



300627

UNIVERSIDAD LA SALLE

Escuela de Ciencias Químicas

Incorporada a la U.N.A.M.

27
23

**EFFECTO DEL FLUJO CORONARIO EN LA FUNCION CARDIACA
DE CORAZONES AISLADOS Y PERFUNDIDOS DE RATA**

**TESIS PROFESIONAL
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE**

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

PRESENTA

ANGELICA RODRIGUEZ MARTINEZ

Asesor de Tesis Dr. José D. Méndez

México, D. F.

1993

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

RESUMEN

Los objetivos de esta tesis fueron varios, primero fue el de estudiar el efecto del flujo coronario sobre la función cardíaca, el segundo ver el efecto del flujo sobre funciones como el intervalo A-V, ritmo ventricular espontáneo y contractilidad; y por último comprobar si los canales de potasio activados por estiramiento están participando en el efecto estimulador del flujo. Es importante aclarar que éste es el único parámetro que se está comparando, ya que por lo menos existen otros cuatro mecanismos propuestos para tratar de dilucidar los efectos estimuladores del flujo en el corazón.

Para cumplir nuestro objetivo se utilizó el modelo de corazón de rata perfundido a la manera de Langendorff, el cual permite mantener al corazón vivo y bajo condiciones adecuadas perfundiéndolo con una solución de Krebs-Henseleit modificada y que contiene todos los sustratos necesarios para el buen funcionamiento del corazón.

A las ratas se les extrajo el corazón una vez anestesiadas, heparinizadas y canuladas a un respirador artificial. El corazón una vez extraído fue colocado adecuadamente en la bomba de perfusión con el objeto de que el flujo estuviera controlado.

Se hicieron dos series de experimentos, una serie control, en la cual al corazón sólo se le tomaron los registros necesarios, y una segunda serie en donde se adicionó un lantánido ($GdCl_3$) bloqueador de los canales de potasio activados por estiramiento.

Los resultados nos hacen pensar que las hipótesis son correctas y que los canales activados por estiramiento participan en el mecanismo de transducción de la señal mecánica del flujo coronario a una señal metabólica o funcional sin descartar los otros mecanismos propuestos.

INDICE

Introducción.....	1
Objetivos.....	10
Hipótesis.....	11
Materiales y Métodos.....	12
Protocolo Experimental.....	15
Resultados.....	19
Discusión.....	30
Referencias.....	34

INTRODUCCION:

Las células endoteliales de los vasos sanguíneos están expuestas continuamente a fuerzas hemodinámicas: estrés por fricción y presión intravascular. Existe suficiente evidencia que indica que estas fuerzas no son solamente parámetros físicos, sino señales reguladoras del metabolismo y la función cardíaca (1-10).

Los estudios realizados por Gregg (11) demostraron que un incremento en el flujo coronario resultó en un aumento del consumo de oxígeno, un hallazgo relacionado es que la magnitud de la contracción cardíaca es modulada por el flujo coronario. La observación de que el consumo de oxígeno cardíaco y la fuerza de contracción son modificadas por el flujo coronario se conoce como fenómeno de Gregg.

A pesar de todos los esfuerzos realizados no se ha logrado establecer el mecanismo de transducción de una fuerza física a una señal metabólica o funcional. Una posibilidad que no se ha considerado es que el flujo coronario pudiera estimular al endotelio vascular para liberar sustancias bioactivas o que pudiera transmitir señales físicas a células adyacentes que son las responsables, por ejemplo, de los cambios de contractilidad y el consumo de oxígeno (12).

Adicionalmente, la contractilidad y el consumo de oxígeno no son los únicos parámetros que se modifican con el flujo ya que ha sido demostrado también una estimulación de la glucólisis por las fuerzas hemodinámicas en el corazón perfundido de cobayo (6).

Se sabe que el endotelio responde al flujo: 1) Liberando agentes vasoactivos tales como prostaciclina (prostaglandina PGI₂), purinas (4) y factores relajantes y constrictores (13); 2) activando canales de K⁺ y Ca²⁺; 3) con cambios en la orientación y alineamiento de células endoteliales; 4) con la redistribución de la F-actina del citoesqueleto y 5) estimulando la pinocitosis y el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (14).

Tomando en cuenta las cualidades del endotelio mencionadas anteriormente, es posible pensar que la respuesta al flujo coronario por el corazón pudiera ser mucho más amplia que la estudiada hasta ahora. Es por esta razón que nos propusimos estudiar si otras respuestas como la transmisión aurículo-ventricular y el ritmo ventricular espontáneo serían también afectadas por el flujo coronario.

En un intento por establecer el mecanismo de acción del flujo coronario sobre las funciones mencionadas, utilizamos un bloqueador de los canales activados por estiramiento que pensamos podrían ser los sensores en el endotelio vascular a los cambios de flujo. Este bloqueador es el cloruro de gadolinio (15).

A continuación presento una breve revisión de algunos aspectos teóricos de temas que considero relevantes para el mejor entendimiento de esta tesis y de conceptos mencionados anteriormente.

ENDOTELIO VASCULAR CARDIACO

El endotelio no es sólo una barrera física pasiva entre la sangre y los tejidos, sino más bien desempeña el papel de un órgano. Las células endoteliales como elementos de barrera desempeñan activamente su función de permeabilidad y regulación de la microecología y son además, parte de los complejos mecanismos de la coagulación de la sangre, de la diapedesis, del metabolismo selectivo; participan también en el complejo sistema inmunológico (16). El endotelio además de su capacidad trombogénica puede modular la reactividad de las células musculares lisas en respuesta a varios compuestos endógenos vasoactivos; al parecer esta función la realizan al menos en parte, al secretar una sustancia vasoactiva, segundo mensajero, en respuesta a un estímulo químico y/o humoral presente dentro de la luz del vaso. Existen en el organismo algunos órganos cuya función principal se realiza únicamente mediante los vasos sanguíneos capilares, constituidos sólo por la capa

endotelial, tal es el caso de los capilares de los alveolos pulmonares y de los glomérulos renales (17).

FUERZAS HEMODINAMICAS ASOCIADAS AL FLUJO CORONARIO.

El corazón es una bomba complicada y su funcionamiento se ve afectado por una gran cantidad de factores químicos y físicos. Para poder entender las funciones del flujo debemos considerar que los vasos sanguíneos son conductos elásticos multirramificados de dimensiones muy variables y que el fluido que pasa por ellos es una suspensión coloidal de células rojas y blancas, plaquetas y una gran cantidad de sustancias lipídicas.

Debemos de tener en cuenta que el flujo sanguíneo tiene características muy importantes que contribuyen al mejor entendimiento de su función. Estas características son volumen y velocidad, la cuales se encuentran estrechamente relacionadas entre si y con la presión que se desarrollará dentro del vaso.

La estructura del sistema vascular tiene variaciones muy importantes en el calibre de los vasos sanguíneos, por lo tanto, es de esperar que existan variaciones en las velocidades del flujo dependiendo de la región de estudio, además de considerar que los vasos son elásticos y no tubos rígidos por lo que puede variar su calibre y con ello la velocidad del flujo (16).

ESTRES POR FRICCIÓN DE LA PARED DEL VASO:

El flujo a través del sistema vascular es normalmente laminar y la turbulencia es relativamente rara. Sin embargo, se presenta el flujo laminar perturbado en regiones donde el flujo es redirigido en los vasos ramificados o curvaturas de los mismos y cerca de las bifurcaciones de los grandes vasos. Existe una diferencia entre el flujo laminar perturbado y el flujo laminar turbulento, y es que en la turbulencia existe un rápido recambio en la frecuencia, magnitud y dirección que actúan en la superficie endotelial (20).

Las fuerzas del flujo pueden ser resueltas en dos componentes: Presión actuando perpendicular a la superficie y estrés por fricción del fluido con la superficie endotelial (fig. 1). La elasticidad de la colágena y la musculatura lisa del vaso absorben mucho la presión, sin embargo, el endotelio está sujeto a todo el estrés por fricción. El estrés por fricción (fig. 2) causado por el flujo es la fuerza hemodinámica principal asociada exclusivamente con el endotelio.

El estrés por fricción es una fuerza orientada longitudinalmente a la pared del vaso, consecuentemente ésta deformará las estructuras de la membrana que se encuentren orientadas perpendicularmente a la fuerza deformante ya que la superficie del endotelio contiene gran diversidad de cadenas de polisacáridos que pueden ser deformados por las fuerzas hemodinámicas (12,16,18,19)

El estrés por fricción *in vivo* varía dependiendo de la geometría de los vasos, la magnitud depende de la viscosidad del fluido, la velocidad del flujo y el diámetro del vaso. En grandes vasos sin ramificaciones, por ejemplo la aorta torácica, el estrés por fricción va hasta 30 dinas/cm². En regiones de geometría compleja donde existen bifurcaciones de flujo y predomina el flujo laminar perturbado, se pueden presentar fenómenos como el reflujo con medidas de estrés por fricción de -8 dinas/cm² a 0 dinas/cm², con un regreso a cifras positivas altas cuando el flujo retorna a una dirección normal. Estas localizaciones, por ejemplo el seno carotídeo, son susceptibles a desarrollar lesiones arterioescleróticas. En vasos pequeños, por ejemplo arteriolas de 20 a 40 μ m de diámetro el estrés por fricción va de 5 a 25 dinas/cm².

Cuando el flujo cambia en las arterias, ocurren dos fenómenos interesantes, uno agudo y el otro crónico. Un incremento de flujo resulta en una vasodilatación rápida y reversible, en cambio un decremento en el mismo por largos periodos de tiempo (días o semanas) llevan a una reorganización de la arquitectura arterial para producir una disminución en el diámetro de la luz del vaso. Ambas respuestas son dependientes del endotelio. Todo esto es lo que lleva a tomar al

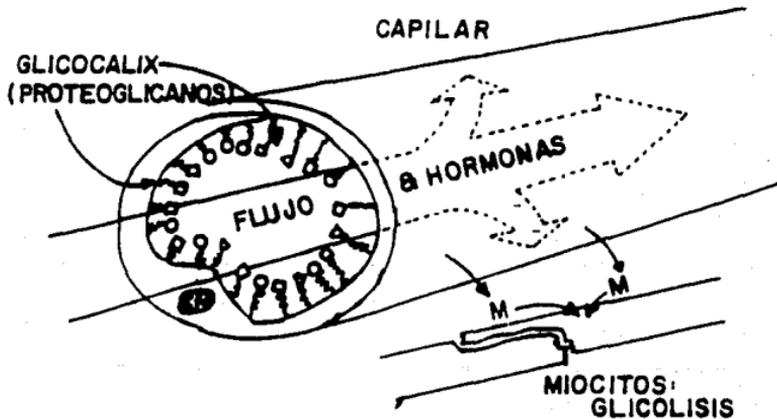


Figura 1. La figura muestra el efecto del flujo coronario sobre el endotelio vascular, activando a las estructuras de recubrimiento que se encuentran en la superficie del mismo, dando como resultado la liberación de sustancias bioactivas.

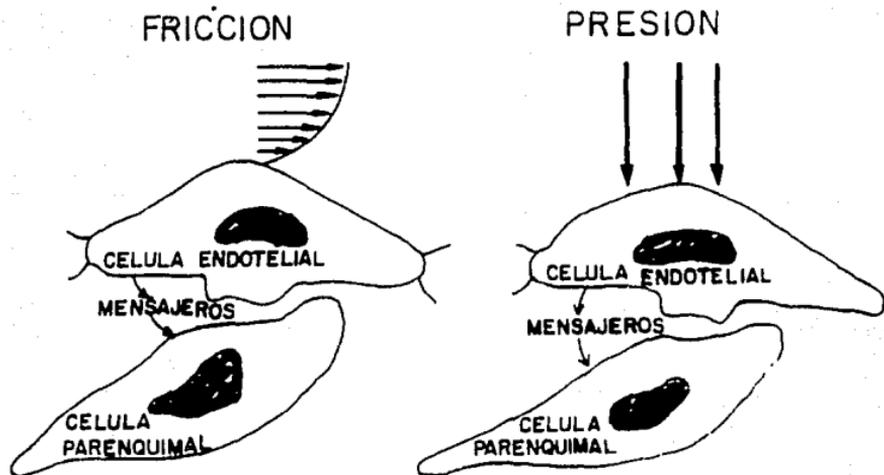


Figura 2. Las fuerzas hemodinámicas que actúan sobre el endotelio vascular cardiaco relacionadas con el flujo coronario son: La fricción y la presión. La primera actúa en forma tangencial sobre las células endoteliales y la segunda en forma perpendicular a las mismas, las dos fuerzas provocan la liberación de mensajeros que van dirigidos hacia las células parenquimales.

endotelio como un mecanosensor que desencadenará una gran cantidad de respuestas (16).

Las fuerzas del flujo juegan un papel muy importante en la morfología y función de las células endoteliales. Se ha observado que las células endoteliales *in vivo* son elongadas, y están alineadas en dirección del flujo sanguíneo local. Esto ha sido demostrado por Reidy y Langille quienes utilizaron un microscopio electrónico para delinear los bordes de las células endoteliales. Se encontró que en regiones donde el estrés por fricción es cercano a cero (como en las bifurcaciones ilíacas) las células son de una forma muy parecida a polígonos y no tienen una orientación preferida. Esto significa que la dirección del flujo coronario influye en la migración y proliferación de células endoteliales. Dentro de este mismo estudio se midió la liberación de prostaglandina a diferentes rangos de estrés por fricción, encontrándose que a mayores valores de estrés más grande era la liberación de prostaglandinas (3).

CANALES IONICOS Y REGULACION DEL CALCIO INTRACELULAR EN CELULAS ENDOTELIALES

Las células endoteliales *in vivo* forman una interfase entre el flujo sanguíneo y el tejido vascular respondiendo a estímulos físicos y humorales para secretar factores relajantes y constrictores que contribuyen a la homeostasis y tono vascular (21,22,23,24). La activación de los receptores de agentes vasoactivos de la superficie endotelial es acompañada con una elevación del Ca^{2+} citosólico, la cual es causada por la entrada de Ca^{2+} vía canales iónicos en la membrana plasmática y por la liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares. La entrada de Ca^{2+} puede ocurrir por cuatro mecanismos diferentes: 1) Un canal receptor acoplado a segundos mensajeros; 2) un canal de Ca^{2+} dependiente del gradiente electroquímico de Ca^{2+} ; 3) un canal no selectivo activado por estiramiento y 4) entrada de Na^+ dependiente de Ca^{2+} (intercambio $Na^+ - Ca^{2+}$) (25). El índice de entrada de Ca^{2+} a través de estos mecanismos puede ser modulado por el potencial de membrana. El potencial de membrana puede ser regulado por al menos

dos tipos de canales de K: Canales activados por hiperpolarización o estrés por fricción y canales activados con Ca^{2+} hasta llegar a la depolarización, el cual puede funcionar para repolarizar la célula endotelial estimulada con agonistas (26).

Los mecanismos por los cuales las células endoteliales responden a estímulos humorales y fisiológicos incluyen la activación de canales iónicos y segundos mensajeros para elevar el Ca^{2+} citosólico en una manera similar a otras células no excitables. La entrada de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática es controlado por activación del receptor, transporte pasivo y estiramiento mecánico. La velocidad a la cual el Ca^{2+} entra a la célula por estos mecanismos depende en parte del potencial transmembrana, es el gradiente electroquímico para el Ca^{2+} , el cual es regulado por canales de potasio sensibles al voltaje, estiramiento y concentración del Ca^{2+} intracelular. La despolarización reduce la entrada de Ca^{2+} a través del receptor y de los canales y facilita la entrada del mismo a través del intercambiador $\text{Na}^+-\text{Ca}^{2+}$ el cual es responsable de una corriente de salida. Las bombas de Ca^{2+} dependientes de ATP parecen estar relacionadas primariamente con la homeostasis del Ca^{2+} como son responsables de la extrusión del Ca^{2+} a la membrana del plasmalema y secuestro del Ca^{2+} dentro del retículo endoplásmico. El retículo endoplásmico es responsable de la liberación momentánea del Ca^{2+} en el citoplasma hasta la señal por 1,4,5-inositol trifosfato IP3, el cual es un intermediario agonista estimulado del metabolismo de fosfolípidos. Este mecanismo es en células endoteliales y en células *in vivo* puede variar, sin embargo, proporciona el mecanismo esencial para un incremento bifásico del Ca^{2+} intracelular para la homeostasis del Ca^{2+} en el endotelio.

BIOQUIMICA DE LOS LANTANIDOS

Los lantánidos tienen un radio muy parecido al del Ca^{2+} y al igual que éste forman complejos iónicos con los grupos donadores de oxígeno. El gadolinio tiene un radio de 0.105nm y el calcio 0.106nm, además el

gadolinio inhibe las corrientes en los canales con afinidad en el rango micromolar (27).

Los lantánidos tienen numerosas aplicaciones en estudios de sistemas biológicos. Es de principal interés el estudio de bloqueo dosis dependiente de los canales activados por estiramiento por Gd^{3+} (28).

La membrana celular es relativamente impermeable a los lantánidos, debido a esto, se piensa que los efectos de estos cationes trivalentes en la fisiología cardíaca son mediados por los niveles de éste en el sarcolema. Por su alta afinidad iónica, los lantánidos se enlazan fuertemente con muchos componentes de la membrana celular. Los lantánidos desplazan el Ca^{2+} de las superficies negativamente cargadas de moléculas (ej, ac. sílico) eliminando esta fuente de calcio. Un gran número de investigadores han demostrado que los lantánidos, incluyendo el Gd^{3+} , son potentes bloqueadores de canales de calcio (27). Esta es una evidencia indirecta que sugiere que los lantánidos inhiben el mecanismo de intercambio de $Na^+ - Ca^{2+}$. El Gd^{3+} no es un bloqueador específico de los canales activados por estiramiento, pero sí el más potente conocido, además de bloquear el transporte de calcio, este es el único efecto conocido de los lantánidos en la fisiología celular cardíaca.

OBJETIVOS:

1. Estudiar el efecto del flujo coronario en la función cardíaca del corazón de rata aislado y perfundido.
2. Demostrar que el flujo coronario además de afectar la contractilidad miocárdica también lo hace en la transmisión auriculo-ventricular y el ritmo ventricular espontáneo.
3. Estudiar la participación de los canales de potasio activados por estiramiento en algunos de los efectos estimuladores del flujo.

HIPOTESIS:

1) Si el flujo coronario estimula la contracción miocárdica mediada a través de la estimulación del endotelio que a su vez estimula a las células del parénquima, entonces podrían afectarse más de una función y así de esta forma darse un mecanismo de regulación más general.

2) Si los efectos estimuladores del flujo coronario en la contracción y en la conducción miocárdica son mediados por la activación de canales de potasio activados por estiramiento, entonces al bloquear estos canales se inhibirá la respuesta cardíaca al flujo.

MATERIALES Y METODOS

Preparación de la solución de Krebs:

Se preparó la solución de perfusión con 200 ml de la solución madre los cuales se colocaron en un vaso de precipitados con aproximadamente 1000 ml de agua deionizada y se adicionaron 1.81 g de dextrosa anhidra, burbujear con mezcla gaseosa de carbógeno (95% de oxígeno y 5% de dióxido de carbono) posteriormente adicionar 4.08 g de bicarbonato de sodio y agitar magnéticamente, una vez disuelto aforar a 2 litros. Filtrar con filtros Millipore de 0.44 μm y guardar en frascos limpios. Todo el material que se ocupa en la preparación de soluciones como a lo largo del protocolo se enjuagó previamente con agua deionizada. La composición final de la solución de Krebs es de: Fosfato de sodio 0.0012M, etildiaminotetracetato de sodio dihidratado 0.0027 mM, cloruro de potasio 0.006M, cloruro de calcio dihidratado 0.0016 M, sulfato de magnesio heptahidratado 0.0012 M, cloruro de sodio 0.1178 M, dextrosa anhidra 0.005 M y bicarbonato de sodio 0.0113 M.

Se utilizaron ratas Wistar macho de 250-280 g a las cuales se les aplican 500 unidades de heparina junto con el anestésico (0.252mg por kg de peso). Una vez que la rata quedó anestesiada, se colocó en la tabla quirúrgica inmovilizándola por completo. Inmediatamente después de la inmovilización se procedió a canular al animal por la tráquea. Se abrió la rata haciendo una incisión por el diafragma y separando la pared del tórax todo lo posible.

Una vez separada la pared torácica se despejó la aorta de todo el tejido extra y se le pasó un hilo de sutura para poder sostenerla, se hizo una lazada y se cortó la aorta para poder sacar el corazón, inmediatamente después se lavó el corazón en solución de perfusión fría y se procedió a canular, la bomba se encendió antes de canular el corazón para evitar que se formaran burbujas y pasaran al corazón. Una vez enjuagado el corazón se canuló a la bomba de perfusión y se perfundió a flujo coronario de 20 ml/min (fig. 3).

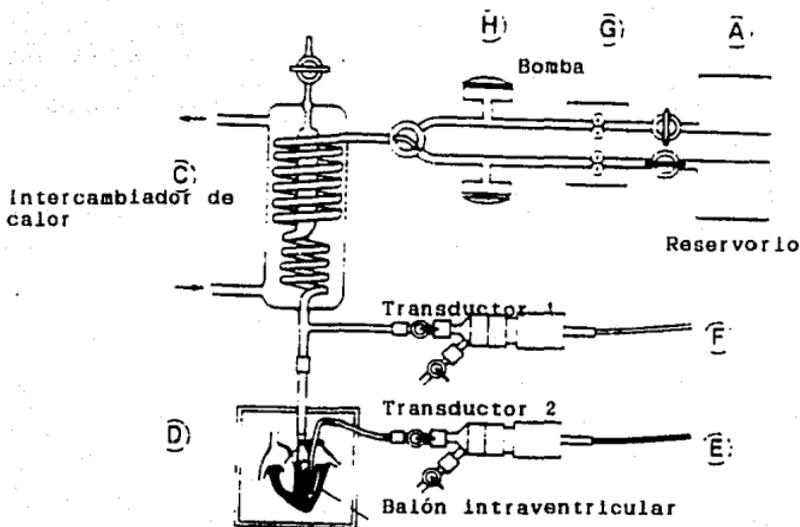


Figura 3. Esquema básico del aparato de perfusión para método de Langendorff.

- A. Reservorios para la solución de perfusión.
- B. Bomba para mantener el flujo coronario controlado.
- H. Cámara de aire para amortiguar los cambios de presión.
- C. Intercambiador de calor (serpentin).
- D. Recipiente termocontrolado.
- E. Transductor para registrar presión intraventricular.
- F. Transductor para registrar resistencia al flujo.

El corazón debe estabilizarse con un flujo de 20 ml/min durante 10 minutos y después con un flujo de 10 ml/min durante 20 minutos. Una vez estabilizado el corazón se procedió a tomar los datos.

PROTOCOLO EXPERIMENTAL

Después de que el corazón fue canulado se colocaron cuatro electrodos de la siguiente manera, dos en la aurícula derecha para estimulación y de los otros dos, uno se colocó en la aurícula izquierda y otro en la base del corazón respectivamente, con el objeto de medir la transmisión aurículo-ventricular (fig. 4). Para poder medir la presión de contracción se insertó un balón de látex con agua en su interior y sin burbujas de aire dentro del ventrículo izquierdo (fig. 5), el balón se conectó a un transductor de presión.

PROTOCOLO I

EFEECTO DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA, TRANSMISION AURICULO VENTRICULAR Y RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

A. EFECTO DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA. Se introdujo dentro del ventrículo izquierdo un balón de látex con agua y sin burbujas de aire para poder monitorear así la presión de contracción miocárdica. La presión diastólica fue ajustada a 10 mmHg y la presión ventricular desarrollada fue monitoreada continuamente. Para esta parte del protocolo se mantuvo constante la frecuencia de estimulación de 5Hz y el flujo coronario se incrementó de 10 a 25 ml/min con aumentos de 5 ml/min en cada ocasión.

B. EFECTOS DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA TRANSMISION AURICULO-VENTRICULAR. Para definir los efectos del flujo coronario sobre la transmisión aurículo-ventricular se generaron dos tipos de gráficas: 1) A flujo coronario constante se determinó el intervalo A-V a varias frecuencias de estimulación (Hz). Esta gráfica se construyó sobre los datos de dos flujos coronarios (10 y 25 ml/min). 2) A frecuencia constante de estimulación de 5Hz se varió el flujo desde 10 hasta 25 ml/min con incrementos de 5ml/min en cada ocasión y en cada aumento se tomaron los datos del intervalo A-V.

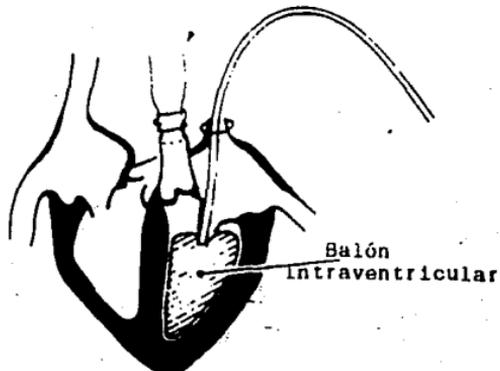


Figura 4. Diagrama de la posición del balón dentro del ventrículo izquierdo para registrar la presión dentro del corazón aislado y perfundido (el balón de látex está conectado a un catéter flexible)

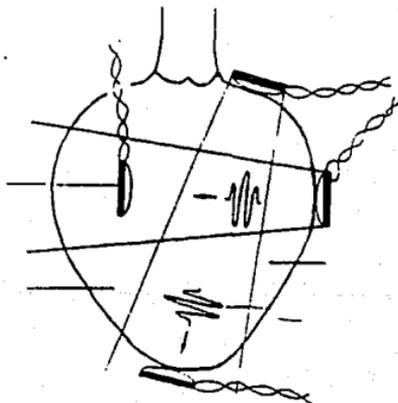


Figura 5. Arreglo de las electrodos en el experimento. Para la medición del diámetro transversal del ventrículo izquierdo el transmisor es colocado en el epicardio, el receptor correspondiente es conectado a través de la aurícula derecha, se colocan otros dos electrodos en la base del corazón y en el ápex.

C. EFECTO DEL FLUJO CORONARIO SOBRE EL RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

El ritmo ventricular espontaneo es inducido destruyendo el área del nodo A-V. La destrucción del nodo se logró "machucando" presionando el tejido superficial que se encuentra entre el ostium y las válvulas cardiacas con unas pequeñas pinzas. Esta manipulación dio como resultado el bloqueo de impulsos de la aurícula al ventrículo y la disociación de las actividades eléctricas. El ritmo ventricular espontáneo fue determinado a dos diferentes flujos 10 y 25ml/min y expresados como latidos/minuto.

PROTOCOLO II

EFECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO EN LOS EFECTOS ESTIMULADORES DEL FLUJO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA, TRANSMISION AURICULOVENTRICULAR Y RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

En este protocolo antes del inicio de la toma de datos (según se indique en cada parte del protocolo), se conectó al sistema de perfusión una bomba de infusión para poder inyectar la solución de cloruro de gadolinio, la concentración final de este fue de 10 μ M.

A. EFECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE LOS EFECTOS ESTIMULADORES DEL

FLUJO EN LA CONTRACCION MIOCARDICA. Igual que en el protocolo I se coloca un balón de látex dentro del ventrículo izquierdo y se ajusta la presión diastólica, primero se tomaron los datos basales en donde el protocolo se sigue igual que en protocolo I, después de tomados éstos, se conecta al sistema la bomba de infusión y se permite que pasen 10 minutos para que el cloruro de gadolinio sea distribuido y tomar los datos con el efecto del gadolinio. La frecuencia permanece constante y los incrementos del flujo son acompañados por incrementos en la infusión del cloruro de gadolinio de 0.5 ml/min en cada ocasión con el fin de mantener la concentración del gadolinio constante. El flujo coronario va desde 10 hasta 25 ml/min con incrementos de 5 ml/min en cada ocasión.

B. EFECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE LOS EFECTOS ESTIMULADORES DEL FLUJO SOBRE LA TRANSMISION A-V. Se generaron al igual que el en

protocolo I dos tipos de gráficas, se tomaron primero las basales y posteriormente se procedió a tomar los datos con el efecto del gadolinio: 1) Se conectó la bomba de infusión de cloruro de gadolinio con 0.15 ml/min a un flujo coronario de 10 ml/min y transcurrieron 5 minutos antes de iniciar la toma de datos y una vez transcurrido este período se tomaron los datos de intervalo A-V a diferentes frecuencias de estimulación, este mismo paso se realizó a 25 ml/min con un flujo de cloruro de gadolinio de 0.30 ml/min. 2) Antes de la toma de estos datos se dejó perfundir el corazón con solución de perfusión sin cloruro de gadolinio por un período de 10 minutos, después de este tiempo se inició la toma de datos con una frecuencia de estimulación constante de 5 Hz y el flujo se varió desde 10 ml/min hasta 25 ml/min con incrementos de 5ml/min en cada ocasión con respectivos incrementos de la solución de cloruro de gadolinio de 0.5 ml/min hasta llegar a flujo coronario de 25ml/min con 0.30 ml/min de gadolinio. En cada incremento se tomó la lectura del intervalo A-V incluyendo la inicial y la final.

C. EFECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE EL EFECTO DEL FLUJO CORONARIO EN EL RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO. Al igual que en el inciso C del protocolo I se despertó el ritmo ventricular espontáneo y antes de conectar la bomba de infusión de cloruro de gadolinio se tomaron las basales. Se conectó la bomba de infusión de cloruro de gadolinio con un flujo de 0.15 ml/min para tomar los datos de flujo coronario de 10 ml/min y después de "lavó" el corazón antes de tomar los datos del ritmo ventricular espontáneo a 25 ml/min de flujo coronario y 0.30 ml/min de cloruro de gadolinio.

RESULTADOS

EFFECTO DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA, TRANSMISION AURICULO-OBSERVANTRICULAR Y RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

Efecto del flujo coronario sobre la contracción miocárdica. El flujo coronario aumentó la contracción miocárdica como se puede observar en las figuras 6A y 7. La presión de contracción miocárdica aumentaba en relación al flujo, pues a mayor flujo coronario mayor era la presión de contracción. Con el primer incremento de flujo la estimulación en la contracción dio como resultado que la presión de contracción a flujo de 10 ml/min subiera de 62mmHg hasta 82mmHg y con el último incremento de flujo coronario la presión subió de 103mmHg a 114mmHg con lo que se observa que los aumentos en la presión de contracción causados por el flujo no son siempre de la misma magnitud y que tienden a disminuir conforme se va aumentando el flujo.

EFFECTOS DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA TRANSMISION AURICULO-VENTRICULAR.

Los efectos del flujo coronario sobre la transmisión auriculo-ventricular se muestran en las figuras 6A, 8A y 9.

El efecto dromotrópico positivo del flujo coronario se muestra en las figuras 8A y 6A. Los resultados sobre el intervalo A-V (fig 8A) muestran que a todas las frecuencias de estimulación el intervalo más corto es a flujo de 25 ml/min (n=8) en comparación con el flujo de 10 ml/min, además que la máxima frecuencia de estimulación en donde no se presentaron arritmias se logró a flujo alto. A una frecuencia de estimulación constante (5Hz n=8) los incrementos en el flujo disminuyeron el intervalo A-V (fig. 6A).

EFFECTO DEL FLUJO CORONARIO SOBRE EL RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

Los efectos del flujo coronario se muestran en la figura 10. El flujo incrementa el ritmo ventricular espontáneo, pues si comparamos los latidos por minuto a flujo coronario de 10 ml/min con los obtenidos a flujo coronario de 25 ml/min se observa que estos aumentan.

EFEECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE LOS EFECTOS ESTIMULADORES DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA, TRANSMISION AURICULO-VENTRICULAR Y RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO.

EFFECTOS DEL CLORURO DE GADOLINIO EN LOS EFECTOS ESTIMULADORES DEL FLUJO CORONARIO SOBRE LA CONTRACCION MIOCARDICA. Los efectos del cloruro de gadolinio en los efectos del flujo en la contracción miocárdica se muestran en las figuras 6B y 7. Como se puede observar en la figura 6B el cloruro de gadolinio disminuye la presión de contracción cardíaca la cual va de 50mmHg a un flujo de 10 ml/min a 80mmHg a flujo de 25 ml/min, con lo cual el incremento total es de 30mmHg, en comparación con el control en donde el incremento es de 50mmHg. Se observa también que la disminución gradual del aumento de presión de contracción que se da en los corazones sin cloruro de gadolinio aparece mas rápido en los corazones con gadolinio como se ve en la figura 7 en donde se observa una fase de meseta.

EFEECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE EL EFECTO ESTIMULADOR DEL FLUJO EN LA TRANSMISION AURICULO-VENTRICULAR. El cloruro de gadolinio bloqueó parcialmente el efecto del flujo sobre la conducción A-V como se muestra en las figuras 6B y 9. En el primer aumento de flujo de la figura 6B se ve una disminución en el intervalo A-V pero esta reducción se ve bloqueada a los otros flujos en donde el intervalo A-V permanece en una fase de meseta con valores constantes independientemente de la magnitud del flujo, esto se ve más claramente en la figura 10 en donde la gráfica fue construida en base a los decrementos del intervalo A-V en donde los resultados se van hacia cifras negativas, con lo que se observa que el gadolinio inhibe esta propiedad del flujo coronario sobre el intervalo A-V. En la figura 8B observamos que el gadolinio disminuye la capacidad del miocárdio para tolerar frecuencias más altas a flujo alto (25 ml/min) en comparación con el flujo bajo (10 ml/min), pues a los dos flujos, la frecuencia más alta tolerada es de 6Hz.

EFEECTO DEL CLORURO DE GADOLINIO SOBRE EL EFECTO DEL FLUJO CORONARIO EN EL RITMO VENTRICULAR ESPONTANEO. El efecto del gadolinio sobre el ritmo

ventricular espontáneo se muestra en la figura 10B. Como puede observarse, el gadolinio inhibe completamente el efecto del flujo ya que el ritmo ventricular espontáneo permanece constante sin importar la magnitud del flujo coronario y en ocasiones no sólo permanece constante sino que incluso disminuye.

FIGURA 6

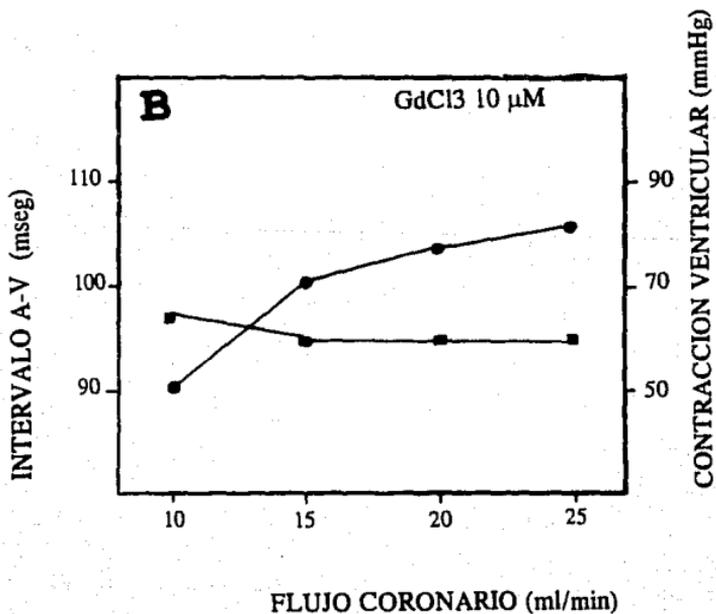
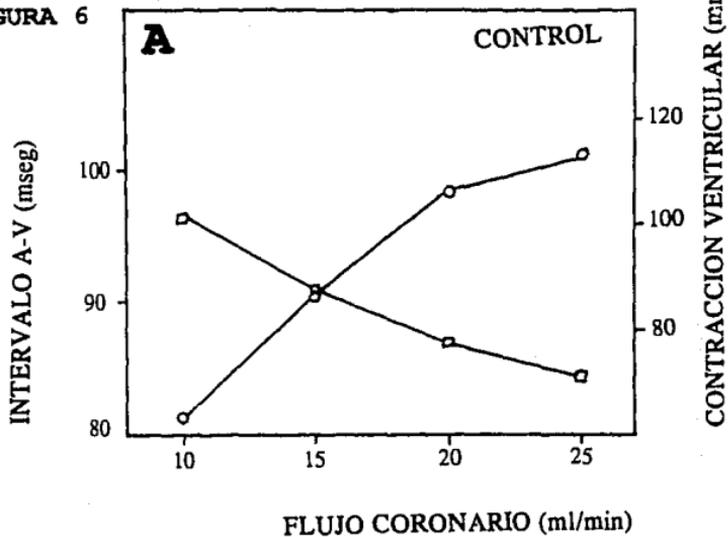


Figura 6A. Efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción miocárdica y el intervalo A-V a una frecuencia de estimulación constante de 5 Hz. La figura muestra que al aumentar el flujo coronario, la contracción miocárdica (círculos vacíos) se ve aumentada y el intervalo A-V (cuadros vacíos) se ve disminuido.

Figura 6B. Efecto del cloruro de gadolinio en el efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción miocárdica y el intervalo A-V. En corazones tratados con cloruro de gadolinio, el efecto estimulador del flujo coronario sobre la contracción miocárdica (círculos llenos) se observa disminuido considerablemente, de igual forma ocurre en el estímulo sobre el intervalo A-V (cuadros llenos), ya que éste en lugar de disminuir con los aumentos de flujo coronario, sólo lo hace en el primer incremento y posteriormente permanece constante, con lo que se observa que el cloruro de gadolinio interfiere en el efecto estimulador del flujo coronario.

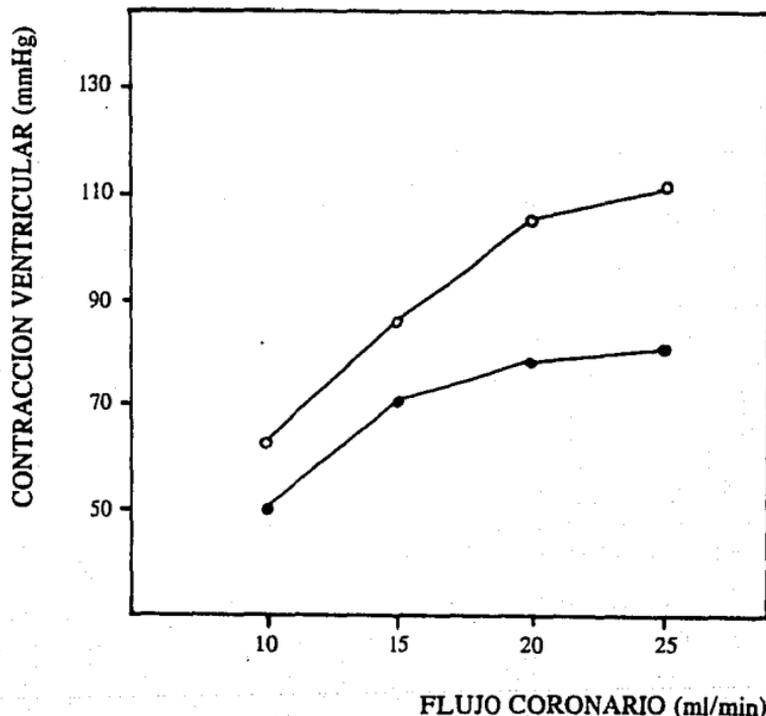


Figura 7: Efecto del cloruro de gadolinio en la estimulación de la contracción miocárdica producida por el flujo coronario. En la figura se muestra que la contracción miocárdica (mmHg) en los corazones control (círculos vacíos) es mayor que la presentada por los corazones tratados con cloruro de gadolinio (círculos llenos), lo que muestra el efecto bloqueador del cloruro de gadolinio sobre las propiedades estimuladores del flujo coronario. Así mismo se observa que la presión de contracción permanece más bien constante en los incrementos de flujo coronario desde 15 ml/min hasta 25 ml/min, contrariamente a lo que ocurre en los corazones control.

FIGURA 8

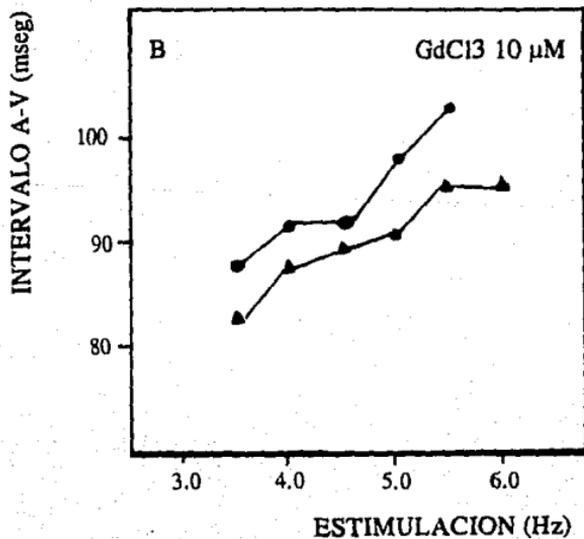
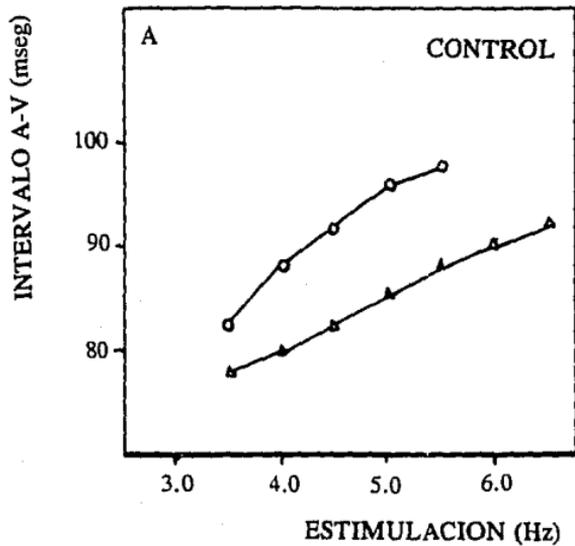


Figura 8. Efecto del cloruro de gadolinio sobre el intervalo A-V a diferentes rangos de estimulación en dos diferentes flujos coronarios. En el panel A, observamos que a un flujo coronario de 10 ml/min (círculos vacíos) al aumentar el rango de estimulación el intervalo A-V aumenta y lo mismo ocurre en el flujo coronario de 25 ml/min (triángulos vacíos), con la diferencia de que los valores del intervalo A-V en este último con el mismo rango de estimulación son menores que el primero, con lo que se observa el efecto estimulador del flujo coronario sobre el intervalo A-V. En el panel B ocurre algo similar, pero con una diferencia menor, ya que como se puede observar en la figura los valores a los dos diferentes flujos coronarios (10 ml/min, círculos llenos y 25 ml/min triángulos llenos) se encuentran más cercanos con los que se observa que el cloruro de gadolinio inhibe, aunque no totalmente, el efecto estimulador del flujo coronario.

RANGO DE ESTIMULACION 5 Hz

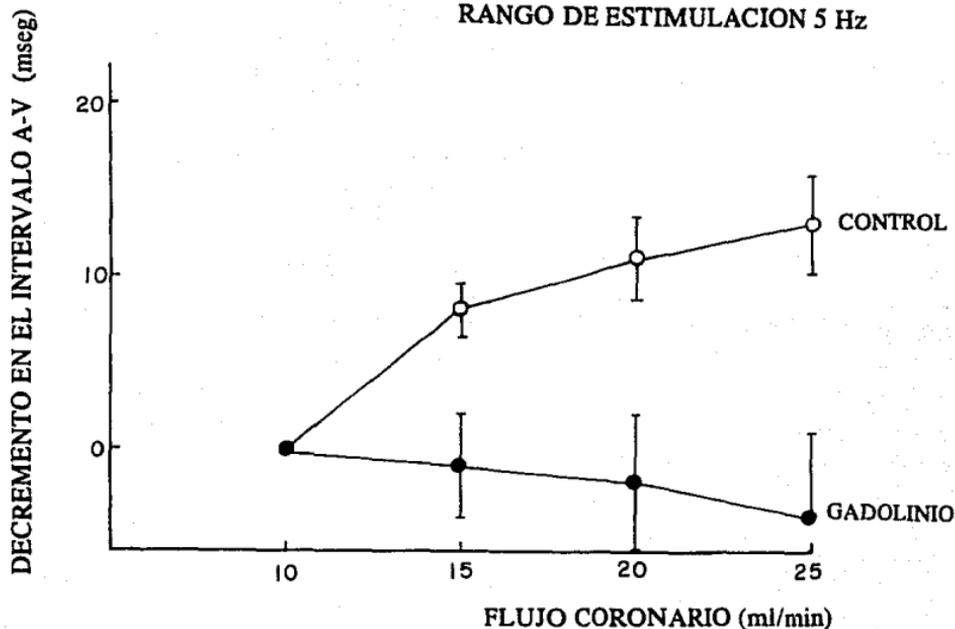


Figura 9: Efecto del cloruro de gadolinio sobre el intervalo A-V (mseg) estimulado por el flujo coronario. En corazones control, al aumentar el flujo coronario el intervalo A-V se ve disminuido, lo contrario ocurre en corazones tratados con cloruro de gadolinio en donde el intervalo A-V aumenta como se puede deducir de las cifras negativas que se observan con la curva de cloruro de gadolinio. Además en esta figura se muestra la disminución en el intervalo A-V al aumentar el flujo coronario con respecto al valor del intervalo A-V a un flujo coronario de 10 ml/min. La estimulación fue constante durante todo el experimento de 5 Hz.

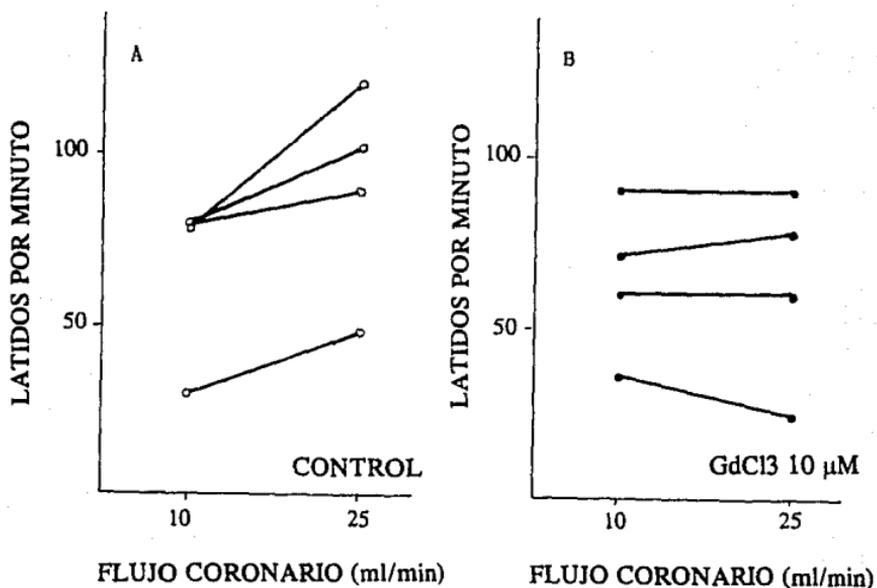


Figura 10. Efecto del cloruro de gadolinio sobre la estimulación del ritmo ventricular espontáneo producida por el flujo coronario. En los corazones control al aumentar el flujo coronario existe un incremento en los latidos por minuto (panel A), en forma contraria los corazones tratados con cloruro de gadolinio los latidos por minuto permanecen iguales en algunos casos y en otros incluso disminuyen (panel B).

INCREMENTO EN EL INTERVALO A-V
(mseg)

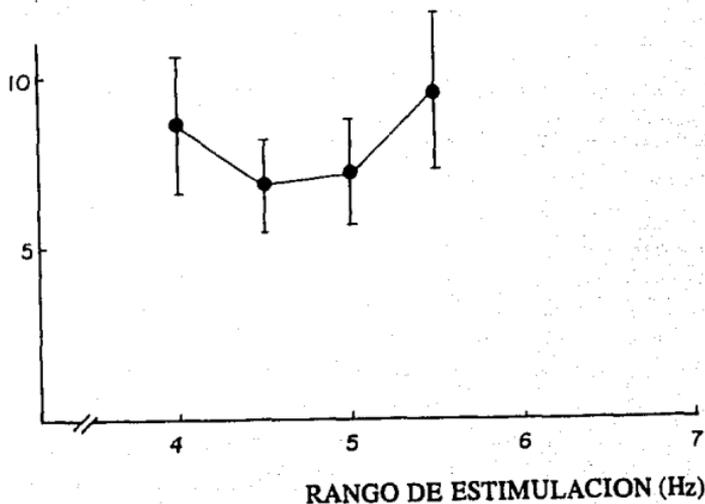


Figura 11. Efecto del cloruro de gadolinio en la conducción A-V a diferentes frecuencias en flujo coronario de 10 ml/min. Esta figura en el eje de las Y muestra los incrementos en el intervalo A-V causados por el cloruro de gadolinio con respecto a los valores del control en cuatro diferentes frecuencias probadas.

DISCUSION

El control metabólico del flujo coronario ha sido bien establecido, además, existen indicios de que la relación inversa, es decir, de que el flujo coronario controla el metabolismo miocárdico (11).

Los resultados demuestran que el flujo coronario estimula la contracción miocárdica, la transmisión A-V y el ritmo ventricular espontáneo, por lo tanto, el flujo coronario no es un parámetro únicamente de las dimensiones de transferencia de masa, sino también de señal reguladora que afecta varias funciones cardíacas y el metabolismo. Esto implica que a pesar de que la función cardíaca/metabolismo determina el flujo coronario (9, 10) éste también determina la función/metabolismo, con lo que nos encontramos ante un ciclo que está continuamente en retroalimentación.

Los estudios aquí realizados no son hechos al azar, sino que tienen una base bastante fuerte en estudios anteriormente realizados en corazones de cobayo (12) en donde se observa el efecto estimulador del flujo en las funciones ahí probadas, por tanto se despertó el interés de la observación de estos efectos en el corazón de rata y además tratar de dilucidar el mecanismo por el cual el flujo estimula las funciones anteriormente señaladas, o al menos descubrir una parte del mismo.

El tratar de dilucidar un mecanismo tan complejo es una tarea un poco difícil y no con una sola serie de estudios se puede llegar a la respuesta, es más, muy posiblemente no sea sólo una respuesta, sino la combinación de varios mecanismos necesarios para la realización o culminación del efecto estimulador del flujo coronario.

Anteriormente se ha dicho que las células endoteliales se encuentran expuestas continuamente a fuerzas hemodinámicas: presión y fricción. Debido a que se conocen que el flujo causa vasoconstricción y relajación de los vasos sanguíneos y que las células endoteliales son capaces de

responder a fuerzas hemodinámicas por la liberación de varias sustancias bioactivas, el papel del endotelio como mecanotransductor de las fuerzas relacionadas al flujo, particularmente el estrés por fricción, es de gran interés y reviste una gran importancia. Ahora se conoce que las células endoteliales son capaces de responder al flujo por diferentes vías. Los mecanismos propuestos son: 1) La liberación de agentes vasoactivos tales como prostaciclina (prostaglandina PGI₂), purinas y factores relajantes y constrictores; 2) activación de canales de K⁺ y Ca²⁺; 3) cambios en la orientación y alineamiento de células endoteliales; 4) redistribución de la F-actina del citoesqueleto y 5) con la estimulación de la pinocitosis y el metabolismo de las lipoproteínas de baja densidad.

Con el objeto de conocer el efecto del flujo en corazones de rata aislados y perfundidos, se probó el efecto del flujo coronario sobre diferentes funciones miocárdicas, contractilidad, conducción aurículo-ventricular y ritmo ventricular espontáneo.

El efecto del flujo coronario en la contractilidad miocárdica es inotrópico positivo a todos los aumentos de flujo, aunque siempre guardando una relación, ya que al primer aumento de flujo el aumento es más grande que en los siguientes.

Con respecto a la conducción A-V, el flujo tuvo efecto dromotrópico positivo ya que siempre redujo el intervalo A-V a mayores valores de flujo con lo que se observa el efecto estimulador del flujo sobre esta función y además permitió que el corazón soportara mayores valores de frecuencia de estimulación sin presentar arritmias.

En el ritmo ventricular espontáneo, el flujo coronario también tuvo un efecto estimulador, ya que aumentaron los latidos por minuto a flujo coronario alto en relación con el flujo coronario bajo.

La bibliografía (28) informa que el cloruro de gadolinio es un bloqueador de los canales de K⁺ y Ca²⁺ activados por estiramiento y tiene la ventaja de poderse usar en un rango micromolar. Se han hecho

ensayos sobre arritmias provocadas por estos canales en ventrículos de perro en donde los resultados han demostrado la existencia del efecto bloqueador del gadolinio en dichos canales. Se conoce también por experimentos realizados en corazón perfundido de cobayo y por los resultados aquí presentados que el flujo coronario estimula las funciones miocárdicas, por lo que se pensó que si los canales activados por estiramiento estaban propuestos como posible mecanismo para "traducir" los estímulos del flujo en respuestas concretas al bloquear estos canales se inhibirían estas respuestas.

Con el propósito de comprobar esta hipótesis, se decidió perfundir el corazón con solución de Krebs-Henseleit modificada adicionada con cloruro de gadolinio $10 \mu\text{M}$ para observar los efectos de este lantánido sobre los efectos estimuladores del flujo ya antes demostrados.

El cloruro de gadolinio tuvo efectos inhibidores sobre los efectos producidos por el flujo coronario. En el efecto sobre la contracción miocárdica esta se vió disminuída en relación con el control, lo mismo ocurrió con el efecto dromotrópico positivo producido por el flujo coronario ya que el intervalo A-V en lugar de disminuir por el efecto del flujo aumentaba o permanecía constante. Con respecto al ritmo ventricular espontáneo el flujo coronario no tuvo efecto estimulador en presencia del cloruro de gadolinio, ya que en relación con el flujo bajo los latidos por minuto permanecieron constantes o incluso disminuyeron, con lo que se observa que el cloruro de gadolinio bloquea los efectos estimuladores del flujo.

Debido a que el cloruro de gadolinio se encargó de disminuir y en muchos casos de bloquear completamente los efectos estimuladores del flujo coronario en todas las funciones ensayadas, proponemos que los canales de K^+ y Ca^{2+} activados por estiramiento están involucrados con el o los mecanismos que permiten la traducción de la señal enviada por el flujo coronario en una propiedad estimuladora sobre las funciones ya descritas anteriormente.

Sin embargo esta posibilidad no excluye a las otras y sería muy importante realizar experimentos que estudiaran las otras hipótesis ya que el sistema no solamente puede constar de un solo estímulo, sino que seguramente es una serie de complejos pasos y reacciones que son necesarios para que el o los mecanismos por los que el flujo coronario produce sus estímulos se lleven a cabo. Es de importancia mayúscula el dilucidar el mecanismo o los mecanismos estimuladores del flujo coronario, ya que el flujo es una constante en el organismo y puede llevar a grandes descubrimientos en áreas tan importantes como la fisiología y farmacología.

REFERENCIAS

- 1.- Abel, R. M. y Reis, R. L. (1970). Effects of coronary blood flow and coronary perfusion pressure on left ventricular contractility in dogs. *Cir. Res.* 27:961-971
- 2.- Arnold, G., Koshe, E., Miessner, A. y Lochner, M. (1968). The importance of the perfusion pressure in the coronary arteries for the contractility and the oxygen consumption of the heart. *Plügers Archiv.* 299:339-356
- 3.- Grabowski, E. F., Jaffe E. A. y Weksler B. B. (1985). Prostacyclin production by cultures endothelial cells monolayers exposed to step increases in shear stress. *J. Lab. Clin. Med.* 105:36-45
- 4.- Karwatowska-prokopczuk, E., Ciabaton, G. y Wennmalm, A. (1989). Effects of hydrodynamic forces on coronary production of prostacyclin and purines. *Amer. J. Physiol.* 256:H1532-H1538
- 5.- Naruse, M., Higashida, T., Naruse, K., Shibasaki, T., Demura, H., Inagami, T. y Shizume, K. (1987). Coronary hemodynamics and cardiac beating modulate atrial natriuretic factor release from isolated Langendorff-perfused rat hearts. *Life Sciences.* 41:421-427
- 6.- Suárez, J. y Rubio, R. (1990). Regulation of glycolytic flux (Gf) by coronary flow (CF) in guinea pig heart. Role of vascular endothelial cell shear stress. *Faseb J.* 4(3):I-270
- 7.- Takala, T. (1981). Protein synthesis in the isolated perfused rat heart. *Basic Res. Cardiol.* 76:44-61
- 8.- Turheim, K., Donath, R., y Kolassa, N. (1976). Myocardial glucose uptake and breakdown during adenosine-induced vasodilation. *Pflügers. Arch.* 365: 197-202

9.- Weisberg, H., Kats, L. N. y Boyd, E. (1963). Influence of coronary flow upon oxygen consumption and cardiac performance. *Cir. Res.* 13:522-528

10.- Zborowska-Sluis, D. R., Mildenberger, R. R. y Klassen, G. A. (1977). The role of coronary and pressure as determinant of myocardial oxygen consumption in the presence or absence of vasomotor tone. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 55:471-477

11.- Gregg, D. E. Blood supply to the heart (1963) en *Handbook of Physiology*. Vol. 2, sección II, Circulation. Eds. W. F. Hamilton y P. Dow (ed). Amer. Physiol. Soc. pp 1517

12.- Rubio, R., Suárez, J. (en prensa). Coronary flow stimulates myocardial contraction, auricular-ventricular transmission and ventricular rhythm: possible role of surface membrane endothelial structures. *Pflugers Archiv*.

13.- Tesfamariam, B. y Cohen R. A. (1988) Inhibition of adrenergic vasoconstriction by endothelial cell shear stress. *Cir. Res.* 63:720-725

14.- Suárez, J. y Rubio, R. (1992) Factores hemodinámicos coronarios y la función glicolítica miocárdica. *Farmacología Cardiovascular: Nuevos principios de la patología de siempre*. Sociedad Mexicana de Cardiología.

15.- Berrier, C., Coulombe, A., Szabo, I., Zorati, M. y Ghazi, A. (1992). Gadolinium ion inhibits loss of metabolites induced by osmotic shock and large stretch-activated channels in bacteria. *Eur. J. Biochem.* 206:559-565

16.- Martín del Campo, D., Gómez, M. y Chávez, A. (1992) Morfología dinámica de las células endoteliales de los vasos aortocoronarios cultivados in vitro. *Arch. Inst. Nal. Cardiol. Méx.* Vol. 62:491-498

- 17.- Baños de MacCarthy, G. y Franco, M. (1992). Aspectos fisiológicos del endotelio. Arch. Inst. Nal. Cardiol. Méx. Vol 62:389-393
- 18.- Simionescu, M. y Simionescu, N. (1981). Differentiated microdomains on the luminal surface of the capillary endothelium II. Partial characterization of their anionic sites. J. Cell Biol. 90:614-621
19. Stein, O., Chajek, T. y Stein, Y. (1976) Ultrastructural localization of concanavalin A in the perfused rat heart. Lab. Invest. 35:103-110
- 20.- Berne, R. y Levy, M. Cardiovascular Physiology. 5a. edición. The C. V. Mosby Company. Toronto, 1986.
- 21.- Buonassisi, V. y Root, M. (1975). Enzymatic degradation of heparin-related mucopolisaccharides from the surface of endothelial cell cultures. Biochem. Biophys. Acta. 385:1-10
- 22.- Furchgott, R. F. (1984) The role of the endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 24:175-197
- 23.- Jaffe, E. A. (1985). Physiologic functions of normal endothelial cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 454:279:291
- 24.- Vanhoutte, P., Rubanyi, G., Miller, V. y Houston, D. (1986) Modulation of vascular smooth muscle contraction by endothelium. Annu. Rev. Physiol. 48:307-320
- 25.- Adams. D., Barakeh, J., Laskey, R. y Van Breemen, C. (1989). Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. FASEB. J. 3:2389-2400

26.- Hallam, T. J. Jacob, R. y Merritt, J. (1988) Evidence that agonist stimulate bivalent-cation influx into human endothelial cells. Biochem. J. 255:179-184

27.- Franco, A., Winegar, B. y Lansman, J. (1991). Open channel blocking by gadolinium ion of the stretch-inactivated ion channel in mdx myotubes. Biophys. J. 59:1164-1170

28.- Yang, X. y Sachs, F. (1989). Block of stretch-activated ion channel in *Xenopus* oocytes by gadolinium and calcium ions. Science. 243:1068-1071