

El sodio intracelular como responsable del daño miocárdico por isquemia

CECILIA MUNDIÑA-WEILENMANN¹, HORACIO E. CINGOLANI¹

El Na⁺ intracelular (Na_i⁺) aumenta durante la isquemia y más aún en la fase inicial de la reperfusión. Este aumento es el responsable, a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺, de la sobrecarga cálcica que ocurre durante los primeros minutos de la reperfusión y que provoca el deterioro de la función contráctil. Durante la isquemia y la reperfusión el aumento de Na_i⁺ se produce por inhibición de los mecanismos que causan el eflujo de Na⁺ y/o por estimulación de los mecanismos que provocan el influjo de Na⁺ a la célula (en particular el intercambiador Na⁺/H⁺). Se han elaborado nuevas estrategias terapéuticas que al inhibir el influjo de Na⁺ impiden el aumento del Na_i⁺. Estas estrategias funcionan como cardioprotectoras ya que interfieren los pasos posteriores al aumento del Na_i⁺ en la cascada de eventos que conducen a la sobrecarga cálcica. REV ARGENT CARDIOL 2000; 68: 859-867.

Palabras clave Na⁺ intracelular - Isquemia y reperfusión - Intercambiador Na⁺/H⁺ - Intercambiador Na⁺/Ca²⁺ - Sobrecarga cálcica

La interrupción del flujo coronario induce en el miocardio una serie de modificaciones intracelulares y extracelulares que de persistir conducen a lesiones irreversibles. Algunas de estas alteraciones son: disminución intracelular de los sustratos energéticos ATP y fosfocreatina con aumentos del Pi, aumentos intracelulares de Na⁺, Ca²⁺ y de especies reactivas del oxígeno (ROS), disminución del pH intracelular y extracelular y aumento del K⁺ extracelular. ¿Estas alteraciones están interrelacionadas? ¿Todas ellas son deletéreas? En esta revisión pretendemos analizar y dar respuesta a estas preguntas enfocando las alteraciones intracelulares en torno de las modificaciones del Na⁺. Creemos que el conocimiento racional de estos mecanismos permitirá en un futuro cercano intentar terapéuticas destinadas a evitar estas modificaciones y sus efectos deletéreas. (1-5)

El aumento del sodio intracelular (Na_i⁺) en la isquemia es una alteración que se halla de manera constante. Como se muestra en la Tabla 1, numerosos estudios describen el aumento del Na_i⁺ utilizando distintas técnicas para su determinación y distintos modelos experimentales. (6) El Na_i⁺ se acu-

mula en el miocardio durante la isquemia y vuelve rápidamente a valores preisquémicos durante la reperfusión. (7-9) Numerosos investigadores sugieren que esta acumulación de Na_i⁺ durante la isquemia y durante la fase inicial de la reperfusión es la que lleva a la sobrecarga de Ca²⁺ de los primeros minutos de la reperfusión. (8, 10) La acumulación de Na_i⁺ también tiene efectos nocivos sobre el metabolismo energético; es capaz de provocar fibrilación ventricular durante la reperfusión y de ocasionar una pérdida neta de K⁺ durante la isquemia o la hipoxia con el resultado de arritmias letales. (11-13) Muchos trabajos demuestran que la disminución de la acumulación del Na_i⁺ durante la isquemia, a través de la inhibición de los mecanismos responsables del ingreso de Na⁺, mejora la recuperación de la función contráctil en la reperfusión. (12, 14)

Veamos por qué ocurre el aumento del Na_i⁺ durante la isquemia miocárdica y el porqué de sus efectos deletéreas.

La acumulación de Na_i⁺ durante la isquemia podría deberse a un aumento en la entrada de Na⁺ en la célula (flujo de entrada de Na⁺) o a una disminu-

Tabla 1
Aumentos del Na⁺ intracelular en la isquemia*

Técnica	Modelo	Tiempo de isquemia	Aumento del Na _i ⁺ (%)	Aumento del Na _i ⁺ + inhibición del NHE (%)	Referencia
RMN	Rata perf./CO ₃ H ⁻	35 min	400		Malloy, 1990 (39)
	Cobayo perf./HEPES	20 min	500		Pike, 1990 (9)
	Rata perf./CO ₃ H ⁻	20 min	300	0 (amilorida)	Murphy, 1991 (40)
	Rata perf./HEPES	21 min	178	0 (EIPA)	Pike, 1993 (41)
	Rata perf./CO ₃ H ⁻	20 min	165		Butwell, 1993 (42)
	Rata perf./CO ₃ H ⁻	20 min	163	114 (EIPA)	Navon, 1994 (43)
	Rata perf./CO ₃ H ⁻	32 min (bajo flujo)	925		Cross, 1995 (44)
	Rata perf./CO ₃ H ⁻	20 min	450		Van Emous, 1997 (45)
	Conejo neonato/CO ₃ H ⁻	40 min	550	200 (EIPA)	Liu, 1997 (46)
	Rata en reposo/CO ₃ H ⁻	50 min	203	160 (HOE 694)	Choy, 1997 (47)
	Rata perf./HEPES	45 min (hipoxia)	200	0 (EIPA)	Dizon, 1998 (48)
Absorción atómica	Rata perf./CO ₃ H ⁻	30 min	390	320 (amilorida)	Tani, 1989 (10)
	Rata perf./HEPES	40 min	325	170 (amilorida)	Weiss, 1990 (49)
Fluorescencia	Miocitos/CO ₃ H ⁻	20 min (inh. metab.)	300		Satoh, 1995 (50)
	Rata miocito/CO ₃ H ⁻	hipoxia	137		Haigney, 1994 (18)
	Rata miocito/HEPES	anoxia, bajo pH	150		Ladilov, 1995 (51)
	Rata miocito/HEPES	CN, bajo pH	200	200 (HOE 694)	Russ, 1996 (38)
Microelectrodos	Cobayo perf./CO ₃ H ⁻	global	-20		Kleber, 1983 (52)
	Cobayo papilar/CO ₃ H ⁻	15 min simulada	140		Vanheel, 1990 (53)

* Aumentos del Na_i⁺ en distintos modelos experimentales y utilizando diferentes técnicas para su determinación. Los aumentos se expresan como % del valor preisquémico y en algunos casos se muestra el % de aumento del Na_i⁺ en presencia de inhibidores del NHE como amilorida, EIPA o HOE 694. El menor aumento del Na_i⁺ en estas condiciones indica la participación del NHE. RMN, resonancia magnética nuclear. Perf., perfusión.

ción en la salida de Na⁺ de ella (flujo de salida de Na⁺). En la Figura 1 puede verse que son varios los mecanismos que median el ingreso y egreso de Na⁺ de la célula. El principal mecanismo que provoca el ingreso de Na⁺ durante la isquemia es el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE). Este intercambiador, que transporta iones H⁺ fuera de la célula intercambiándolos por iones Na⁺ del espacio extracelular, es uno

de los mecanismos más importantes de regulación del pH_i en el miocardio. (15, 16) La energía para este transporte deriva del gradiente de Na⁺ que a su vez es mantenido por la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa. El intercambiador posee un sitio intracelular que es sensible a la concentración de H⁺ de manera tal que su actividad aumenta cuando el pH_i disminuye, como ocurre durante la isquemia. En la isquemia, otra

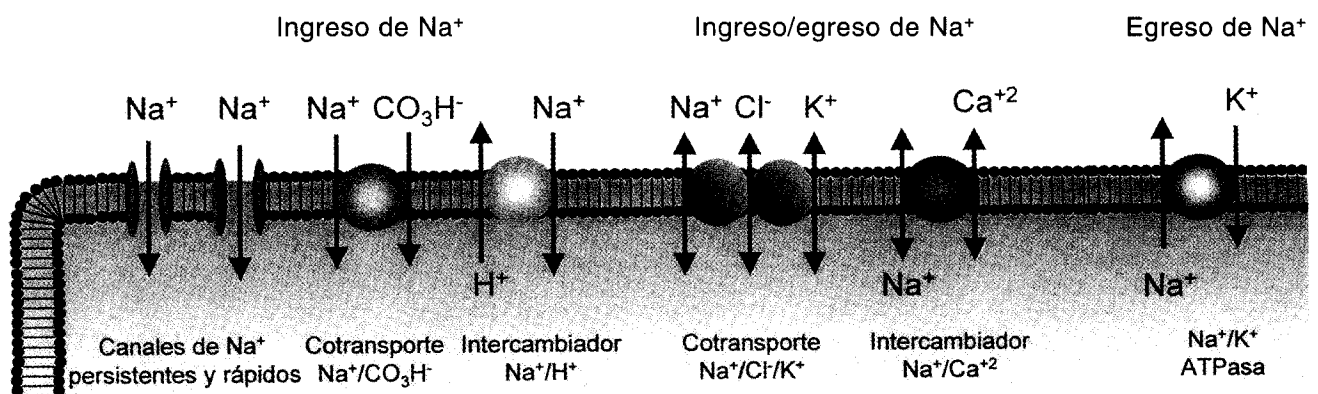


Fig. 1. Vías de ingreso y egreso de Na⁺. El Na⁺ puede entrar en la célula por canales rápidos de Na⁺, por canales persistentes de Na⁺, por el cotransporte Na⁺/CO₃H⁻ o por el intercambiador Na⁺/H⁺ (NHE); estos dos últimos mecanismos están involucrados en la regulación del pH_i. El principal mecanismo responsable de la salida de Na⁺ es la bomba de Na⁺/K⁺-ATPasa. El intercambiador Na⁺/Ca²⁺ y el cotransporte Na⁺/Cl⁻/K⁺, con dependencia de la concentración intracelular y extracelular de iones, el potencial de membrana, el pH y los niveles de ATP intracelulares, podrán actuar ingresando o haciendo salir Na⁺ de la célula.

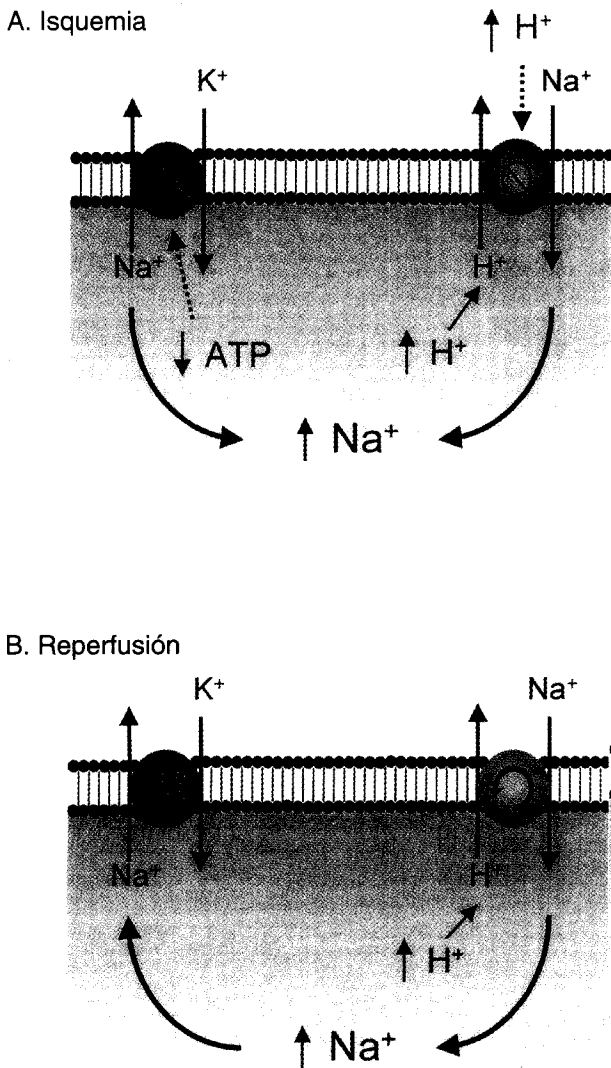


Fig. 2. Aumento del Na^+ intracelular en isquemia/reperfusión. **A.** Durante la isquemia el aumento intracelular de iones H^+ activa al NHE que saca H^+ de la célula intercambiándolos con iones Na^+ . Los H^+ acumulados en el espacio extracelular podrían frenar al NHE. La disminución de los niveles intracelulares de ATP impide el funcionamiento de la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa y la menor salida de Na^+ por esta vía también contribuye a aumentar el Na^+ intracelular (Na^+). **B.** En la reperfusión temprana, la acidosis intracelular aún persiste y el NHE, sobre el que ya no pesa la inhibición de los iones H^+ extracelulares, ingresa Na^+ . La restitución de los niveles de ATP pone en funcionamiento la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa que saca el Na^+ .

posible vía de entrada de Na^+ son los canales persistentes de Na^+ . Estos canales no se inactivan y por lo tanto permanecen abiertos, con lo cual permiten la entrada de Na^+ desde el espacio extracelular. (17-19) De persistir las despolarizaciones durante la isquemia, los canales rápidos de Na^+ también podrían contribuir al aumento de Na^+ .

El principal mecanismo involucrado en el egreso

de Na^+ es la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa. En condiciones fisiológicas, esta bomba es la única vía para expulsar Na^+ de las células. La salida de iones Na^+ en contra de su gradiente electroquímico y el ingreso de iones K^+ requiere la energía que provee la hidrólisis del ATP. El egreso de Na^+ es importante para mantener el balance osmótico y el volumen intracelular así como para mantener la fuerza impulsora de Na^+ que es utilizada por transportadores como el antes mencionado NHE o el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. Un ejemplo de este acople es el hecho de que la inhibición de la bomba de Na^+/K^+ por acción de los digitálicos lleva a un aumento del Na^+ , Na^+ , que a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ provoca un aumento del Ca^{2+} y, en consecuencia, de la contractilidad miocárdica. (20)

¿Qué sucede con los mecanismos de ingreso y egreso de Na^+ durante la isquemia?

Durante la isquemia la célula es forzada a realizar un metabolismo anaeróbico y esto lleva a un aumento de la concentración de H^+ , es decir una disminución del pH_i (Figura 2A). Esto activa a los transportadores que regulan el pH_i , en especial al NHE. En ausencia de flujo coronario, estos H^+ se acumulan en el espacio extracelular y podrían inhibir al NHE. (16) Durante la isquemia, la actividad del NHE, y por ende la entrada de Na^+ por este mecanismo, dependerá entonces de cuánto lo active la acidosis intracelular y de cuánto lo inhiba la acidosis extracelular. Durante los primeros minutos de la isquemia, la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa se encarga de sacar iones Na^+ que se acumulan en la célula por el NHE, pero esto lleva a un consumo mayor de ATP que aumenta el metabolismo anaeróbico y la acumulación de más H^+ generando un círculo vicioso. Durante los primeros minutos de la isquemia, los niveles de ATP están protegidos por el consumo de la fosfocreatina. Pero cuando los niveles de ATP disminuyen, la bomba de Na^+/K^+ -ATPasa está impedida de eliminar Na^+ y contribuye a la sobrecarga de Na^+ .

¿Qué sucede en la reperfusión?

Con la restauración del flujo en la reperfusión, la acidosis extracelular desaparece y también la inhibición que pesa sobre el NHE. Dado que la acidosis intracelular persiste por un período inicial, el NHE hiperactivo aumentaría más el Na^+ . La restitución de los niveles de ATP pone en funcionamiento la bomba Na^+/K^+ -ATPasa (Figura 2B). El aumento de la entrada de Na^+ por el NHE y su salida por la bomba se contraponen; por lo tanto, el aumento de la concentración de Na^+ en los primeros minutos de la reperfusión dependerá del balance entre estos dos mecanismos. (19, 21) Otro mecanismo que podría colaborar en la disminución del Na^+ es el cotransporte $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$. (8)

Recientemente se ha descrito que la prevención

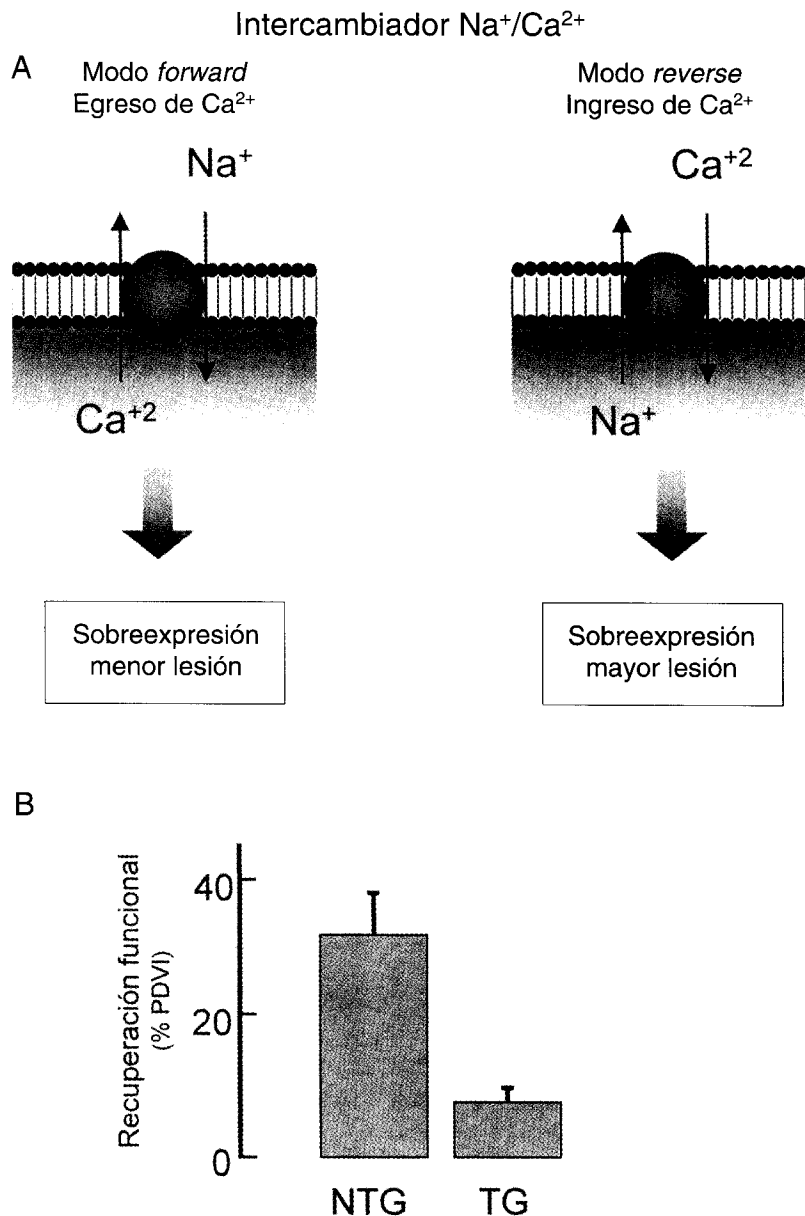


Fig. 3. A. Modelos de modo de acción del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ durante la isquemia/reperfusión. El intercambiador podría actuar en su modo *forward*, promoviendo el egreso de Ca²⁺ de la célula y entonces su sobreexpresión llevaría a una lesión menor por isquemia/reperfusión o podría actuar en su modo *reverse* y su sobreexpresión aumentaría entonces el ingreso de Ca²⁺ durante la isquemia/reperfusión, aumentando más aun el Ca²⁺ intracelular e incrementando la lesión. B. Recuperación funcional. Recuperación de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI) de corazones de ratones transgénicos que sobreexpresan el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ (TG) y ratones no transgénicos (NTG). La PDVI se midió luego de 40 min de reperfusión que siguieron a 20 min de isquemia global y se expresa como % de su valor preisquémico. Los corazones de los ratones TG se recuperaron significativamente menos que los corazones de los ratones NTG. Modificado de (22).

de la sobrecarga de Na⁺_i durante la isquemia, y aun al inicio de la reperfusión, protege de las alteraciones contráctiles que ella produce. (1-5)

El aumento de Na⁺_i podría llevar a un aumento del Ca²⁺_i a través del intercambiador Na⁺/Ca²⁺. Este intercambiador saca Ca²⁺ de la célula intercambiándolo con Na⁺ extracelular (modo *forward*) pero también puede promover la entrada de Ca²⁺ en la célula intercambiándolo con Na⁺_i (modo *reverse*), con dependencia de las concentraciones de los dos iones, el potencial de membrana, el pH y los niveles ATP. Algunos estudios en los que se midieron Ca²⁺ y Na⁺ intracelulares en la misma preparación muestran que existe un aumento de Na⁺_i inmediatamente antes o junto con el aumento del Ca²⁺_i, compatible con el

papel del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en el aumento de Ca²⁺ durante la isquemia y la reperfusión. (10) Si bien pareciera que existe consenso en el hecho de que el intercambiador Na⁺/Ca²⁺ es el responsable del aumento de Ca²⁺ en la reperfusión temprana, todavía se debate si se debe a que se inhibe el modo *forward* (elimina Ca²⁺ de la célula) o a que se activa el modo *reverse* (incorpora Ca²⁺ a la célula) de acción del intercambiador. Para distinguir entre estas dos posibilidades se diseñaron experimentos que utilizaron ratones transgénicos sobreexpresando el intercambiador Na⁺/Ca²⁺. (22) Si el intercambiador funciona en su modo *forward* durante la reperfusión, de manera tal que provoca la salida de Ca²⁺, aumentar la expresión del intercambiador sería beneficio-

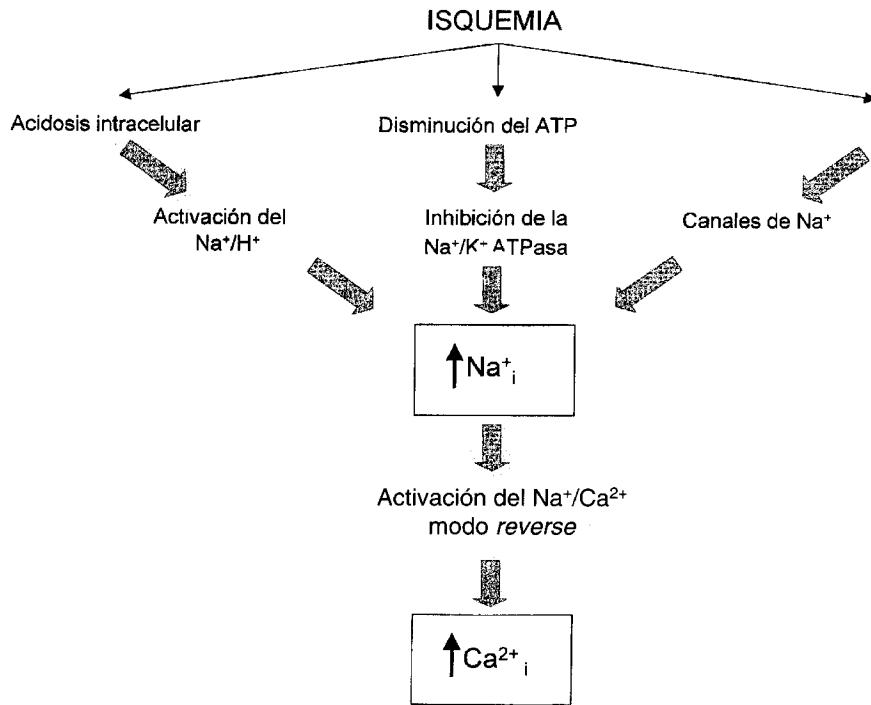


Fig. 4. Esquema de los eventos desencadenados por la isquemia que conducen a la sobrecarga cálcica. La isquemia produce acidosis intracelular que activa al intercambiador Na^+/H^+ , disminución del ATP intracelular que inhibe la actividad de la Na^+/K^+ -ATPasa y por mecanismos aún no conocidos podría aumentar la entrada de Na^+ a través de los canales de Na^+ . En conjunto, esto conduce a un aumento del Na^+ intracelular (Na^+_i). El aumento del Na^+_i , a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ actuando en su modo *reverse*, promueve la entrada de Ca^{2+} en la célula que aumenta la concentración intracelular de Ca^{2+} (Ca^{2+}_i).

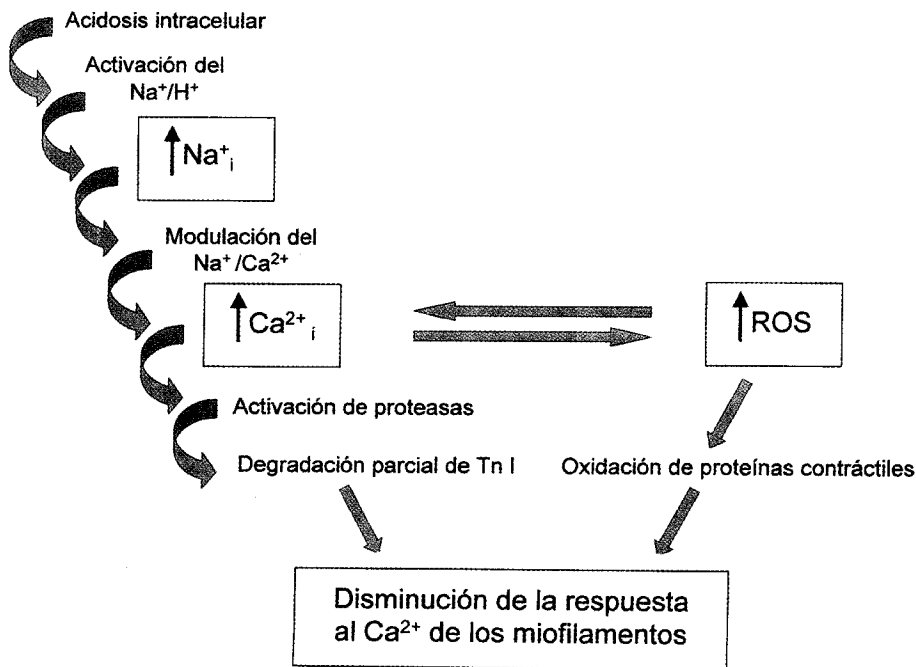


Fig. 5. Esquema de la secuencia de eventos que conducen a la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos. La sobrecarga de Ca^{2+} puede activar a proteasas dependientes de Ca^{2+} , que llevan a la degradación parcial de la troponina I (Tn I). Esta modificación de la Tn I conduce a una disminución de la respuesta máxima y de la sensibilidad al Ca^{2+} de los miofilamentos (respuesta menor al Ca^{2+} de los miofilamentos). Por otro lado, la isquemia transitoria seguida de perfusión aumenta la formación de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos radicales libres que se forman durante la perfusión temprana y dan lugar al estrés oxidativo, pueden llevar a la sobrecarga de Ca^{2+} por provocar daño (oxidación de proteínas y de lípidos) a nivel del sarcolema y del retículo sarcoplasmático. La sobrecarga de Ca^{2+} puede amplificar entonces el daño iniciado por las ROS. Pero además es posible que la sobrecarga de Ca^{2+} pueda aumentar la producción de las ROS. Las ROS pueden actuar directamente sobre las proteínas contráctiles y provocar su oxidación. La consecuencia última de esta cascada de eventos es la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos que es la base molecular del miocardio atontado.

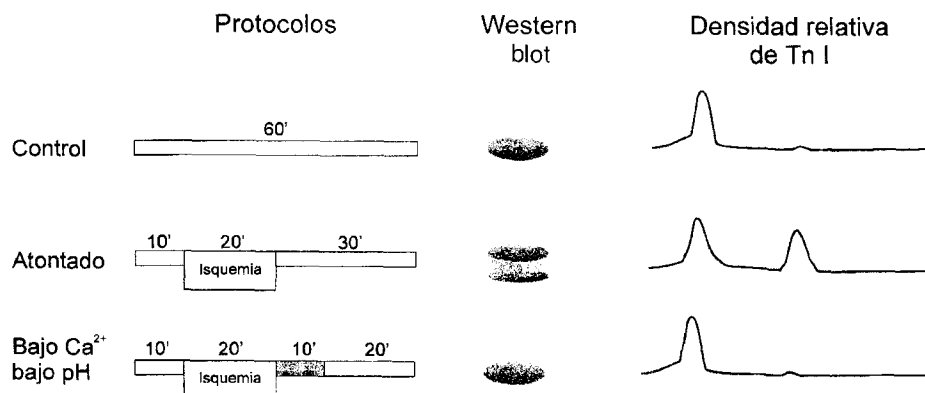


Fig. 6. Degradación de la Tn I en el corazón atontado de rata. Los corazones se perfundieron ya sea durante 60 min (control) o durante 10 min y luego sometidos a una isquemia global de 20 min seguida por un período de perfusión de 30 min (atontado). En un tercer grupo, luego de la isquemia, los corazones se perfundieron durante los primeros 10 min con solución con Ca^{2+} 0,1 mM y pH 6,80 y luego con solución con pH y Ca^{2+} normales los próximos 20 min (bajo Ca^{2+} , bajo pH). Finalizado el experimento, muestras de los corazones fueron resueltas en geles y la presencia de la Tn I truncada se estudió por Western blot con un anticuerpo específico. En la figura se esquematizan los resultados obtenidos: se observó la banda de peso molecular correspondiente a la Tn I, pero en el corazón atontado se observó además una banda de menor peso molecular que corresponde a un producto de proteólisis de la Tn I que desapareció en los corazones reperfundidos con bajo Ca^{2+} /bajo pH. Los mismos resultados se observan en los perfiles densitométricos de la izquierda. Modificado de (24).

so. Si el intercambiador opera en su modo *reverse* durante la perfusión, haciendo incorporar Ca^{2+} a la célula, su sobreexpresión empeoraría la recuperación de la disfunción contráctil posisquémica (Figura 3A). Los resultados mostraron que los ratones que sobreexpresaron el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ se recuperaron menos (22) (Figura 3B), lo cual sugiere que el intercambiador está actuando en su modo *reverse*, haciendo ingresar Ca^{2+} en la célula durante la perfusión. El esquema de la Figura 4 resume la cascada de eventos que llevan al aumento del Na_i^+ y a la sobrecarga cálcica en respuesta a la isquemia.

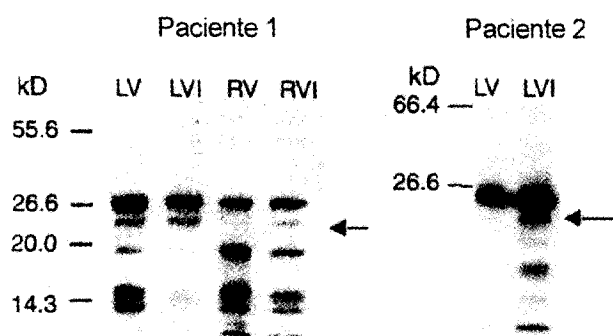


Fig. 7. Western blots de muestras de ventrículo derecho (RV) e izquierdo (LV) de dos pacientes sometidos a cirugía de revascularización (*bypass* coronario). Las muestras se obtuvieron antes de la operación (LV, RV) y luego de ella (LVI, RVI). La Tn I y sus productos de proteólisis se identificaron utilizando anticuerpos específicos. La flecha indica un producto de proteólisis de la Tn I similar al detectado en el corazón atontado de rata, descrito en la Figura 6. Nótese que el paciente 1 muestra proteólisis parcial de Tn I en LV aun antes de producirse la isquemia global inducida por el *cross-clamping* aórtico debido a su enfermedad isquémica previa. Modificado de (28).

La sobrecarga de Ca^{2+} podría afectar la función contráctil y producir el atontamiento miocárdico a través de una proteólisis dependiente del Ca^{2+} (Figura 5). (23) El daño que provoca el Ca^{2+} en otros tejidos está mediado por lo menos en parte por calpaínas, proteasas dependientes de Ca^{2+} . Estas enzimas, presentes también en el miocardio, producen una proteólisis limitada que podría provocar al-

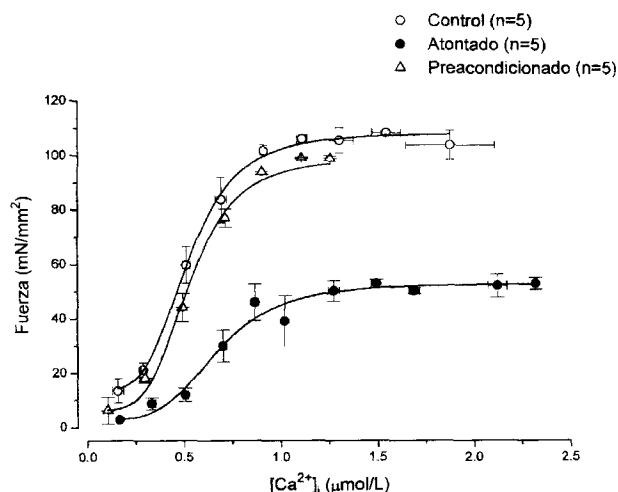


Fig. 8. Relación $[\text{Ca}^{2+}]_i$ -fuerza desarrollada en estado estacionario, de trabéculas de ventrículo derecho de rata. Las trabéculas de corazones sometidos a 20 min de isquemia seguidas de 20 min de perfusión (atontado) desarrollaron menor fuerza que las trabéculas de corazones controles en todas las concentraciones de Ca^{2+} estudiadas. Un período de isquemia breve (5 min) previo a la isquemia de 20 min (preacondicionado), previno la menor respuesta al Ca^{2+} detectada en los corazones atontados. Modificado de (29).

teraciones en las proteínas no detectables por métodos histológicos convencionales pero con consecuencias funcionales importantes. Dentro de las proteínas contráctiles, la troponina I (Tn I) es blanco de la acción de las calpaínas. Varios hechos avalan esta hipótesis: 1) la reperfusión con bajo Ca^{2+} y bajo pH previene la degradación de la Tn I que ocurre luego de 20 minutos de reperfusión (Figura 6); (24) 2) la reperfusión con calpastatina, inhibidor natural de la calpaína, y con otros inhibidores de proteasas protegen al miocardio del atontamiento; (25-27) 3) experimentos en animales transgénicos que poseen la alteración de la Tn I igual a la hallada luego de un período de isquemia y reperfusión muestran que se comportan como corazones atontados (28) y 4) se encontró proteólisis de la Tn I en miocardio de pacientes sometidos a cirugía de *bypass* coronario por enfermedad isquémica; proteólisis que en algunos casos se detectó aun antes de la cirugía (Figura 7). (28) Los trastornos a nivel de la Tn I podrían ser la base molecular que explica la disminución de la respuesta al Ca^{2+} de las proteínas contráctiles, causa última de la disminución de la contractilidad en el corazón atontado. (23, 25) Como se muestra en la Figura 8, en el corazón atontado la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos está disminuida y esta disminución se revierte con el precondicionamiento isquémico. (29)

Hasta aquí describimos uno de los principales mecanismos propuestos en la lesión por isquemia/reperfusión: la sobrecarga transitoria de Ca^{2+} en la cual el aumento de Na^+_i aparece como un paso previo muy importante (Figura 4). Pero otro factor que se involucra como mediador en la lesión por reperfusión es la generación de radicales libres. La hipótesis de los radicales libres no es mutuamente excluyente con la hipótesis de la sobrecarga de Ca^{2+} y quizás ambas representen facetas diferentes de un mismo proceso fisiopatológico.

La hipótesis de los radicales libres sugiere que durante la fase inicial de la reperfusión del miocardio isquémico se produce un rápido aumento de especies reactivas del oxígeno (ROS). Estos radicales libres son derivados del oxígeno, como el anión superóxido, precursor a su vez de otras especies reactivas como el peróxido de hidrógeno y el radical oxhidrilo. El anión superóxido también podría reaccionar con el óxido nítrico (NO) para dar el radical peroxinitrito, una especie altamente reactiva. (30) El estrés oxidativo resultante de la generación de ROS puede llevar directamente a una disminución de la respuesta al Ca^{2+} de los miofilamentos por oxidación de las proteínas contráctiles (oxidación de los grupos tioles) (31) o indirectamente por causar sobrecarga de Ca^{2+} . Las ROS podrían provocar la sobrecarga de Ca^{2+} por actuar: 1) a nivel del sarcolema,

alterando su permeabilidad (por peroxidación de ácidos grasos poliinsaturados que constituyen la membrana) y/o la actividad de las ATPasas Na^+/K^+ y Ca^{2+} dependientes y del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (32, 33) y 2) a nivel del retículo sarcoplasmático, disminuyendo la actividad de la Ca^{2+} ATPasa y en consecuencia el secuestro de Ca^{2+} por esta organela, aumentando así el Ca^{2+} citosólico. (7) Pero así como el aumento de ROS puede causar un aumento del Ca^{2+} intracelular, un aumento del Ca^{2+} intracelular podría estimular la síntesis de ROS (Figura 5). (34)

Como se mencionó, el radical superóxido, generado en el miocardio reperfundido, puede reaccionar con el NO. Esta reacción tendría por un lado un efecto beneficioso al impedir los efectos deletéreos del radical superóxido (función antioxidante del NO) pero por otro lado el producto de la reacción del NO con el anión superóxido es el peroxinitrito, una especie que luego de protonarse se descompone en productos altamente tóxicos como el radical oxhidrilo. A pesar de que los estudios aún son controvertidos, la producción de NO aparece como cardioprotectora por su habilidad de atrapar radicales libres durante la reperfusión del miocardio isquémico y también por acciones mediadas por el segundo mensajero GMPc. (30, 35) El aumento en la producción de NO parece ser el responsable de la ventana tardía del precondicionamiento isquémico. (35)

Sin lugar a dudas el conocimiento acabado de los mecanismos involucrados en la isquemia permite diseñar estrategias terapéuticas racionales de protección basadas sobre la prevención del aumento del Na^+_i y su consecuencia, la sobrecarga cálcica. Respecto de esta última como responsable de alteraciones contráctiles, diremos que se ha logrado con éxito la protección de la lesión por isquemia y reperfusión en distintos eslabones de la cascada de eventos que hemos detallado anteriormente (Figura 4). Es así que actuando sobre uno de los últimos eslabones, la sobrecarga cálcica, por medio de la prevención del ingreso de Ca^{2+} en la célula con bloqueantes cálcicos en forma aguda (36) o crónica, (37) puede lograrse protección. Es interesante que esta protección, que también se consigue perfundiendo corazones con bajo calcio extracelular, se logra no por impedir exactamente la vía por la cual el ingreso de Ca^{2+} aumenta durante la isquemia/reperfusión, sino por mantener una concentración intracelular de Ca^{2+} baja. Recordemos que la sobrecarga cálcica se produce a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y no a través de los canales L. De cualquier manera, la inhibición de esta vía parece que es efectiva para disminuir la sobrecarga cálcica. El mecanismo racional, sin embargo, sería impedir que el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ actuara ingresando Ca^{2+} en la célula. Esto podría lograrse impidiendo al aumento de Na^+_i o

actuando directamente sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo *reverse*. Se ha comprobado experimentalmente que estas dos estrategias, la anulación del aumento del Na^+_i por impedir la activación del NHE (1, 2, 5, 38) y el bloqueo del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo *reverse*, (3, 4) son efectivos en la protección del miocardio atontado.

SUMMARY

INTRACELLULAR SODIUM RESPONSIBLE OF MYOCARDIAL ISCHEMIC DAMAGE

Intracellular Na^+ (Na^+_i) increases during ischemia and a further increase is detected at the beginning of reperfusion. This increase is responsible, through the $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange, for the calcium overload that occurs during the first minutes of reperfusion and causes detrimental effects on the contractile function. During ischemia and reperfusion the increase in Na^+_i is produced by a decrease in the mechanisms that cause Na^+ efflux and/or by an increase in the mechanisms that promote Na^+ influx to the cell (in particular the Na^+/H^+ exchange). New therapeutic strategies that block Na^+ influx inhibiting the increase in Na^+_i have been developed. These strategies are cardioprotective by preventing downstream steps to the increase in Na^+_i in the sequence of events that leads to the calcium overload.

Key words Intracellular Na^+ - Ischemia and reperfusion - Na^+/H^+ exchanger - $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger - Calcium overload

BIBLIOGRAFIA

- Gumina RJ, Buerger E, Eickmeier C y col. Inhibition of the Na^+/H^+ exchanger confers greater cardioprotection against 90 minutes of myocardial ischemia than ischemic preconditioning in dogs. *Circulation* 1999; 98: 2519-2526.
- Gumina RJ, Mizumura T, Beier N y col. A new sodium/hydrogen exchange inhibitor, EMD 85131, limits infarct size in dog when administered before or after coronary artery occlusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1998; 286: 175-183.
- Ladilov Y, Haffner S, Balsler-Scafer y col. Cardioprotective effects of KB-R7943: A novel inhibitor of the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger. *Am J Physiol* 1999; 276: H1868-H1876.
- Mosca SM, Cingolani HE. Comparison of the protective effects of ischemic preconditioning and the Na^+/H^+ exchanger blockade. *Naunym-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 2000; 362: 7-13.
- Yamamoto S, Matsui K, Kitano M y col. SM-20550, a new Na^+/H^+ exchange inhibitor and its cardioprotective effect in ischemia/reperfused isolated rat hearts by preventing Ca^{2+} -overload. *J Cardiovasc Pharmacol* 2000; 35: 855-862.
- Murphy E, Cross HR, Steenbergen C. Na^+/H^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange: Their role in the rise in cytosolic free $[\text{Ca}^{2+}]$ during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J* 1999; Suppl K: K18-K30.
- Hearse DJ. Stunning: A radical review. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 853-876.
- Imahashi K, Kusuoka H, Hashimoto K y col. Intracellular sodium accumulation during ischemia as the substrate for reperfusion injury. *Circ Res* 1999; 84: 1401-1406.
- Pike MM, Kitakaze M, Marbán E. ^{23}Na -NMR measurement of intracellular sodium in intact perfused ferret hearts during ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1990; 259: H1767-H1773.
- Tani M, Neely J. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic hearts: Possible involvement of H^+/Na^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$. *Circ Res* 1989; 65: 1045-1056.
- Hendriks M, Mubagwa K, Verdonck F y col. New Na^+/H^+ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function high-energy phosphate resynthesis and reduces Ca^{2+} overload in isolated perfused rabbit heart. *Circulation* 1994; 89: 2787-2798.
- Pike MM, Luo CS, Yanagida S y col. ^{23}Na and ^{31}P nuclear magnetic resonance studies of ischemia-induced ventricular fibrillation: Alteration of intracellular Na^+ and cellular energy. *Circ Res* 1995; 77: 394-406.
- Shivkumar K, Deutsch NA, Lamp ST y col. Mechanism of hypoxic K^+ loss in rabbit ventricle. *J Clin Invest* 1997; 100: 1782-1788.
- Rubin Y, Navon G. Inhibition of sodium influx and improved preservation of rat hearts during hypothermic ischemia by furosemide and bumetanide: A ^{23}Na - and ^{31}P -NMR study. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 1403-1411.
- Cingolani HE, Koretsune Y, Marbán E. Recovery of contractility and pH_i during respiratory acidosis in ferret hearts: Role of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol* 1990; 259: H843-H848.
- Lazdunski M, Frelin C, Vigne P. The sodium/hydrogen exchange system in cardiac cells: Its biochemical and pharmacological properties and its role in regulating internal concentrations of sodium and internal pH. *J Mol Cell Cardiol* 1985; 17: 1029-1042.
- Eigel BN, Hadley RW. Contribution of Na^+ channel and Na^+/H^+ exchanger to the anoxic rise of $[\text{Na}]$ in ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1999; 277: H1817-H1822.
- Haigney MCP, Lakatta EG, Stern MD y col. Sodium channel blockade reduced hypoxic sodium loading and sodium-dependent calcium loading. *Circulation* 1994; 90: 391-399.
- Xiao X-H, Allen DG. Role of Na^+/H^+ exchanger during ischemia and preconditioning in the isolated rat hearts. *Circ Res* 1999; 85: 723-730.
- Satoh H, Ginsburg KS, Qing K y col. KB-R7943 block of Ca^{2+} influx via $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange does not alter twitches or glycoside inotropy but prevents Ca^{2+} overload in rat ventricular myocytes. *Circulation* 2000; 101: 1441-1446.
- Van Emous JG, Schreur JHM, Ruigrok TJC y col. Both Na^+/K^+ ATPase in Na^+/H^+ exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1998; 30: 337-348.
- Cross H, Lu L, Steenbergen C y col. Overexpression of the cardiac $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchanger increases susceptibility to ischemia/reperfusion injury in male, but not in female transgenic mice. *Circ Res* 1998; 83: 1215-1223.
- Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999; 79: 600-634.
- Gao W, Atar D, Liu Y y col. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res* 1997; 80: 393-399.
- Gao W, Liu Y, Marbán E. Mechanism of decreased myofilament Ca^{2+} responsiveness in stunned rat ventricular myocardium: Relative roles of soluble cytosolic factors versus structural alterations. *Circ Res* 1996; 78: 455-465.
- Matsumura Y, Saeki E, Inoue M y col. Protective effects of the protease inhibitor leupeptin against myocardial stunning. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993; 22: 135-142.
- Urthaler F, Wolkowicz PE, Digerness SB y col. MDL-28170,

- membrane-permeant calpain inhibitor, attenuates stunning and PKC epsilon proteolysis in reperfused ferret hearts. *Cardiovasc Res* 1997; 35: 60-67.
28. Murphy AM, Kogler H, Georgakopoulos y col. Transgenic mouse model of stunned myocardium. *Science* 2000; 287: 488-491.
 29. Pérez NG, Marbán E, Cingolani HE. Preservation of myofilament calcium responsiveness underlies protection against myocardial stunning by ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1999; 42: 636-643.
 30. Maulik N, Engelman DT, Watanabe M y col. Nitric oxide/carbon monoxide. A molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation* 1996; 94 (Suppl II): II-398-II-406.
 31. Suzuki S, Kaneko M, Chapman DC y col. Alterations in cardiac contractile proteins due to oxygen free radicals. *Biochem Biophys Acta* 1991; 1074: 95-100.
 32. Kim MS, Akera T. O₂ free radicals: Cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol* 1987; 252: H252-H257.
 33. Reeves JP, Bailey CA, Hale CC. Redox modification of sodium-calcium exchange activity in cardiac sarcolemmal vesicles. *J Biol Chem* 1986; 261: 4948-4955.
 34. Obata T, Tamura M, Yamanaka Y. Evidence of hydroxyl free radical generation by calcium overload in rat myocardium. *J Pharm Pharmacol* 1997; 49: 787-790.
 35. Shinmura K, Tang X-L, Takano H y col. Nitric oxide donors attenuate myocardial stunning in conscious rabbits. *Am J Physiol* 1999; 277: H2495-H2503.
 36. Du Toit EF, Opie LH. Modulation of severity of reperfusion stunning in the isolated rat heart by agents altering calcium flux at onset of reperfusion. *Circ Res* 1992; 70: 960-967.
 37. Moreyra AE, Gelpi RJ, Mosca SM y col. Chronic administration of nicardipine attenuates myocardial stunning in isolated rabbit hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26: 1403-1409.
 38. Russ U, Balsler C, Scholz W y col. Effects of the Na⁺/H⁺-exchange inhibitor Hoe 642 on intracellular pH, calcium and sodium in isolated ventricular myocytes. *Pflugers Arch* 1996; 433: 26-34.
 39. Malloy C, Buster D, Castro M y col. Influence of global ischemia on intracellular sodium in the perfused rat heart. *Magn Res Med* 1990; 15: 33-44.
 40. Murphy E, Perlman M, London RE y col. Amiloride delays the ischemia-induced rise in cytosolic free calcium. *Circ Res* 1991; 69: 1250-1258.
 41. Pike MM, Luo CS, Clark MD. NMR measurements of Na⁺ and cellular energy in ischemic rat heart: Role of Na⁽⁺⁾-H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1993; 265: H2017-H2026.
 42. Butwell N, Ramassamy R, Lazar I y col. Effect of lidocaine on contracture, intracellular sodium and pH in ischemic rat hearts. *Am J Physiol* 1993; 264: H1884-1889.
 43. Navon G, Werrmann JG, Maron R y col. ³¹P NMR and triple quantum filtered ²³Na NMR studies of the effects of inhibition of Na⁺/H⁺ exchange on intracellular sodium and pH in working and ischemic hearts. *Magn Res Med* 1994; 32: 556-564.
 44. Cross H, Radda G, Clarke K. The role of Na⁺/K⁺ ATPase activity during low flow ischemia in preventing myocardial injury: A ³¹P, ²³Na and ⁸⁷Rb NMR spectroscopic study. *Magn Res Med* 1995; 34: 673-685.
 45. Van Emous J, Nederhoff M, Ruigrok T y col. The role of the Na⁺ channel in the accumulation of intracellular Na⁺ during myocardial ischemia: Consequences for post-ischemic recovery. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 85-96.
 46. Liu H, Cala PM, Anderson SE. Ethylisopropylamiloride diminishes changes in intracellular Na, Ca and pH in ischemic newborn myocardium. *J Mol Cell Cardiol* 1997; 29: 2077-2086.
 47. Choy I, Schepkin V, Budinger T y col. Effects of specific sodium/hydrogen exchange during cardioplegic arrest. *Ann Thorac Surg* 1997; 64: 94-99.
 48. Dizon J, Burkhoff D, Taukela J y col. Metabolic inhibition in the perfused rat heart: Evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol* 1998; 274: H1082-1089.
 49. Weiss R, Lakatta E, Gerstenblith G. Effects of amiloride on metabolism and contractility during reoxygenation in perfused rat hearts. *Circ Res* 1990; 66: 1012-1022.
 50. Satoh H, Hayashi H, Katoh H y col. Na⁺/H⁺ and Na⁺/Ca²⁺ exchange in regulation of [Na⁺]_i and [Ca²⁺]_i during metabolic inhibition. *Am J Physiol* 1995; 268: H1239-H1248.
 51. Ladilov Y, Siegmund B, Piper H. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na⁺/H⁺ exchange. *Am J Physiol* 1995; 268: H1531-H1539.
 52. Kleber A. Resting membrane potential, and intracellular sodium activity during acute global ischemia in isolated perfused guinea pig hearts. *Circ Res* 1983; 52: 442-450.
 53. Vanheel B, de Hemptinne A, Leusen I. Acidification and intracellular sodium activity during stimulated myocardial ischemia. *Am J Physiol* 1990; 259: C169-179.