastia y el sacrificio de los animales fueron de 30 min, 1, 2, 4 y 6 horas. En estos periodos es posible estudiar los eventos tempranos o iniciales que condicionan los cambios funcionales en la CMLV que serán responsables de la reestenosis post-angioplastia. Se destinaron dos animales a cada uno de los tiempos seleccionados.

Selección de muestras

La angioplastia se practicó en las arterias coronarias derecha y circunfleja, reservando la coronaria descendente izquierda como control de coronaria sin dilatación mecánica. De cada uno de los vasos, excepto del control, se separaron tres fragmentos: porción proximal a la zona de dilatación, porción distal y zona de angioplastia o dilatación.

Preparación de anticuerpos policlonales específicos frente a plaquetas porcinas

Como inmunógenos para la producción de anticuerpos anti-plaqueta de cerdo se prepararon plaquetas intactas que fueron activadas en muestras independientes con trombina, ADP y colágeno, y se reservó una muestra de plaquetas no activadas, obteniendo un total de cuatro inmunógenos distintos.

Se extrajeron 50 ml de sangre de cerdo por punción femoral y se recogieron en presencia de ACD adicionado de 25 µg/ml apyrase (Sigma). La sangre se centrifugó a 250g 10 min, a 20 °C. En el sobrenadante se recuperó el plasma rico en plaquetas o PRP que se centrifugó a 1.000g, 15 min, a 20 °C. El pellet de plaquetas se resuspendió en tampón de lavado (ácido cítrico 36 mM, KCl 5 mM, CaCl₂ 2 mM, MgCl₂ 1 mM, NaCl 0, 103 mM, apyrase 25 µg/ml, albúmina bovina (BSA) 3,5 mg/ml, pH 6,5) adicionado de heparina 5 U/ml y se cuantificó su número mediante un contador hematológico (Sys 9.000, Serono). A continuación se centrifugó la muestra a 1.000g, 15 min, a 20 °C. El pellet resultante se sometió a un segundo lavado con el mismo tampón no adicionado de heparina y se realizó un nuevo conteo de plaquetas. Tras una nueva centrifugación en las mismas condiciones, las plaquetas aisladas y lavadas se resuspendieron en 2 ml de tampón Tyrode (Na H₂PO₄ 0,4 mM, NaHCO₃ 12 mM, NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, MgCl₂ H₂O 1 mM, CaCl₂ 2H₂O 2 mM, D-glucosa 5,5 mM, pH 7,35) atemperado a 37 °C y se efectuó un nuevo conteo. La concentración final se ajustó a 2 x 10⁶ plaquetas/µl.

Se prepararon a partir de la misma muestra cuatro lotes de plaquetas: 1) *no activadas* (tratadas con solución tampón); 2) *activadas con trombina* (4 U/ml); 3) *activadas con ADP* (20 µM); 4) *activadas con colágeno* (5 µg/ml). Las plaquetas se incubaron a 37 °C 4 min y se centrifugaron a 1.000g, 10 min, a 20 °C. El pellet obtenido se resuspendió en tampón adicionado de un 0,25% de glutaraldehído fijar las plaquetas. Transcurridos 20 min se centrifugaron en las condiciones ya indicadas, el pellet resultante se sometió a dos lavados sucesivos con tampón fosfato salino (PBS) a 37 °C y finalmente se resuspendió en un volumen adecuado de PBS.

Inmunización de conejos

Como animal a inmunizar se utilizó el conejo. Se partió de un total de 7 animales (R₁-R₇), dos para cada tipo de muestra excepto para las plaque-

tas no tratadas con activador, inyectando una dosis de 250 x 10⁶ plaquetas/animal en cada una de las fases del protocolo de inmunización. La administración se realizó por vía subcutánea mediante inyecciones múltiples.

La administración del antígeno se inició el día 0 del periodo de inmunización, partiendo de un volumen de antígeno de 0,5 ml adicionado de 0,5 ml de Adyuvante Completo de Freund. La inyección se realizó en la zona dorsal en múltiples dosis de 100-150 µl. Los días 14 y 28 contados a partir del día 0 desde el comienzo del protocolo se administró una nueva dosis del antígeno emulsionado en Adyuvante Incompleto de Freund, en la misma proporción de volúmenes. Transcurridos 7-12 días desde la última inyección se procedió a extraer muestras de sangre y purificar los anticuerpos como fracción de γ-globulinas.

Purificación de anticuerpos

Se extrajeron 30 ml de sangre de cada animal a partir de la vena marginal de la oreja tras vasodilatación con xilol e incisión longitudinal con bisturí. La sangre se mantuvo a temperatura ambiente durante 45 min y una vez coagulada se dejó una hora a 4 °C para favorecer la retracción del coágulo. Para separar la fracción de suero se centrifugó a 2.500g durante 30 min.

La purificación de la fracción de γ-globulinas se realizó mediante fraccionamiento con sulfato amónico al 40% de saturación según protocolo descrito (19). Los diferentes lotes de anticuerpos se repartieron en alícuotas de 100 µl y se almacenaron a -20 °C. La concentración de proteína de cada una de las muestras de anticuerpos se determinó por la técnica de Bradford (20).

Análisis de los anticuerpos por enzimoimmunoensayo (ELISA)

Para valorar la producción de anticuerpos frente a los inmunógenos inyectados, el título de la inmunorreacción y la existencia o no de reacción cruzada con otros antígenos, se aplicó la técnica de ELISA. Se ensayaron diferentes concentraciones de antígeno y de anticuerpo en placa de 96 pocillos. La reacción antígeno-anticuerpo se detectó con un anticuerpo secundario conjugado a peroxidasa (DAKO P448) que reacciona con las inmunoglobulinas de conejo. La reacción final colorimétrica se llevó a cabo con la mezcla de sustratos DMAB (ácido 3-dimetilaminobenzoico) y MBTH (clorhidrato de 3-metil-2-benzotiazolin hi-

drazona) que en presencia del enzima peroxidasa dan un producto de color azul. La intensidad del color se cuantificó mediante lectura de la absorbancia en un lector de placas de ELISA (595-600 nm).

Análisis de los anticuerpos por inmunoblot

Para desarrollar la técnica de inmunoblot o Western-blot se prepararon extractos de proteína de plaquetas porcinas procedentes de cuatro tipos distintos de plaquetas: no activadas o bien activadas con trombina, ADP o colágeno. Los extractos se obtuvieron mediante solubilización de las proteínas con un tampón compuesto de Tris-HCl 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, N-etilmaleimida 5 mM, pH 7,0 conteniendo un 2,5% de SDS. Tras centrifugación y recuperación de la fracción sobrenadante, las muestras se alícuotaron y almacenaron a -20 °C. La proteína se cuantificó por la técnica de Bradford (20).

Los extractos de plaquetas procedentes de dos cerdos distintos se sometieron a electroforesis en geles de PAGE-SDS en gradiente entre un 4-15% (Bio-Rad) en condiciones reductoras y no reductoras, es decir, en presencia y ausencia de β-mercaptoetanol. Las bandas de proteína resueltas en la electroforesis fueron transferidas a membrana de nitrocelulosa donde se desarrolló la incubación con los diferentes anticuerpos anti-plaqueta (dilución 1:500). Para revelar la reacción antígeno-anticuerpo se utilizó proteína A marcada con I-125 (0,1 µCi/ml), que se une a los anticuerpos a través del fragmento Fc de las inmunoglobulinas. Las bandas de proteína que reaccionaron positivamente con los anticuerpos fueron detectadas por exposición del filtro a placa autorradiográfica en presencia de placa intensificadora a -80 °C.

Análisis inmunohistoquímico de las muestras de coronarias

Las muestras de tejido fueron fijadas en solución de PBS 100 mM/4% paraformaldehído, pH 7,4. Se mantuvieron en solución fijadora durante un mínimo de 6 horas, a 4 °C y en agitación. Después de dos lavados con PBS durante 30 min, a 4 °C en agitación, las muestras fueron crioprotectadas mediante lavado en solución de PBS 100 mM/30% sacarosa, pH 7,4 a 4 °C en agitación. Finalmente, se procedió al montaje y congelación en OCT sobre nieve carbónica y se almacenaron a -20 °C.

La preparación de cortes por criotomía se realizó a una temperatura de -30°C . Los cortes de tejido de 4-5 μm se recogieron sobre portas gelatinizados y se guardaron congelados a -20°C hasta su utilización.

La presencia de plaquetas, fibrinógeno, fibrina, α -actinas y factor de von Willebrand (FvW) en los cortes de vasos coronarios se analizó mediante la técnica de inmunofluorescencia indirecta y doble marcaje, utilizando anticuerpos secundarios conjugados a fluoresceína o rodamina para detectar las zonas de reacción entre el antígeno y el anticuerpo primario específico (monoclonal o policlonal).

Los cortes de tejido recogidos sobre porta se secaron previamente sobre una plancha a 45°C durante 15 min. Una vez fríos, se efectuó un lavado con solución de PBS 100 mM, pH 7,4, 10 min. Para permeabilizar las muestras y favorecer la penetración de los anticuerpos se realizó un lavado de 10 min en PBS 100 mM/Tritón X-100 0,1%, pH 7,4. A continuación se incubaron con solución A de bloqueo (PBS 100 mM/Tritón X-100 0,1%/BSA 2%), durante 30 min y tras eliminar esta solución se incubó con el anticuerpo primario diluido en solución B (PBS 100 mM/Tritón X-100 0,1%/BSA 1%) durante dos horas a temperatura ambiente y en cámara húmeda. Las diluciones de trabajo de los diferentes anticuerpos primarios fueron: antiplaquetas 1:100; fibrinógeno 1:100 (DAKO A080); fibrina 1:50 (Gaffney, P et al.); α -actinas 1:50 (DAKO M851); FvW 1:100 (DAKO M082). Después de realizar dos lavados con solución de PBS/Tritón X-100 (3 x 5 min), se incubó con el anticuerpo secundario correspondiente conjugado a fluoresceína o rodamina (dilución 1:50 en solución B) durante una hora y protegiendo de la luz. Finalmente, se lavaron los cortes con PBS (4 x 10 min) y se montaron en Glycergel (DAKO) para su observación en microscopio de fluorescencia.

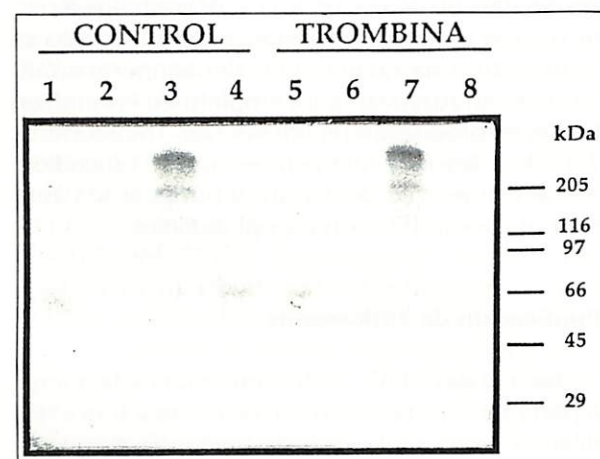
En el análisis inmunohistoquímico se aplicó la técnica de doble marcaje utilizando un anticuerpo primario monoclonal y otro policlonal simultáneamente, y un anticuerpo secundario específico contra cada uno de ellos conjugados a fluoresceína o rodamina. Su detección se realizó mediante el uso de filtros adecuados en la microscopía de fluorescencia.

RESULTADOS

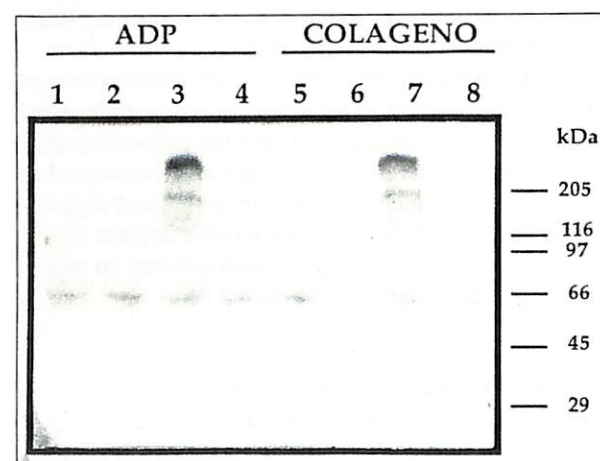
Anticuerpos específicos anti-plaqueta

El análisis de los anticuerpos frente a plaquetas porcinas mediante la técnica de ELISA indicó

que todos los conejos inmunizados con los diferentes tipos de antígenos (plaquetas activadas o no activadas) reaccionaban con plaquetas de cerdo. Además, estos anticuerpos eran capaces de reaccionar con plaquetas fijadas con glutaraldehído así como con plaquetas frescas no fijadas. En todos los casos, los anticuerpos reaccionaron con el inmunógeno o plaquetas independientemente de las condiciones de activación a las que se so-



A



B

Figura 1. Western-blot de extractos de proteína de plaquetas de diferentes especies con anticuerpos antiplaqueta porcina (R_2). 50 μg de proteína de extractos de plaquetas de rata (A y B: carril 1, 5), perro (A y B: carril 2, 6), cerdo (A y B: carril 3, 7) y humanas (A y B: carril 4, 8) fueron desarrollados electroforéticamente en geles de poliácridamida-SDS en gradiente entre el 4-15% y transferidos a filtro de nitrocelulosa. Se analizaron cuatro lotes de plaquetas para cada especie, uno control y tres procedentes de la activación con trombina, ADP o colágeno. La escala de pesos moleculares de las proteínas marcadoras se indica en kDa.

metieron. Asimismo, se comprobó que la inmunoreacción era específica frente a plaquetas de cerdo ya que los anticuerpos no reconocían proteínas características de plaquetas de otras especies como rata, perro y humanas (Figura 1).

En la Figura 2 se muestra un gráfico de barras en el que se observa que todos los sueros (R_1 - R_7) presentaron un título alto de anticuerpos (barras sombreadas) en comparación con los correspondientes sueros pre-inmunes de estos mismos animales (barras blancas).

La técnica de Western-blot nos ha permitido identificar las bandas de proteína de los extractos de plaquetas porcinas que reaccionan con los anticuerpos obtenidos en nuestro laboratorio. Estos extractos proteicos de plaquetas se desarrollaron electroforéticamente en presencia o no de agentes reductores en el tampón de muestras (la presencia de agentes reductores modifica la movilidad electroforética de las glicoproteínas de membrana por rotura de puentes disulfuro). Los resultados globales indican que los anticuerpos reconocen múltiples bandas de proteína con pesos moleculares que abarcan un rango entre 45 y más de 200 kDa, predominando las proteínas de alto peso molecular. En la Figura 3 se presentan dos autorradiografías correspondientes a mues-

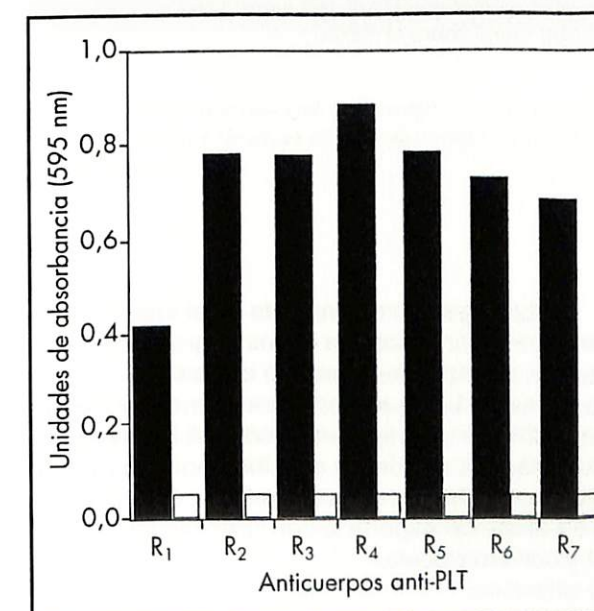
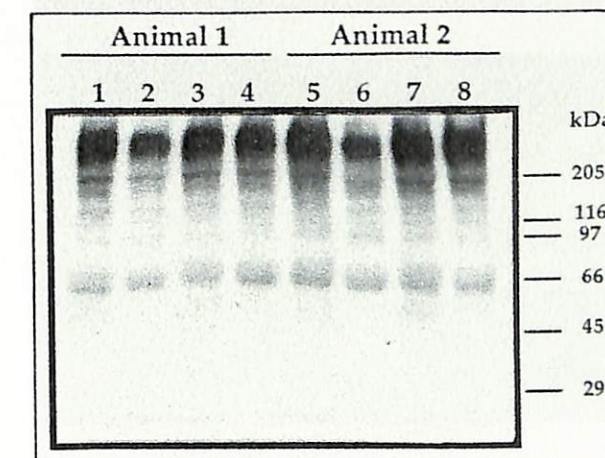


Figura 2. Análisis de los anticuerpos anti-plaqueta (anti-PLT) porcina por ELISA. Plaquetas aisladas frescas fueron sembradas en placas de 96 pocillos e incubadas en presencia de diferentes lotes de anticuerpos anti-plaqueta porcina (R_1 - R_7). Cada anticuerpo (barras sombreadas) se comparó con el correspondiente suero pre-inmune (barras blancas).

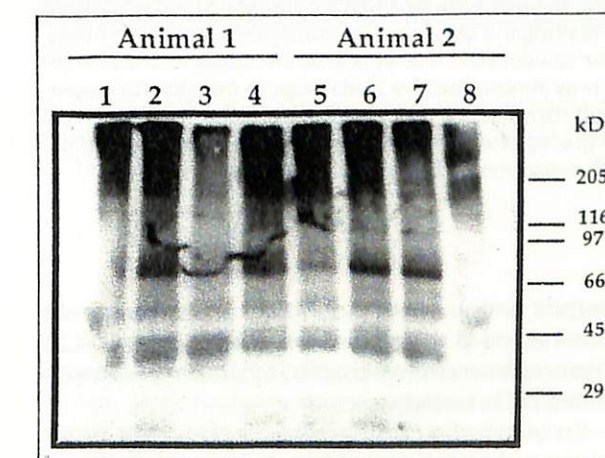
tras de dos cerdos analizadas mediante Western-blot con uno de los anticuerpos antiplaqueta, según condiciones indicadas previamente.

Caracterización de la respuesta aguda a la angioplastia

En el análisis inmunohistoquímico de las muestras (Figuras 4-11) se observa que nuestros anti-



A

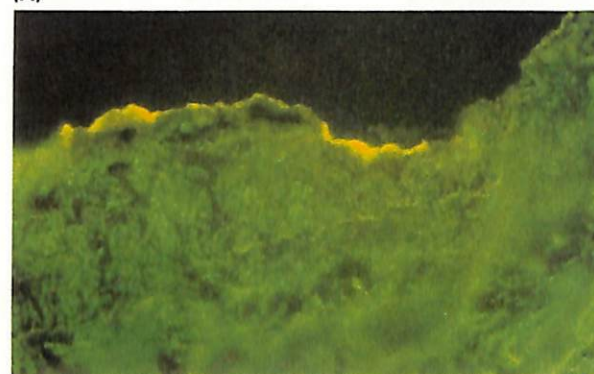


B

Figura 3. Western-blot de extractos de proteína de plaquetas porcinas en condiciones reductoras y no reductoras. 40 μg de proteína de extractos de plaquetas procedentes de dos animales fueron desarrollados electroforéticamente en geles de poliácridamida-SDS en gradiente entre el 4-15% en presencia (A) o ausencia (B) de agentes reductores y transferidos a filtro de nitrocelulosa. Se utilizaron plaquetas no activadas o control (A y B: carril 1, 5), o activadas con trombina (A y B: carril 2, 6), ADP (A y B: carril 3, 7) o colágeno (A y B: carril 4, 8). La escala de pesos moleculares de las proteínas marcadoras se indica en kDa.



(A)

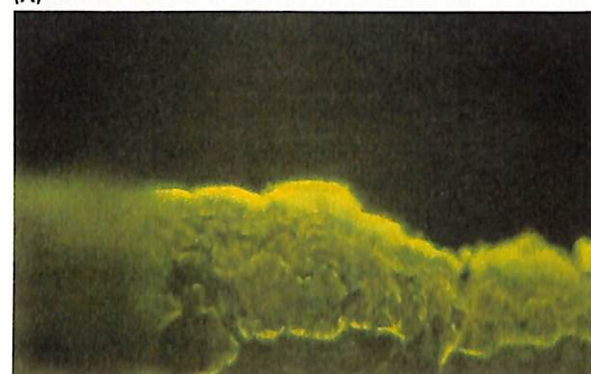


(B)

Figura 4. Doble marcaje con anticuerpos anti-fibrinógeno (A) y anti- α actina (B) de la misma preparación. Zona proximal a la dilatación en coronaria derecha, 60 minutos después de la angioplastia (40x). La deposición e infiltración de fibrinógeno (A) ocurre directamente sobre la capa muscular lisa del vaso rica en actinas (B). Obsérvese que la zona más inmunoreactiva al fibrinógeno (rojo intenso superficial) corresponde a la proteína depositada en superficie (A) que es evidente incluso en color amarillo con filtro para fluoresceína en la tinción de actinas (B).



(A)



(B)

Figura 5. Doble marcaje con anticuerpos anti-plaqueta (A) y anti-fibrina (B) en la misma preparación. Zona lesionada en la coronaria derecha, 60 minutos post-angioplastia (40x). Las plaquetas (rojo) y la fibrina (verde) co-localizan en un trombo mural sobre la lesión.

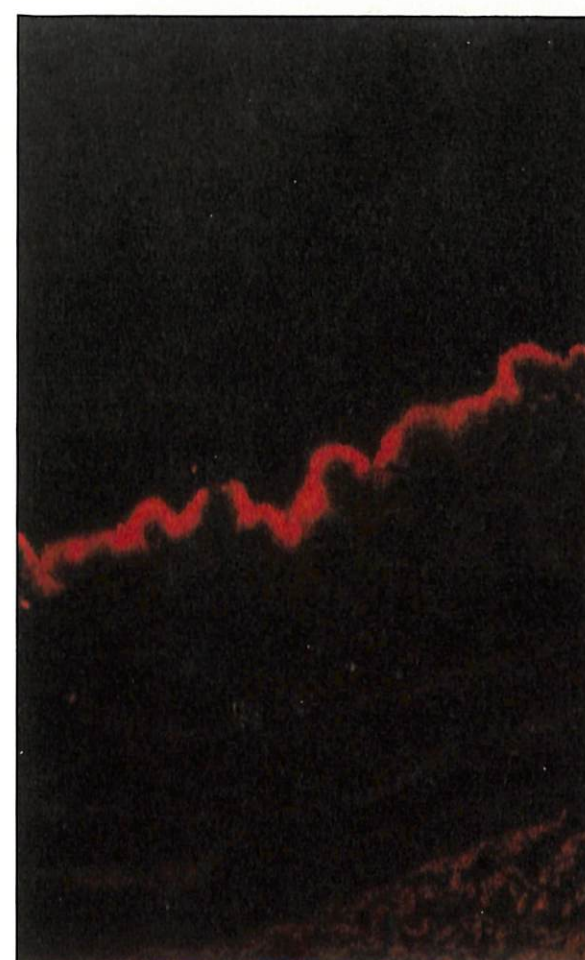
cuerpos antiplaqueta reconocen específicamente proteínas de la membrana plaquetar ya que no se observan reacciones cruzadas con otros componentes de la pared vascular.

En el estudio comparativo del marcaje inmunohistoquímico de las diferentes muestras de coronarias porcinas sometidas a angioplastia se evidencia que no sólo las plaquetas, sino también el fibrinógeno y la fibrina, están asociados a la pared vascular lesionada por la dilatación del balón. Su proporción relativa varía en función del grado de lesión en la zona de dilatación. La exposición de estructuras profundas de la pared induce una mayor deposición de trombo sobre el área de lesión. Las diferencias cuantitativas son significativas respecto a los fragmentos proximal y distal control.

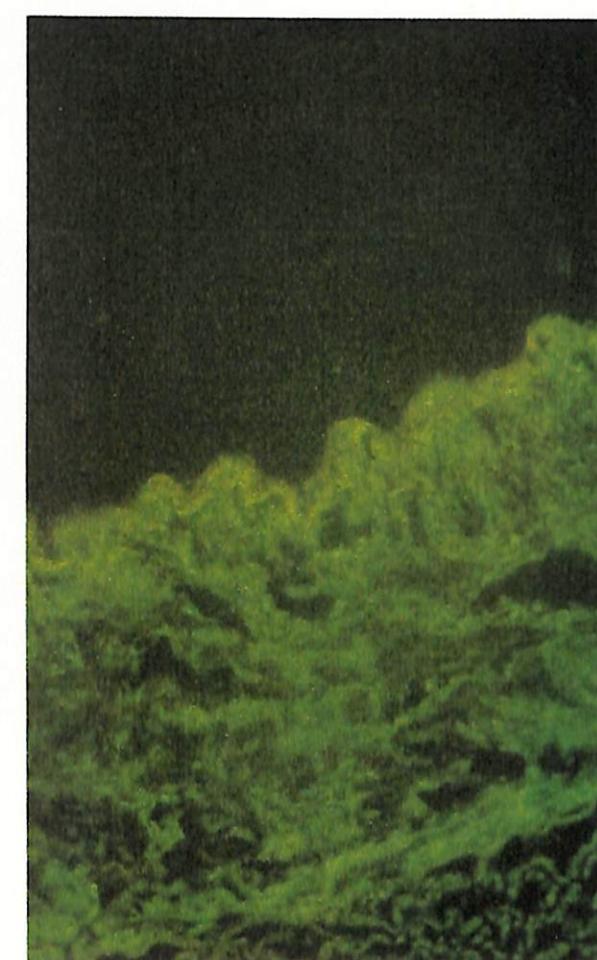
El fibrinógeno está presente en el interior de la pared vascular lesionada en los fragmentos de dilatación en todos los casos en que se exponen estructuras de la capa media coronaria, no siendo detectable en los fragmentos control. La fibrina no muestra este patrón de distribución sino que, al tratarse de una proteína no soluble, está presente en áreas de superficie con distribución irregular y con trombosis.

DISCUSIÓN

La técnica de ELISA ha permitido una primera caracterización de los anticuerpos anti-plaqueta de cerdo, pudiendo concluir que estos anticuerpos



(A)



(B)

Figura 6. Doble marcaje con anticuerpos anti-fibrinógeno (A) y anti- α actina (B). Zona con mínima lesión en la coronaria derecha, 60 minutos después de la angioplastia (40x). Obsérvese la deposición de fibrinógeno a lo largo de la superficie vascular expuesta al flujo.

reaccionan con las plaquetas de esta especie independientemente de que las plaquetas inyectadas hayan sido activadas con trombina, ADP o colágeno, o no activadas. Por tanto, reconocen proteínas de plaqueta que se mantienen en plaquetas previamente activadas como las que se depositan en los trombos. Su especificidad está demostrada ya que no reaccionan con plaquetas de especies más o menos próximas filogenéticamente. De ello se infiere que estos anticuerpos constituyen un instrumento útil para caracterizar la existencia de plaquetas en especímenes de tejido vascular porcino.

La presencia de un trombo post-intervención en la zona de angioplastia había sido reportada

con anterioridad (21). Plaquetas marcadas con In-111 (2, 3), fibrinógeno marcado con I-125 (2, 16) y la presencia de trombo se había evaluado macroscópicamente o mediante histología convencional (21). Sin embargo, la caracterización de los depósitos post-intervención mediante técnicas inmunohistoquímicas, tal como se muestra en este estudio, no había sido realizada. Este estudio ha permitido observar que el fibrinógeno penetra el tejido lesionado inmediatamente después de la intervención.

Las plaquetas se depositan formando desde pequeños acúmulos hasta trombos murales u oclusivos dependiendo del grado de lesión vascular. La fibrina co-localiza con las plaquetas pero nun-

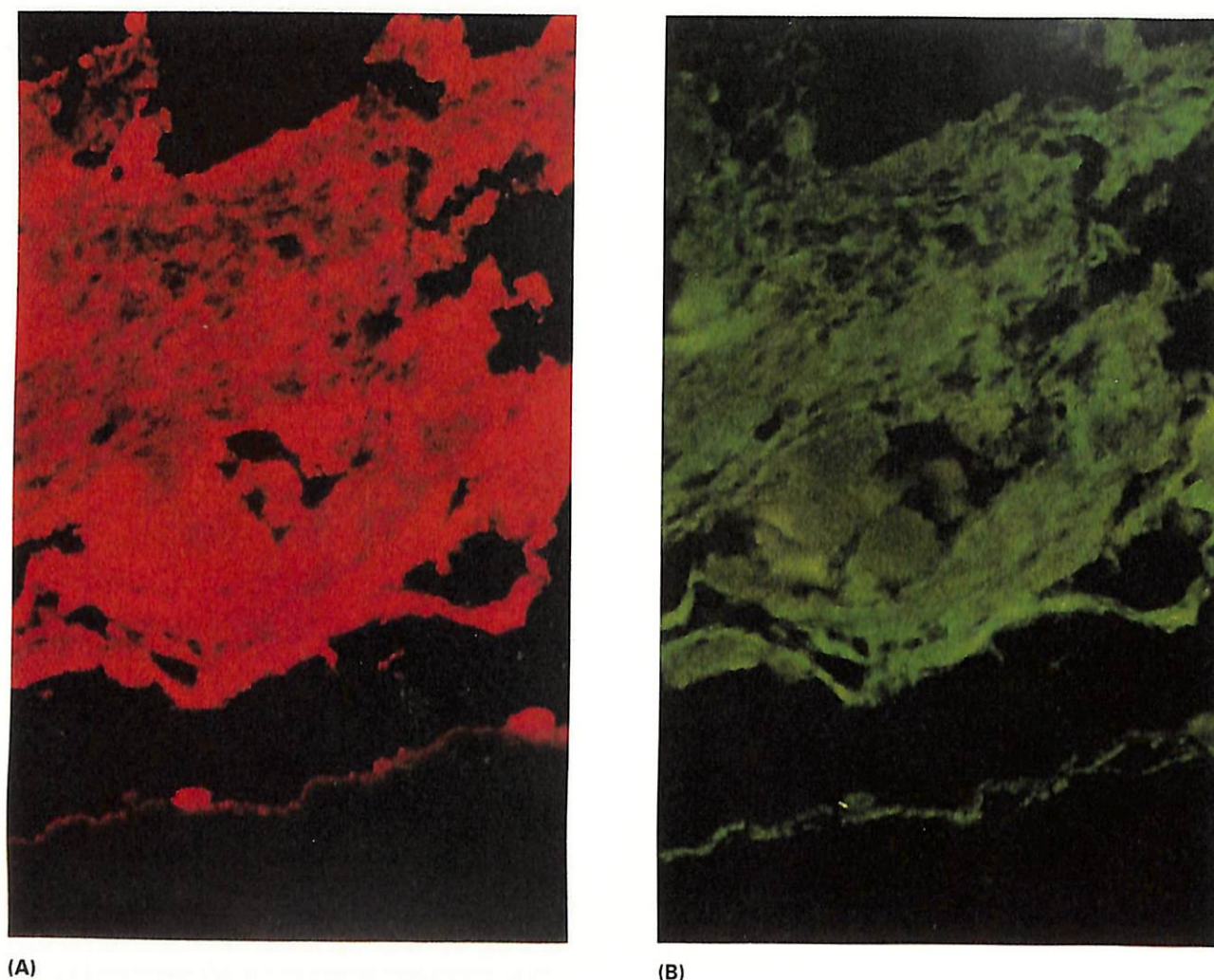


Figura 7. Doble marcaje con anticuerpos anti-factor de von Willebrand (A) y anti-fibrina (B) en la misma preparación. Zona con lesión profunda en la coronaria derecha, dos horas post-angioplastia (40x). Ejemplo de trombo semi-occlusivo que es rico en plaquetas (evidenciado por el FvW enlazando plaquetas) (A) y en fibrina (B).

ca se encuentra en zonas intraparietales en este estudio de seguimiento hasta seis horas post-intervención. La presencia de fibrina y fibrinógeno en la pared vascular ya se había detectado en placas arterioscleróticas nativas (22) pero no se había descrito en reestenosis.

La repercusión de la infiltración de fibrinógeno en la pared sobre el proceso de proliferación celular y reestenosis es aún desconocida. En estudios crónicos tras intervención (2 a 4 semanas) podrá observarse si la infiltración se mantiene o es un fenómeno agudo sólo ligado a cambios de permeabilidad del vaso tras la dilatación mecánica.

La presencia de trombos luminales de tipo oclusivo o mural sí parece tener implicaciones en la

reestenosis de la zona luminal subyacente pero el mecanismo desencadenante de este proceso es todavía desconocido.

Agradecimientos

Los autores agradecen al Dr. P. Gaffney (NIBSC, England) su donación de anticuerpos monoclonales anti-fibrina; y a los Dres. Antonio Fernández Ortiz (Hospital Clínico San Carlos, Madrid) y Beat Meyer (University Hospital Bern/Inselsspital, Switzerland), becarios postdoctorales con el Dr. Juan José Badimon en el Massachusetts General Hospital, Boston, por su participación en la inter-

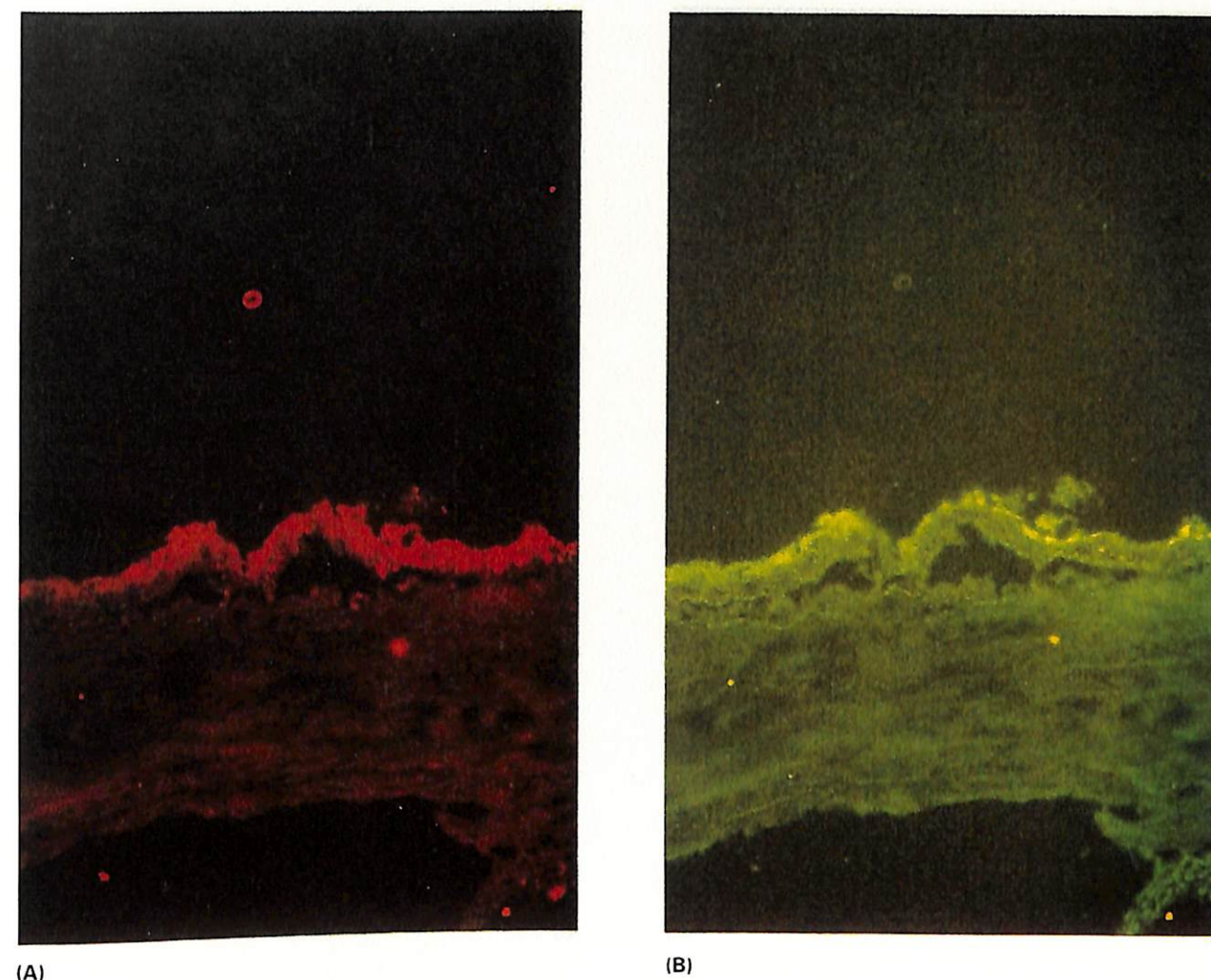


Figura 8. Doble marcaje con anticuerpos anti-plaqueta (A) y anti-fibrina (B). Coronaria derecha lesionada, seis horas post-angioplastia (20x). La deposición de fibrina y la de plaquetas co-localizan. No se encuentra fibrina intramural.

vención de animales que dió origen a la preparación de los especímenes vasculares. Este trabajo ha sido posible gracias a los Proyectos FIS 92/0114, CICYT SAF 94/0712, y a fondos proporcionados por la Fundación de Investigación Cardiovascular.

Los autores agradecen a la Fundación MAPFRE Medicina por la concesión de la Beca de Investigación que ha permitido la realización de este trabajo.

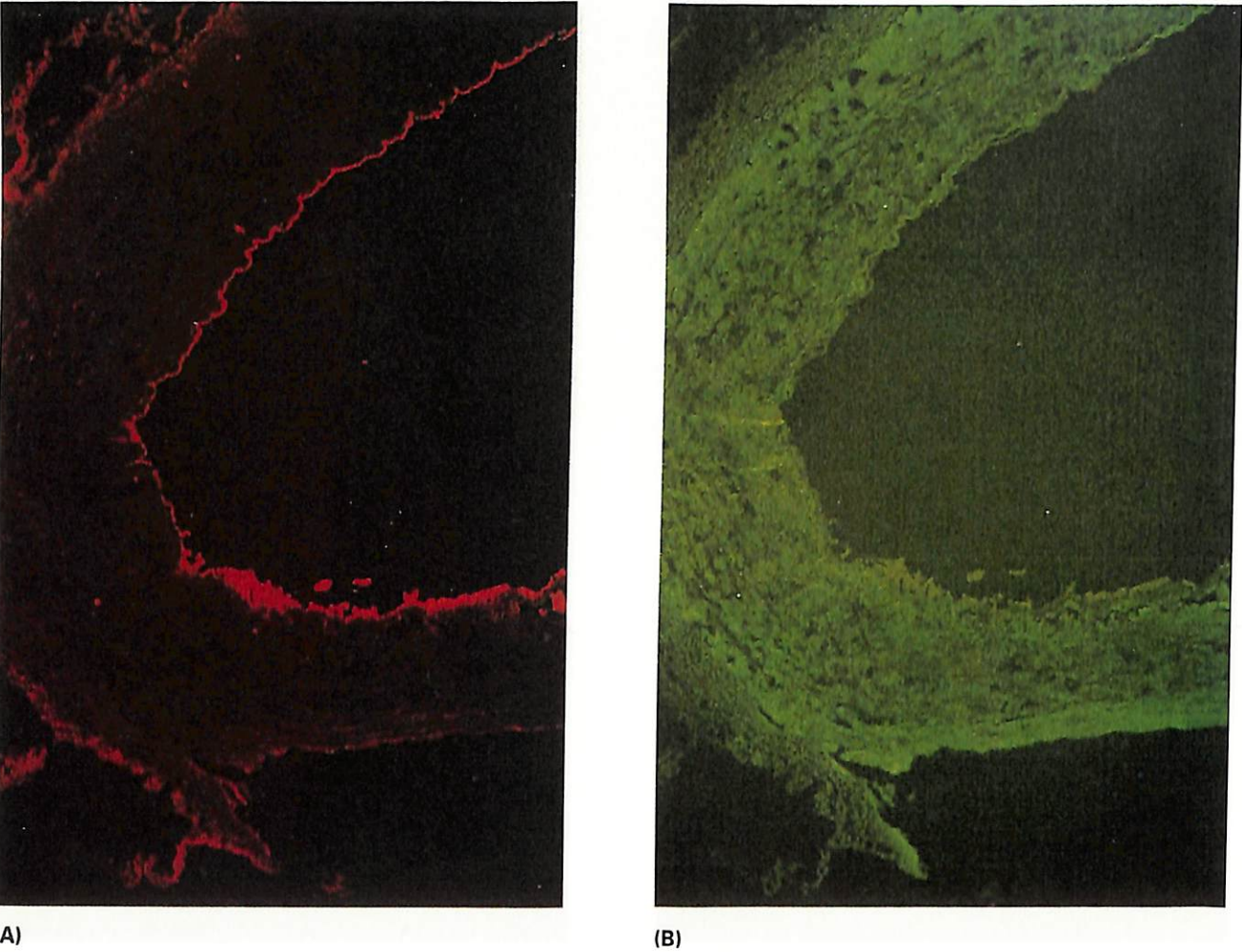


Figura 9. Doble marcaje con anticuerpos anti-fibrinógeno (A) y anti- α actina (B). Coronaria derecha con lesión mínima proximal a la zona de dilatación, seis horas post-angioplastia (10x). Obsérvese que la deposición de fibrinógeno es continua a lo largo de la zona de lesión.

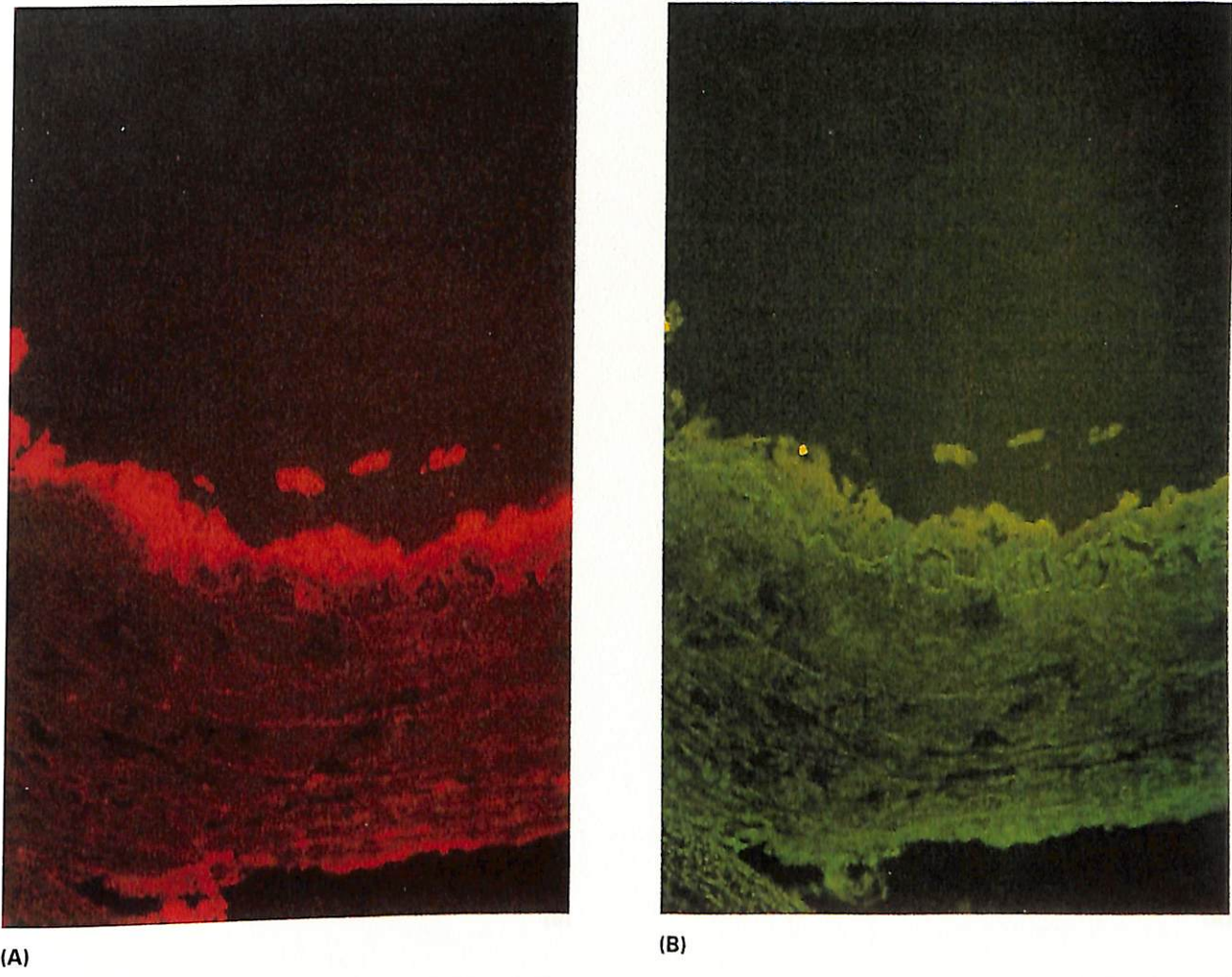


Figura 10. Magnificación de la figura anterior (20x). Obsérvese que el fibrinógeno penetra el vaso en la zona con mayor lesión.

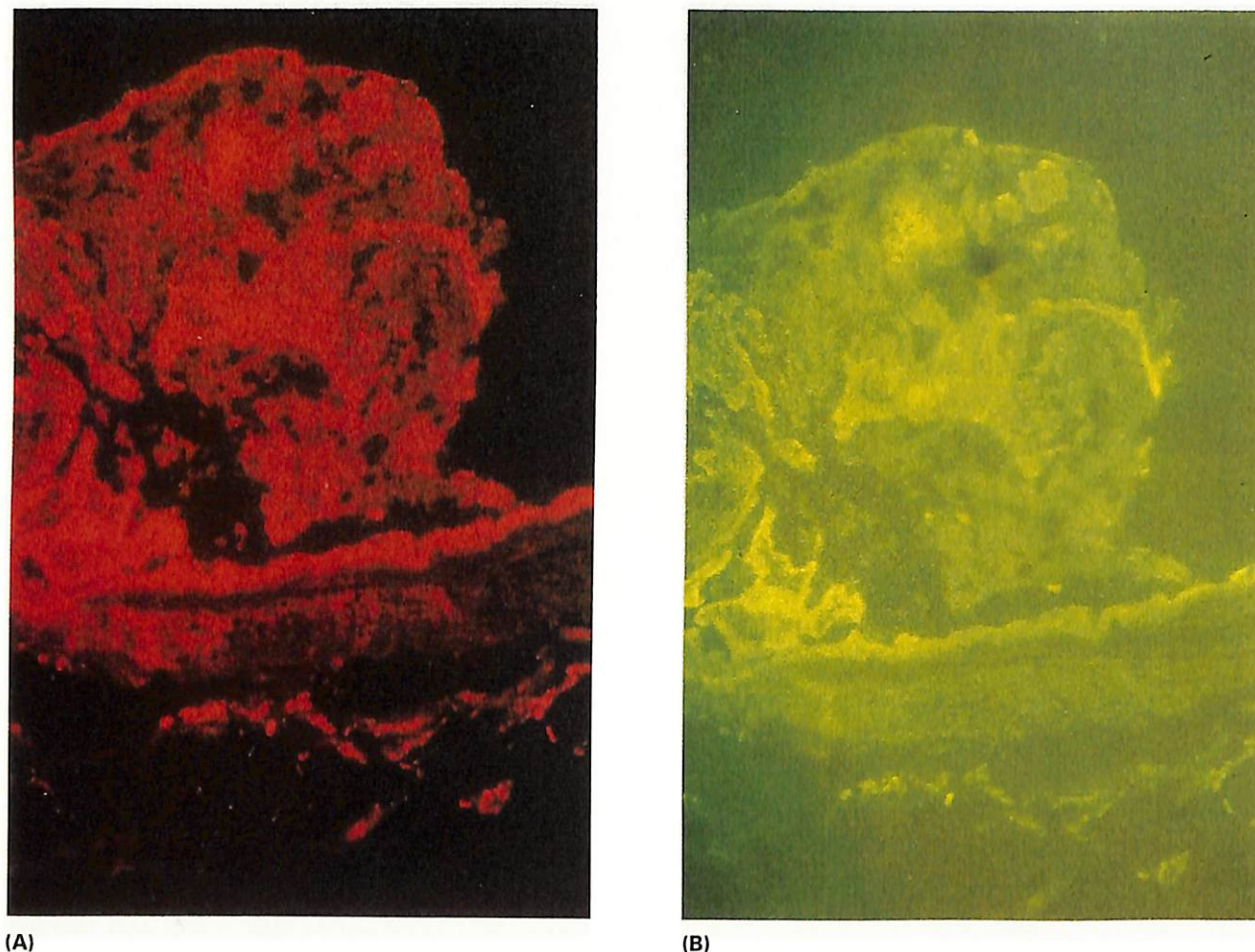


Figura 11. Doble marcaje con anticuerpos anti-fibrinógeno (A) y anti-fibrina (B). Coronaria derecha en zona de lesión severa, seis horas post-angioplastia (20x). Obsérvese la presencia de un trombo semi-oclusivo. Fibrina y fibrinógeno co-localizan en el trombo pero sólo el fibrinógeno ha penetrado en la pared del vaso.

BIBLIOGRAFÍA

1. UCHIDA Y, HASEGAWA K, KAWAMURA K, et al. Angioscopic observation of the coronary luminal changes induced by percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J.* 1989; 117: 769-776.
2. HERAS M, CHESEBRO J H, PENNY W J, et al. Effects of thrombin inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs: Heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor. *Circulation.* 1989; 79: 657-665.
3. LAM J Y, CHESEBRO J H, STEELE P M, et al. Anti-thrombotic therapy for arterial injury by angioplasty: Efficacy of common platelet-inhibitors versus thrombin inhibition in pigs. *Circulation.* 1991; 84: 814-820.
4. JOHNSON D E, HINOHARA T, SELMON M R, et al. Primary peripheral arterial stenoses and restenoses excised by transluminal atherectomy: A histopathologic study. *J Am Coll Cardiol.* 1990; 15: 419-425.
5. WEBSTER M W, CHESEBRO J H, GRILL D E, et al. Influence of deep and mild injury on smooth muscle cell proliferation after angioplasty. *Circulation.* 1991; 84 (suppl. 2): 296.
6. CHESEBRO J H, WEBSTER M W, ZOLDHELTY P, et al. Antithrombotic therapy and progression of coronary artery disease. *Circulation.* 1992; 86 (suppl. II): III-100-III-111.
7. MAJESKY M W, REIDY M A, BOWEN-POPE D F, et al. PDGF ligand and receptor gene expression during repair injury. *J Cell Biol.* 1990; 111: 2149-2158.
8. SNOW A D, BOLENDER R P, WRIGHT T N, et al. He-

- parin modulates the composition of the extracellular matrix domain surrounding arterial smooth muscle cells. *Am J Pathol.* 1990; 137: 313-330.
9. FERREL M, FUSTER V, GOLD H K, et al. A dilemma for the 1990's: Choosing the appropriate experimental animal model for the prevention of restenosis. *Circulation.* 1992; 85: 1630-1631.
10. FUSTER V, BADIMON L, BADIMON J J, et al. Experimental Approach to Vascular Disease in Swine with von Willebrand's Disease. En: Tumbleson M E (ed). *Swine in Biomedical Research.* New York: Plenum Publishing Corporation, 1986; 1527-1542.
11. FUSTER V, FASS D, KAYE M P, et al. Arteriosclerosis in normal and von Willebrand pigs: long-term prospective study and aortic transplantation study. *Circ Res.* 1982; 51: 587-593.
12. FUSTER V, LIE J, BADIMON L, et al. Spontaneous and diet induced coronary atherosclerosis in normal swine and swine with von Willebrand disease. *Arteriosclerosis.* 1985; 5: 67-73.
13. BADIMON L, STEELE P, BADIMON J J, et al. Aortic atherosclerosis in pigs with heterozygous von Willebrand disease. Comparison with homozygous von Willebrand and normal pigs. *Arteriosclerosis.* 1985; 5: 366-370.
14. STEELE P, CHESEBRO J H, STANSON A, et al. Balloon angioplasty. Natural history of the pathophysiological response to injury in a pig model. *Circ Res.* 1985; 57: 105-112.
15. HERAS M, CHESEBRO J H, PENNY W J, et al. Importance of adequate heparin dosage in arterial angioplasty in a porcine model. *Circulation.* 1988; 78: 654-660.
16. HERAS M, CHESEBRO J H, PENNY W J, et al. Effects of thrombin in inhibition on the development of acute platelet-thrombus deposition during angioplasty in pigs. Heparin versus recombinant hirudin, a specific thrombin inhibitor. *Circulation.* 1989; 79: 657-665.
17. HERAS M, CHESEBRO J H, WEBSTER M W, et al. Hirudin, heparin, and placebo during deep arterial injury in the pig. The in vivo role of thrombin in platelet-mediated thrombosis. *Circulation.* 1990; 82: 1476-1484.
18. MERINO A, COHEN M, BADIMON J J, et al. Synergistic action of severe wall injury and shear forces on thrombus formation in arterial stenosis: definition of a thrombotic shear rate threshold. *J Amer Coll Cardiol.* 1994; 24: 1091-1094.
19. DOUVAS A S, STUMPH W E, REYES P, et al. Isolation and characterization of nuclear ribonucleoprotein complexes using human anti-nuclear ribonucleoprotein antibodies. *J Biol Chem.* 1979; 254: 3606-3616.
20. BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 1976; 72: 248-254.
21. BADIMON L, CHESEBRO J H, BADIMON J J, et al. Arterial angioplasty: Thrombosis and Restenosis. *J Physiol Pharmac.* 1993; 44, 3: 89-192.
22. BINI A, FENOGLIA J J, MESA-TEJADA R, et al. Identification and distribution of fibrinogen, fibrin and fibrin degradation products in atherosclerosis. Use of monoclonal antibody. *Atherosclerosis.* 1989; 1: 109.

Normas para la publicación de artículos

La revista MAPFRE MEDICINA es una publicación de periodicidad trimestral, que es órgano de expresión de la FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA, aunque está abierta a la publicación de trabajos de autores ajenos a la entidad.

La revista publica artículos sobre las siguientes áreas:

- Traumatología y Cirugía Ortopédica.
- Rehabilitación.
- Medicina Cardiovascular.
- Medicina Preventiva.
- Medicina Clínica y del Trabajo.
- Gerencia Hospitalaria.

SECCIONES

Los autores que deseen colaborar en algunas de las secciones de la revista pueden enviar sus aportaciones (por triplicado) a la redacción de la misma, entendiéndose que ello no implica la aceptación del trabajo, que será notificada por escrito al autor.

El Comité Editorial podrá rechazar, sugerir cambios o llegado el caso, realizar modificaciones en los textos recibidos; en este último caso, no se alterará el contenido científico, limitándose únicamente al estilo literario.

Se entiende que una vez publicado un artículo en la revista, la propiedad del *copyright* pasará a ser de la revista, debiéndose solicitar autorización por escrito a la misma para proceder a su reproducción en cualquier otro medio. En estos casos, la revista informará al autor del artículo.

1. Editorial

Trabajos escritos por encargo del Comité Editorial, o bien, redactados por alguno de sus miembros.

Extensión: No debe ser superior a 8 folios mecanografiados a doble espacio; la bibliografía no debe contener una cifra superior a 10 citas.

2. Originales

Tendrán tal consideración aquellos trabajos, no editados anteriormente, ni remitidos simultáneamente a otra publicación, que versen sobre investigación, epidemiología, fisiopatología, clínica, diagnóstico o terapéutica, dentro de las áreas definidas con anterioridad.

Texto: Se recomienda no superar las 20 páginas mecanografiadas (30 líneas a doble espacio, con 60 caracteres por línea).

Tablas: Se aconseja una cifra máxima de 6 tablas.

Figuras: Se considera adecuada una cifra inferior a 8.

Bibliografía: Es aconsejable no superar las 50 citas.

Los criterios que se aplicarán para valorar la aceptación de los artículos serán el rigor científico metodológico, novedad, trascendencia del trabajo, concisión expositiva, así como la calidad literaria del texto.

3. Revisión

Serán trabajos que versen sobre algunas de las áreas declaradas anteriormente, encargados por el Comité Editorial, o bien, remitidos espontáneamente por el autor, cuyo interés o actualidad aconsejen su publicación en la revista.

En cuanto a los límites de extensión, se aconsejan los mismos definidos para los artículos originales.

4. Comunicación breve

Esta sección permitirá publicar artículos breves, con mayor rapidez. Ello facilita que los autores presenten observaciones, resultados iniciales de investigaciones en curso, e incluso realizar comentarios a trabajos ya editados en la revista, argumentando de forma más extensa que en la sección de cartas al Director.

Texto: Hasta un máximo de 8 folios, con las mismas características definidas.

Tablas y figuras: Hasta un máximo total de 4.

Bibliografía: Hasta 15 citas.

5. Imagen diagnóstica

En esta sección de la Revista se presentarán casos clínicos singulares en los que la imagen sea resolutoria. Para ello, se aportarán una, o como máximo dos imágenes, de un paciente o una zona del mismo (ECG, Rx, TAC, RM, ecografía, espectro electroforético, etc.), con expresividad clínica por sí misma diagnóstica, de cualquier rama de la Medicina y acompañada de un breve comentario fisiopatológico y/o clínico en relación con la imagen y entidad nosológica del caso. La extensión será menor de 15 líneas mecanografiadas a doble espacio.

Esta página se remitirá junto a otra, de presentación, con la siguiente información:

- Título: diagnóstico en español que sugiere la imagen.
- Nombre completo de los autores con la máxima calificación académica o profesional de los mismos.
- Centro de trabajo de los autores.
- Dirección para correspondencia y teléfono.

6. Correspondencia

Esta sección publicará la correspondencia recibida, que no necesariamente debe hacer mención a artículos ya editados en la revista, siempre que guarde relación con las definidas en la línea editorial.

En caso de que se realicen comentarios a artículos publicados anteriormente, se remitirá dicha correspondencia al primer firmante del artículo, para posibilitar una contrargumentación, teniendo en cuenta que si en el plazo de un mes no se recibe una respuesta, se entenderá que el/los autores del artículo objeto de correspondencia, declinan esta posibilidad.

En cualquier caso, el Comité Editorial de la revista podrá incluir sus propios comentarios.

Las opiniones que puedan manifestar los autores ajenos al staff editorial en esta sección, en ningún caso serán atribuibles a la línea editorial de la revista.

Extensión. Texto: Como máximo 3 folios, bibliografía incluida, hasta un total de 5 citas. No se adjuntarán tablas ni figuras.

7. Noticias

Esta sección dará difusión a las actividades de la Fundación MAPFRE-MEDICINA.

8. Agenda

Estará abierta a publicar notas de actividades científicas, que puedan tener interés para los lectores.

9. Literatura médica

PRESENTACIÓN DE ARTÍCULOS

1. Normas generales

1.1. Numere todas las páginas del texto, bibliografía incluida.

1.2. Numere las tablas en latinos, presentando en cada página una sola tabla, junto con el título de la tabla y explicación de las abreviaturas empleadas.

1.3. Numere las figuras en arábigos, según las siguientes instrucciones:

- Dibujos y esquemas: la calidad debe ser excepcional. Indique la numeración, así como la situación mediante una flecha orientada hacia el margen superior.

- Fotografías en papel: haga constar en una etiqueta adhesiva que situará en el dorso de la figura, el número de la misma, así como la indicación de cuál es el lado superior de la figura, mediante una flecha.

- Diapositivas: indique sobre el marco de las mismas, mediante un rotulador adecuado (indeleble) o bien con una etiqueta adhesiva, el número y lado superior de la misma. A continuación, introdúzcalas en las hojas de almacenamiento disponibles en el comercio, de forma que se evite en lo posible el extravío de las mismas.

1.4. Pies de figuras: Presente en hoja aparte, todos los textos explicativos de las figuras, numerados igualmente.

1.5. Inicie cada sección del artículo en hoja aparte. Para los artículos originales, éstas son: resumen, introducción, material y métodos, resultados y discusión. Se recomienda que el autor se responsabilice de la traducción del Resumen/Abstract, así como de la selección de las Palabras Clave/Keywords, que se presentarán junto al resumen.

1.6. Envíe tres copias completas (texto e ilustraciones) del artículo.

2. Página de presentación

La primera página del artículo aportará la siguiente información:

- Título en castellano y en inglés.
- Nombre completo de los autores, con la máxima calificación académica o profesional de los mismos.
- Centro de trabajo de los autores.
- Autor que se responsabiliza de la correspondencia, con la dirección de envío.
- Título abreviado del artículo, en no más de 40 letras, para la paginación.
- Número total de páginas del artículo.
- Número total de tablas.
- Número total de figuras.

Al enviarnos el artículo, compruebe que estos tres últimos ítems coinciden con el material que nos envía.

3. Resumen y Palabras Clave (Abstract, Keywords)

Presente en página aparte la versión en castellano y en inglés. Se recomienda encarecidamente cuidar la ortografía y sintaxis de la versión anglosajona, para evitar ulteriores correcciones.

Las Palabras Clave deben estar referenciadas en la lista del *Medical Subject Headings* del *Index Medicus*; se deben aportar en número de 3 a 10.

La extensión del resumen en castellano no debe exceder de 200 palabras. El contenido debe incluir la siguiente información:

- Objetivos del estudio.
- Procedimientos básicos empleados (selección de población, método de observación, procedimiento analítico).
- Hallazgos principales del estudio (datos concretos y significación estadística).
- Conclusiones del estudio, destacando los aspectos más novedosos.

4. Partes del texto

4.1. Introducción. Presentará los objetivos del estudio, resumiendo los razonamientos empleados, citando únicamente las referencias necesarias y sin realizar una revisión exhaustiva del tema. No deben incluirse las conclusiones del trabajo.

4.2. Material y métodos. Debe describir el procedimiento de selección de la población estudiada. Igualmente, se debe proporcionar la suficiente información como para que el estudio pueda ser reproducido por otro investigador, ello incluye la descripción de métodos, identificación de aparataje empleado (con nombre comercial, código y marca del fabricante), fármacos y productos químicos (nombre genérico, dosis y vías de administración), así como todos los procedimientos seguidos.

Se considera aconsejable emplear las unidades de medida reconocidas internacionalmente, para lo cual se puede consultar la siguiente referencia: *Ann. Intern. Med.* 1987; 106: 114-129.

Ética del estudio: En los estudios con población humana, debe especificarse si se realizó con aprobación del Comité de Ética, o en concordancia con los principios de la Declaración de Helsinki (1975, 1983).

Cálculos estadísticos: La descripción de los métodos estadísticos debería permitir a un lector que tuviera acceso a los datos originales comprobar los resultados del estudio.

Boletín de Suscripción

La FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA distribuirá su Revista a todas aquellas personas o entidades que soliciten recibirla, para lo cual deberán cumplimentar el boletín de suscripción adjunto y remitirlo a:

Revista MAPFRE Medicina
Ctra. de Pozuelo a Majadahonda, km. 3,5
MAJADAHONDA (28220 Madrid)

A/A. Secretaría de Redacción

Nombre:
Apellidos:
Dirección:
Teléfono:
Población:
Provincia: C.P.:

Centro de Trabajo:
Cargo:
Especialidad:
Teléfono:
Población:
Población:
Provincia: C.P.:

- ☐ Nueva Suscripción
☐ Cambio de Domicilio

4.3. Resultados: Los datos del texto no deben repetir íntegramente los datos de las tablas o gráficos; deben resumirse los aspectos más destacados, enfatizándolos.

4.4. Discusión: Deben destacarse los aspectos más notvedosos del estudio, así como las conclusiones que de él se extraen. Igualmente, se comentarán las implicaciones derivadas de los hallazgos y sus limitaciones, así como la trascendencia para futuras investigaciones. Relacione los resultados con los de otros estudios, contrastando los objetivos iniciales con los datos finales.

4.5. Agradecimientos: En el epígrafe de agradecimientos, puede mencionar a todas aquellas personas o entidades que de alguna forma hayan colaborado a la realización del estudio pero sin que pueda otorgárseles una plena autoría sobre el mismo.

5. Bibliografía

Las siguientes normas están redactadas en concordancia con el formato empleado por la *National Library of Medicine* de EE UU en el *Index Medicus*.

El cumplimiento de estas normas es imprescindible para la publicación de cualquier trabajo en la revista.

a) Numere las citas bibliográficas de forma correlativa a su aparición en el texto.

b) Los nombres de las revistas citadas deben estar abreviados siguiendo el estilo empleado en *Index Medicus* (consultar la lista de revistas indexadas, en *Index Medicus*, en el ejemplar de enero).

c) No son válidas como citas bibliográficas, las referencias del tipo «observación no publicada», o «comunicación personal».

Las comunicaciones escritas, pero no publicadas, pueden citarse únicamente en el texto, entre paréntesis.

Los artículos aceptados para publicación, pero no editados todavía, pueden incluirse entre las citas bibliográficas, especificando la revista y añadiendo entre paréntesis «en prensa».

Los artículos enviados a una revista, sin que exista todavía confirmación de su aceptación, pueden ser citados únicamente en el texto, acompañando la frase «observación no publicada» entre paréntesis.

d) Ejemplos de citas bibliográficas:

Revistas

Autor(es) (apellidos e iniciales del nombre). Título del artículo. *Nombre de la revista*. Año; volumen: páginas inicial y final.

Libros

1. Autor personal:

Autor (apellidos e iniciales del nombre). *Título del libro*. Ciudad de editorial. Editorial. Año; páginas inicial y final.

2. Capítulo del libro:

Autor(es) del capítulo (apellidos e iniciales del nombre). Título del capítulo. En: Autores del libro (eds.). *Título del libro*. Ciudad de editorial. Editorial. Año; páginas inicial y final.

3. Libro de Congresos:

Autor(es) (apellidos e iniciales del nombre). Título del artículo. En: *Título del libro de reunión*. Ciudad de edición. Editorial o editor del libro. Año; páginas inicial y final.



II Premio a «Toda una Vida Profesional»

BASES DE LA CONVOCATORIA

1. El objeto del premio es el reconocimiento social a una persona mayor de 65 años, por toda una fecunda vida profesional.
2. Las Instituciones, tanto públicas como privadas, pueden proponer candidatos a la Fundación MAPFRE Medicina (Ctra. de Pozuelo a Majadahonda, km. 3,5 - 28220 Majadahonda, Madrid, España), aportando dossier que detalle la labor social desarrollada a través de su actividad profesional.
3. El Jurado calificador del Premio estará compuesto por una Comisión creada al efecto, regida por el Presidente de la Fundación MAPFRE Medicina, o la persona en quien delegue.
4. El Jurado adoptará cuantas iniciativas crea oportunas, para contrastar la información sobre los candidatos propuestos.
5. El Premio podrá ser declarado desierto, en caso de que el Jurado considere que ninguno de los presentados reúne los requisitos de la convocatoria.
6. El plazo límite para presentar las solicitudes concluye el 30 de septiembre de 1997.
7. El fallo, que será inapelable, será dado a conocer en noviembre de 1997, en el III Congreso Nacional de Organizaciones de Mayores, que organizará la Fundación Independiente.
8. La presentación de candidaturas implica la aceptación de todas las bases de la convocatoria.

El premio se entregará en el
Congreso Nacional de Organizaciones de Mayores

INFORMACIÓN

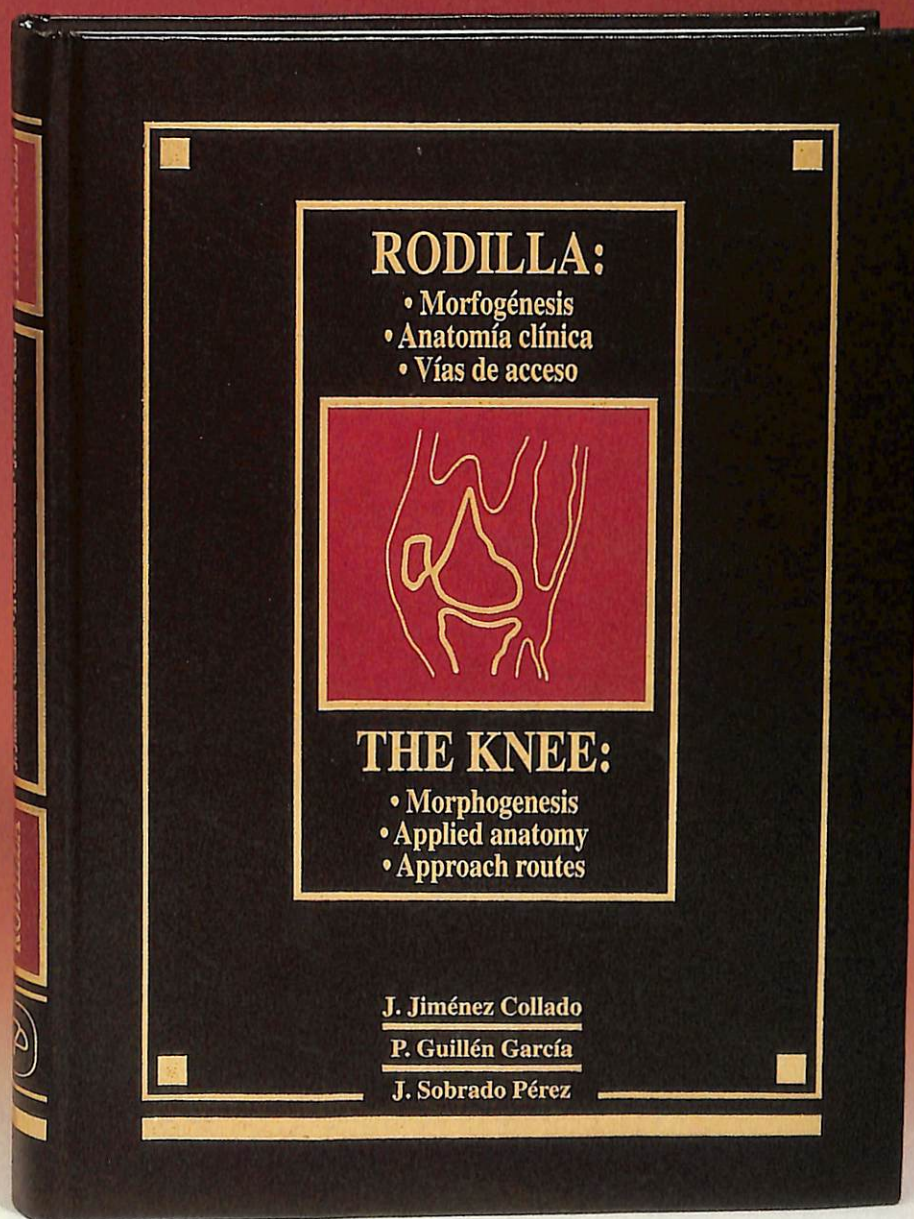
FUNDACIÓN MAPFRE MEDICINA
Ctra. de Pozuelo a Majadahonda, s/n
28220 Majadahonda (Madrid)
Tels.: (91) 626 57 04 - 626 58 52 - Fax: (91) 626 58 25

DOTACIÓN: 1.000.000 ptas.



Una obra sobre la rodilla sin precedentes en la literatura médica

Edición bilingüe: español-inglés



Pedidos a:



editorial MAPFRE S. A.

Sor Ángela de la Cruz, 6, 7.ª plta. - 28020 Madrid - Tel.: 581 53 60 - Fax: 581 18 83