

Consecuencias funcionales y ultraestructurales de la administración de amlodipino en un modelo experimental de miocardio aturdido

V. Pallarés Carratalá^{a,b,c}, A. Hernández Martínez^a, M. Portolés Sanz^d y J. Cosín Aguilar^a

Unidades ^aCardiocirculatoria y de ^bBiología y Patología Celular. Centro de Investigación. Hospital Universitario La Fe. Valencia. ^cUnión de Mutuas. Castellón. ^dClínica MEDEFIS. Vila-real. Castellón

Introducción y objetivos. Desde la identificación del miocardio aturdido se han realizado estudios para determinar la causa que produce la disfunción postisquémica e identificar los posibles agentes que la pueden atenuar. Nuestro objetivo es analizar las consecuencias funcionales y ultraestructurales del tratamiento con amlodipino en un modelo experimental canino de aturdimiento miocárdico inducido por múltiples episodios de isquemia de corta duración.

Material y métodos. Se analizan dos series de animales: serie control (SI) ($n = 15$) y serie amlodipino (SII) ($n = 15$) (se administran 5 mg/día de amlodipino desde 7 días antes a la aplicación del protocolo isquémico [PI] hasta 15 días después). Se implanta un par de cristales ultrasónicos crónicos en territorio dependiente de la arteria descendente anterior, se realizan 20 oclusiones de 2 min de duración y 3 min de recuperación entre ellas. Se analizan la frecuencia cardíaca, la presión ventricular izquierda, la derivada de la presión respecto al tiempo de la presión del ventrículo izquierdo (dP/dt), el flujo coronario y parámetros de función regional. Tras la aplicación de PI, el ECG y la función regional se monitorizan durante los siguientes 15 días. Los perros fueron sacrificados de modo escalonado en grupos de 10, cinco de cada serie para estudio de ultraestructura.

Resultados. Antes de la aplicación del PI, el flujo coronario era un 16,2% mayor en los perros SII. Durante la aplicación del PI, en la fase de isquemia los perros de la SII presentaron hipocinesia, mientras que en los de la SI se producía discinesia. En la fase de aturdimiento miocárdico, la máxima afectación de la fracción de acortamiento se produjo en el tercer día en la SII ($6,9 \pm 1,9\%$; $p < 0,001$), mientras que en la SI ocurría más tardíamente (día 5 tras la aplicación del PI) ($5,1 \pm 1,9\%$; $p < 0,001$); la afectación máxima de la fracción de acortamiento fue mayor en la serie control. En ambas series la fracción de acortamiento se había recuperado totalmente el día 15. Sin embargo, en los perros tratados con amlodipino se constató un mayor número de mitocondrias por sarcómero tras la aplicación del PI (36% en SII y 14,3% SI; $p < 0,001$). En el estudio de ultraestructura se observó que el amlodipino se asoció a un mayor porcentaje de mitocondrias dañadas y de fusiones en el estudio basal, y tras la aplicación del PI hubo un mayor número de mitocondrias emparejadas (36% en SII frente a 14,3% en SI; $p < 0,001$).

Conclusiones. Nuestros datos indican que el amlodipino es efectivo a la hora de preservar parcialmente la función contrátil del miocardio sometido a isquemias breves y repetidas seguidas de cortos períodos de reperfusión, y de acelerar parcialmente la recuperación funcional y estructural del miocardio aturdido una vez cesados los procesos isquémicos.

Correspondencia: Dra. A. Hernández Martínez.
Unidad Cardiocirculatoria. Centro de Investigación.
Hospital Universitario La Fe.
Avda. Campanar, 21. 46009 Valencia.
Correo electrónico: hernandez_amp@gva.es

Palabras clave:
Isquemia. Aturdimiento miocárdico. Ultraestructura.
Mitocondria. Amlodipino.

FUNCTIONAL AND ULTRASTRUCTURAL CONSEQUENCES OF AMLODIPINE ADMINISTRATION IN AN EXPERIMENTAL MODEL OF STUNNED MYOCARDIUM

Introduction and objectives. Since myocardial stunning was first identified, studies have been done to determine the cause of postischemic dysfunction and to know what agents are able to reduce it. The aim of this study is to examine the effect of treatment with amlodipine on myocardial stunning due to brief, repeated ischaemic episodes (IP).

Material and methods. Two series of dogs were analyzed: control (SI; n = 15) and amlodipine (SII; n = 15) (5 mg/day p.o. from 7 days before the IP to 15 days after). A pair of chronic ultrasonic crystals in the left anterior descending coronary artery (ischemic area) was implanted, 20 occlusions of 2 min each and 3 min of recovery between them were induced. Heart rate, left ventricular pressure, dP/dt, and coronary flow were measured, as well as regional function parameters (end-systolic and end-diastolic segment lengths and segment shortening fraction –ESL, EDL, %SS–). After IP, daily ECG and regional function parameters were registered for 15 days. Samples for ultrastructural study were taken in basal situation, and 3-5 days and 15 days after IP.

Results. Before IP application, the coronary flow was 16.2% higher in the amlodipine series ($p < 0.05$). Coronary occlusions in SII dogs produced hypokinesis in the shortening fraction, while the SI dogs shortening fraction values fell to dyskinesia values. During the follow-up myocardial stunning was observed; there was a gradual impairment of the %SS in the control series that reached its lowest peak on the 5th day ($5.1 \pm 1.9\%$, $p < 0.001$). In the amlodipine series, contractility impairment occurred earlier (third day) and was milder ($6.9 \pm 1.9\%$, $p < 0.001$). In both series SS% recovered completely by day 15. The ultrastructural study showed that amlodipine increased the damaged mitochondria and, after the PI application, mitochondrial fusions at baseline. However, in SII an increased number of mitochondria per sarcomere was seen after PI application (36% SII vs 14.3% SI, $p < 0.001$).

Conclusions. Amlodipine partially preserves the myocardial contractile function injured by brief, repeated ischemias and helps the myocardium stunned recover earlier both functionally and ultrastructurally.

Key words:
Ischaemia. Stunning myocardial. Ultrastructure.
Mitochondria. Amlodipine.

Introducción

Durante el tiempo que ha transcurrido desde que se identificó por primera vez el miocardio aturdido se ha realizado un importante número de estudios dirigidos a determinar la causa que produce la disfunción postisquémica, así como a identificar los posibles agentes que puedan atenuar este fenómeno. En modelos experimentales de isquemia única, uno de los mecanismos implicados en el aturdimiento está relacionado con un aumento de calcio en el citosol de la célula, manteniéndose así hasta los primeros momentos de la reperfusión¹⁻³. Basándose en este mecanismo, se ha demostrado el efecto cardioprotector de los bloqueadores de los canales del calcio (BCC), y la mayoría de los autores están de acuerdo con la hipótesis de la sobrecarga del calcio; estudios con verapamilo⁴, diltiazem⁵ y nifedipina⁶ han demostrado su eficacia, aunque se administre incluso en el momento de la reperfusión⁷. Estos efectos beneficiosos también se han observado en modelos de aturdimiento producidos por isquemias repetidas⁸. En 1992, Gross y Pieper⁹ administraron amlodipino, antes de la realización de 9 occlusiones de 5 min con 15 min de reperfusión entre cada una de ellas, y demostraron que este fármaco atenúa la disfunción contráctil postisquémica, con una mejora en la mecánica regional, además de en la función bioquímica y mitocondrial. Por todo ello, y dadas las características de acción del amlodipino en pacientes con miocardiopatía isquémica o idiopática¹⁰, diseñamos el presente estudio, cuyo objetivo ha sido analizar los efectos del amlodipino, suministrado previamente, en un modelo experimental canino de aturdimiento miocárdico inducido por múltiples episodios de isquemia de corta duración^{11,12}.

Material y métodos

Series experimentales

Se han incluido 30 perros mestizos válidos, de ambos sexos, con peso comprendido entre 19 y 29 kg, procedentes de granjas y criados para tal finalidad. En todos los casos se cumple la normativa sobre protección de animales utilizados para experimentación establecida por la Administración (Real Decreto 223/1988); además, el protocolo fue sometido al comité ético de experimentación animal de nuestro hospital. Los animales, que habían sido debidamente vacunados y desparasitados, se mantuvieron estabulados durante al menos los 10 días previos a la realización del experimento y durante los días posteriores en los que se llevaron a cabo los controles pertinentes, siendo revisados a lo largo de este tiempo por un veterinario especialista.

Se han constituido dos series de estudio (control [SI] y tratada con amlodipino [SII]) asignando de modo alternativo los perros a cada una de estas dos series. La asignación tanto a las series como a los grupos de seguimiento, como se muestra

más adelante, fue realizada por el personal de estabularios, sin la utilización ningún método específico de ocultación de la distribución (estudio abierto). La serie I estaba formada por 15 perros con un peso medio de $20,7 \pm 3,3$ kg (6 machos) y la serie II por 15 perros con peso medio de $22 \pm 3,2$ kg (9 machos). En la serie II se administró amlodipino en dosis de 5 mg/día por vía oral desde 7 días previos a la realización del protocolo isquémico hasta el día en el que el animal era sacrificado.

Preparación experimental

Estudios de función. Se indujo la anestesia con pentobarbital sódico (30 mg/kg), succinilcolina (0,5 mg/kg) y cloruro mórfito (2 mg/kg), manteniendo perfusión continua intravenosa de succinilcolina (0,4 mg/h) y cloruro mórfito (2,4 mg/h) en solución salina. Tras la intubación orotraqueal, se mantuvo la ventilación con un respirador volumétrico Temel con una mezcla de oxígeno (60%) y protóxido de nitrógeno (40%).

Se realizó toracotomía lateral izquierda en el quinto espacio intercostal y, tras pericardiectomía, se procedió a la disección de la arteria coronaria descendente anterior (DA) en su tercio proximal, pasando un lazo para posibilitar la realización de oclusiones con un *clamp* vascular; se situó asimismo un medidor ultrasónico de flujo Transonic Systems para el control del flujo coronario (FIC). Para el control de contractilidad miocárdica segmentaria se implantó un par de cristales ultrasónicos (2 mm de diámetro y 5 MHz) en el subendocardio de la pared anterior del ventrículo izquierdo, en la zona irrigada por la arteria a ocluir (DA), siguiendo el eje longitudinal del corazón. Para el control de la presión ventricular izquierda se implantó un catéter a través de la pared libre del ventrículo izquierdo. Se llevó a cabo monitorización del ECG mediante electrodos subcutáneos colocados en las extremidades.

Tras la preparación del animal se procedió a la realización del protocolo isquémico (PI), consistente en 20 oclusiones completas de DA de 2 min de duración, seguida cada una de ellas por 3 min de reperfusión, protocolo que provoca un aturdimiento miocárdico¹². Una vez finalizado éste, se procedió a retirar los controles de presión ventricular y de flujo coronario, y al cierre del tórax exteriorizando a través de la pared torácica los cables de los cristales ultrasónicos para hacer posible la monitorización diaria de la contractilidad miocárdica segmentaria durante los 15 días siguientes a la aplicación del protocolo isquémico. Una vez despiertos, los animales se mantuvieron en estabulario bajo control y cuidados veterinarios. Se efectuaron controles diarios de los parámetros monitorizados. El último día del estudio, tras la anestesia, intubación y apertura del tórax, y después del registro del flujo coronario, contractilidad miocárdica segmentaria y presión intraventricular izquierda, el animal se sacrificaba mediante inducción eléctrica de fibrilación ventricular.

Estudios de ultraestructura. Para la obtención de muestras anatómicas en las que estudiar los cambios en la ultraestructura del miocardio, los perros fueron sacrificados en tres grupos de 10 con diferentes períodos de seguimiento (5 de cada serie cada vez): el primer grupo antes de la aplicación del protocolo isquémico, tras 7 días de estabilización; el segundo grupo entre los días 3 y 6 tras la aplicación del protocolo isquémico y tratando de coincidir con la mayor afectación de la función regional miocárdica¹², y por último 10 perros fueron sacrificados 15 días después de la aplicación del protocolo isquémico.

Para el estudio de ultraestructura se recogieron muestras de tejido miocárdico de la zona donde se habían colocado los cristales (zona isquemizada). Las muestras se fijaron en una solución de glutaraldehído al 1,5% y formaldehído al 1% en tampón cacodilato 0,1 M (pH 7,4), lavadas en el tampón y pos-

fijadas en O_3O_4 al 1%. Se deshidrataron con etanol y embebieron en Epon 812. Se obtuvieron cortes semifinos (1,5 μm) que se tiñeron con toluidina al 0,5% para su observación con microscopio óptico, y cortes ultrafinos (60 nm) montados en rejillas de cobre y contrateñidos con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2% y citrato de plomo al 2,7% para su observación con microscopio electrónico (Phillips 301 EM); se obtuvieron 12 fotografías de cada muestra que se amplían para obtener un aumento lineal entre $\times 13.500$ y $\times 45.000$. Las micrografías fueron estudiadas mediante análisis estereológico¹³.

Parámetros analizados

Sólo se consideraron los perros que terminaron el protocolo que había sido predeterminado para cada uno de ellos. Durante el estudio fallecieron 8 animales (que fueron sustituidos); dos durante el procedimiento quirúrgico inicial, tres por desarrollar fibrilación ventricular durante el protocolo isquémico, y otros tres por procesos infecciosos de la vía de exteriorización de los cables durante el seguimiento.

Se controlaron diariamente los parámetros electrocardiográficos (cambios ECG, frecuencia cardíaca y presencia de arritmias) y los parámetros de contractilidad miocárdica segmentaria: longitud telediastólica (LTD), longitud telesistólica (LTS) y fracción de acortamiento segmentario (FAc). La presión sistólica del ventrículo izquierdo (PVI), la derivada de la presión respecto al tiempo de la presión del ventrículo izquierdo (dP/dt) y flujo coronario en DA se monitorizaron el día en que se realizó el protocolo isquémico y el día en que se sacrificó al animal.

Los trazados se registraron en un polígrafo de 8 canales (Hewlett-Packard 7588B) con los preamplificadores adecuados; para la estandarización y control visual de las curvas de contractilidad segmentaria se utilizó un sonomicrómetro (Shuessler and Associates Cardif by the Sea C.A.) y un osciloscopio Tektronix 2236 con una banda de frecuencia entre 0 y 100 MHz.

En estudios previos hemos observado que el tejido miocárdico sometido a isquemias presenta una serie de cambios que afectan fundamentalmente a la estructura mitocondrial¹³. El estudio ultraestructural lo basamos en un análisis cuantitativo de las lesiones de mitocondrias interfibrilares, determinando los porcentajes de mitocondrias que se encontraban dañadas (rotura de membranas y crestas mitocondriales, vacuolización y matriz clara a los electrones), fusionadas y emparejadas (dos o más mitocondrias por sarcómero) y, por último, el porcentaje de gránulos de lipofuccina respecto al número de mitocondrias.

Análisis estadístico

El estudio estadístico se realizó utilizando el programa SOLO Statistical System (BMP Statistical Software, Inc.). Los resultados de los parámetros de función (global y regional) se presentan como medias y desviaciones estándar para cada variable y serie; los resultados del estudio morfológico se presentan como porcentajes. Se comprobó la proximidad a la normalidad de las distribuciones mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Dependiendo de las distribuciones, la comparación de las medias se realizó utilizando como prueba no paramétrica el test de Wilcoxon para muestras relacionadas, y como paramétrica la prueba de la t de Student y el análisis de la variancia (ANOVA) para comparaciones múltiples. Se ha utilizado la comparación de porcentajes observados para el análisis de los parámetros morfológicos. Se han considerado las diferencias de las medias y porcentajes como estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$. Se han comparado los distintos parámetros en las diversas fases respecto a su valor basal, así como entre las series.

Tabla 1. Valores hemodinámicos

	FLC (ml/min)		FC (lat/min)		PVI (mmHg)		dP/dt (mmHg/s)	
	Control	Amlodipino	Control	Amlodipino	Control	Amlodipino	Control	Amlodipino
Basal	27,7 ± 3,2 ^b	32,2 ± 2,9	121,7 ± 18,9	125 ± 23,2	143,4 ± 21,6	142,2 ± 23	3.297,7 ± 887,4	3.133 ± 770,2
1 Isqum.	—	—	140,3 ± 14,7 ^{**}	149 ± 23,3	138,8 ± 21,3	132,8 ± 15,3	3.198,3 ± 887,5	2.855,3 ± 389,9
1 Reperf.	38,9 ± 4,3 ^{***}	39,3 ± 2,5 ^{***}	128,7 ± 17,8	136,3 ± 23,4	136,7 ± 15,9	132,8 ± 14,8	3.343,2 ± 937,5	2.971,9 ± 561,9
5 Isqum.	—	—	145,3 ± 31,4 ^{**}	150,5 ± 23,9 [*]	133,6 ± 14,6	132,8 ± 15,3	3.120,9 ± 935,8	3.008 ± 879,3
5 Reperf.	40,5 ± 2,9 ^{***}	38,3 ± 4,2 ^{**}	130 ± 28,5	142 ± 25,1	139,2 ± 19,8	135,2 ± 16,2	3.266,9 ± 875,8	3.133 ± 780,3
10 Isqum.	—	—	141,3 ± 19,2 [*]	150,5 ± 24,9 [*]	135 ± 15,8	133,9 ± 16,9	3.177,8 ± 891,3	3.008,6 ± 879,3
10 Reperf.	39,3 ± 3,1 ^{***}	39,6 ± 3,2 ^{***}	123,6 ± 27,5	133 ± 28,1	138,3 ± 16,7	135,8 ± 15	3.269,3 ± 868,1	3.144,2 ± 774,9
15 Isqum.	—	—	138,3 ± 17,6 ^{**}	149,5 ± 27,2 [*]	134,1 ± 14,5	134,6 ± 15,7	3.192 ± 888,9	3.060,2 ± 792,6
15 Reperf.	38,2 ± 3,7 ^{***}	39 ± 3,9 ^{**}	122 ± 18,6	131 ± 29,6	140,2 ± 19,2	136,9 ± 13,1	3.326,1 ± 864	3.138,6 ± 779,4
20 Isqum.	—	—	142,3 ± 20,6 ^{**}	144,5 ± 23,7 [*]	139,2 ± 13,8	135,1 ± 14,6	3.234,6 ± 896,5	3.060,1 ± 792,6
20 Reperf.	37,4 ± 5,4 ^{***}	39,4 ± 2,8 ^{***}	119,7 ± 17,2	122,5 ± 26,6	142,4 ± 13,4	136,8 ± 13,1	3.311,9 ± 863,3	3.142,8 ± 767,5
Día 3 REC.	—	30 ± 1,6	133 ± 14,6	129,4 ± 19,5	—	133,3 ± 14,4	—	2.500 ± 54,1
Día 5 REC.	28,2 ± 3,6	—	128,6 ± 12,3	120,5 ± 18,7	129,7 ± 20,2	—	3.364,9 ± 929,9	—
Día 10 REC.	25,1 ± 3,6	30 ± 2,5	143 ± 4,5 ^a	129,2 ± 10,2	175 ± 14,9 [*]	149,6 ± 24	3.914,9 ± 395,9	3.791,7 ± 640,6
Día 15 REC.	28,1 ± 3,2	30,2 ± 2,4	130 ± 8	116,5 ± 13,8	146,1 ± 21,4	133,6 ± 10,1	3.637,3 ± 517,5	3.500 ± 500

FLC: flujo arteria coronaria; FC: frecuencia cardíaca; PVI: presión ventrículo izquierdo; dP/dt: derivada de la presión respecto al tiempo de la presección del ventrículo izquierdo; Isquim.: oclusión coronaria; Reperf.: reperfusión coronaria; rec.: recuperación tras el protocolo isquémico. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, significación respecto al basal; ^ap < 0,05; ^bp < 0,01, significación entre las series I y II.

Resultados

Parámetros de función global

En la tabla 1 se exponen los valores para ambas series de los distintos parámetros de función global (flujo coronario, frecuencia cardíaca [FC], presión sistólica del ventrículo izquierdo y dP/dt de PVI) estudiados en situación basal, en las isquemias y reperfusiones 1, 5, 10, 15 y 20, y en los días 3, 5, 10 y 15 posteriores al protocolo isquémico.

El flujo de la DA promedio en situación basal fue superior en un 16,3% (p < 0,01) en la serie II respecto a la I. Durante la aplicación del protocolo isquémico no se evidenciaron diferencias entre ambas series. Tras cada oclusión coronaria se producía el consiguiente hiperaflujo. Tras la última reperfusión (donde aún puede existir hiperaflujo) los valores persistían altos con respecto a los basales (37,4 ± 5,4 frente a 27,7 ± 3,2 ml/min en SI, p < 0,001; 39,4 ± 2,8 frente a 32,2 ± 2,9 ml/min en SII, p < 0,001). Posteriormente se normalizaron y no presentaron variaciones significativas a lo largo del estudio en ninguna de las series (tabla 1).

Ambas series presentaron unos valores promedio de FC similares en situación basal (SI: 121,7 ± 18,9 lat/min, frente a SII: 125 ± 23,2 lat/min); en las isquemias se produjo un aumento estadísticamente significativo respecto a los valores basales en ambas series, volviendo a normalizarse durante las reperfusiones. Tras el protocolo isquémico no existieron diferencias estadísticamente significativas respecto a los valores basales en ambas series, aunque durante el seguimiento posterior al protocolo isquémico la serie I presentó valores superiores a

los de la II (tabla 1). La PVI no tuvo variaciones significativas con respecto a los valores basales en ambas series (143,4 ± 21,6 mmHg en la serie I, 142,2 ± 23 mmHg en la serie II). Durante la realización del protocolo isquémico y el seguimiento, los valores correspondientes a la serie del amlodipino fueron ligeramente inferiores a los de la serie control; de modo aislado el día de la recuperación en la serie I se objetivó un incremento de la PVI de un 21,9% (175 ± 14,9 mmHg; p < 0,01). La dP/dt de PVI presentó valores y variaciones similares en ambas series, sin que existieran diferencias estadísticamente significativas durante el estudio ni en cada una de ellas ni entre ellas (tabla 1).

Parámetros de función regional

Durante la aplicación del protocolo isquémico la longitud telediastólica segmentaria de la serie control no presentó variaciones significativas respecto a la situación basal (13,3 ± 1,6 mm). Durante el período de aturdimiento, sufrió un descenso en sus valores alcanzando la significación estadística exclusivamente el día 9 (10,6 ± 1,4 mm; p < 0,05) (no expuesto en la tabla). En la serie de amlodipino los valores de LTD fueron superiores, desde la situación basal (15,1 ± 4 mm en SII frente a 13,3 ± 1,6 mm en SI; p < 0,01) y durante todo el estudio, a los de la serie control (tabla 2). La LTS en la serie control sufrió incrementos significativos respecto al valor basal (11,1 ± 1,7 mm) durante las oclusiones de la DA (tabla 2), manteniendo valores similares a los basales durante los días de seguimiento. En la serie de amlodipino los valores de LTS fueron siempre superiores a los de la serie control (12,5 ±

Tabla 2. Valores función regional

	LTD (mm)		LTS (mm)		FAc (%)	
	Control	Amlodipino	Control	Amlodipino	Control	Amlodipino
Basal	13,3 ± 1,6 ^b	15,1 ± 4	11,1 ± 1,7 ^a	12,5 ± 1,6	15,9 ± 4	16,7 ± 2,9
1 Isqum.,	12,6 ± 2,1 ^a	15,3 ± 2,4	13,2 ± 2,2***	14,3 ± 2,5**	-5,1 ± 2,6***.c	6,6 ± 3,6***
1 Reperf.,	12,4 ± 1,7 ^b	14,4 ± 2,1	10,7 ± 1,4	12,04 ± 1,7	13,3 ± 5,2	16,2 ± 3,1
5 Isqum.,	12,6 ± 2,3 ^b	15,4 ± 2,4	13,5 ± 2,7***	14,4 ± 2,2**	-6,6 ± 4,3***.c	6,9 ± 3,6***
5 Reperf.,	12,6 ± 1,9 ^b	14,9 ± 2,1	11,1 ± 1,7	12,6 ± 1,9	12,5 ± 4,5*	15,6 ± 4,1
10 Isqum.,	12,7 ± 2,4 ^a	15,5 ± 2,8	13,5 ± 2,8***	14,3 ± 2,3**	-6,3 ± 3,4***.c	8,7 ± 4,5
10 Reperf.,	12,7 ± 1,8 ^a	14,8 ± 2,4	11,2 ± 1,6	12,4 ± 2	11,6 ± 5,4*.a	16,7 ± 4,1
15 Isqum.,	12,6 ± 2,3 ^a	15,5 ± 2,6	13,7 ± 2,8***	14,4 ± 2,3**	-8,1 ± 4,8***.c	8,1 ± 4,3***
15 Reperf.,	12,9 ± 1,9 ^a	15,1 ± 2,6	11,4 ± 1,9	12,2 ± 1,9	11,9 ± 5,3*.a	16,3 ± 3,7
20 Isqum.,	12,8 ± 2,4 ^a	15,5 ± 2,7	13,6 ± 2,9***	14,3 ± 2,4**	-7,3 ± 4 ***.c	7,9 ± 3,6***
20 Reperf.,	12,8 ± 1,9 ^b	15,1 ± 2,6	11,4 ± 1,8 ^a	12,5 ± 2,1	11,8 ± 5,5*.a	16,8 ± 4,4
Tórax cerrado	12,5 ± 1,7	15,2 ± 2,4	11,1 ± 1,7	12,9 ± 2	11,9 ± 5,4	14,9 ± 2*
Día 3 REC.,	12,4 ± 1,9	12,8 ± 1,7	11,1 ± 1,7	11,9 ± 1,6	10,04 ± 4,9**	6,9 ± 1,9***
Día 5 REC.,	12,4 ± 1,9	13,6 ± 1,3	11,7 ± 1,9	12,1 ± 1,1*	5,1 ± 1,9***.a	10,7 ± 3,5***
Día 10 REC.,	11,4 ± 1,4 ^b	13,7 ± 1,2	9,9 ± 1,5*.b	11,9 ± 1,2	12,9 ± 4,2	12,5 ± 3,2*
Día 15 REC.,	13,4 ± 1,9	14,7 ± 2,2	11,2 ± 1,5	12,3 ± 1,6	16,1 ± 1,5	16,7 ± 1,7

LTD: longitud telediastólica; LTS: longitud telesistólica; FAc: fracción de acortamiento miocárdico segmentario; Isqu.: oclusión coronaria; Reperf.: reperfusión coronaria; REC.: recuperación tras el protocolo isquémico. *p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001, significación respecto a basal; ^ap < 0,05; ^bp < 0,01; ^cp < 0,001, significación entre las series I y II.

1,6 mm, basal en SII, frente a 11,1 ± 1,7 mm en SI; p < 0,05). En ambas series la LTS se elevó de forma significativa durante las oclusiones coronarias y en la SI también en el día 5 tras las mismas.

La FAc (tabla 2) en la serie control sufrió un descenso durante las oclusiones hasta alcanzar valores de discinesia, con tendencia a normalizarse durante las reperfusiones. A medida que fue aumentando el número de oclusiones, los valores de la FAc descendieron (fig. 1). Tras el cierre del tórax, la FAc presentó una afectación del 20,6% respecto a los valores basales (11,9 ± 5,4 frente a 15,9 ± 4%); en los días sucesivos se produjo un deterioro progresivo que fue máximo el quinto día tras el protocolo isquémico (5,1 ± 1,9%; p < 0,001), momento a partir del cual empezó a recuperarse el miocardio, alcanzando valores similares a los basales el día 15 (16,1 ± 1,5%) (tabla 2). En la serie de amlodipino se partía de un valor basal superior al de la SI (16,7 ± 2,9%; NS). Durante la aplicación del protocolo isquémico se produjo un descenso de sus valores, pero en ningún caso se alcanzaron valores de discinesia como sucedía en la serie control (fig. 1). Durante las reperfusiones y tras el cierre del tórax, los valores eran similares a los basales. En los días siguientes se produjo un deterioro progresivo que fue máximo el día 3 tras el protocolo isquémico (6,9 ± 1,9%; p < 0,001), dejando de presentar diferencias significativas desde el día 10 de evolución.

Parámetros morfológicos. Ultraestructura

En la serie I, en situación basal había un pequeño porcentaje de mitocondrias dañadas (7%), así

como de fusiones (2%), mitocondrias emparejadas (12,5%) y gránulos de lipofuccina (1%). La serie II en situación basal (amlodipino antes del protocolo isquémico) presentaba un porcentaje superior al de la serie I de mitocondrias dañadas (20,3%; p < 0,01), así como de fusiones mitocondriales (5,6%; p < 0,05) y de mitocondrias emparejadas (15,2%; NS). La cantidad de gránulos de lipofuccina era similar al de la serie I (1%) (fig. 2).

Cuando se observaron las muestras en el día de mayor afectación funcional (día 5 serie I y día 3 serie II tras el protocolo isquémico), el porcentaje de mitocondrias dañadas estaba aumentado por igual y de forma significativa en ambas series respecto a los valores basales (SI: 35,4%, p < 0,001; SII: 38,7%, p < 0,001), sin existir diferencias entre ellas. También se incrementó el porcentaje de fusiones mitocondriales en la serie I con respecto al basal (SI: 6,1%, p < 0,01; SII: 5,4%). La presencia de gránulos de lipofuccina en el miocito aumentó significativamente en ambas series respecto a la situación basal (SI: 2%, p < 0,05; SII: 1,3% p < 0,05). Asimismo, había diferencias significativas entre ambas series respecto al porcentaje de mitocondrias emparejadas (SI, 14,3%), mientras que en la serie II se observaba más de una mitocondria por sarcómero (SII: 36,8%; p < 0,001).

En las muestras de tejido cardíaco estudiadas a los 15 días del protocolo isquémico observamos que en la SI el porcentaje de mitocondrias dañadas (18,1%; p < 0,001) y de gránulos de lipofuccina (2,7%; p < 0,001) se mantenía aumentado respecto a la situación basal; las fusiones mitocondriales

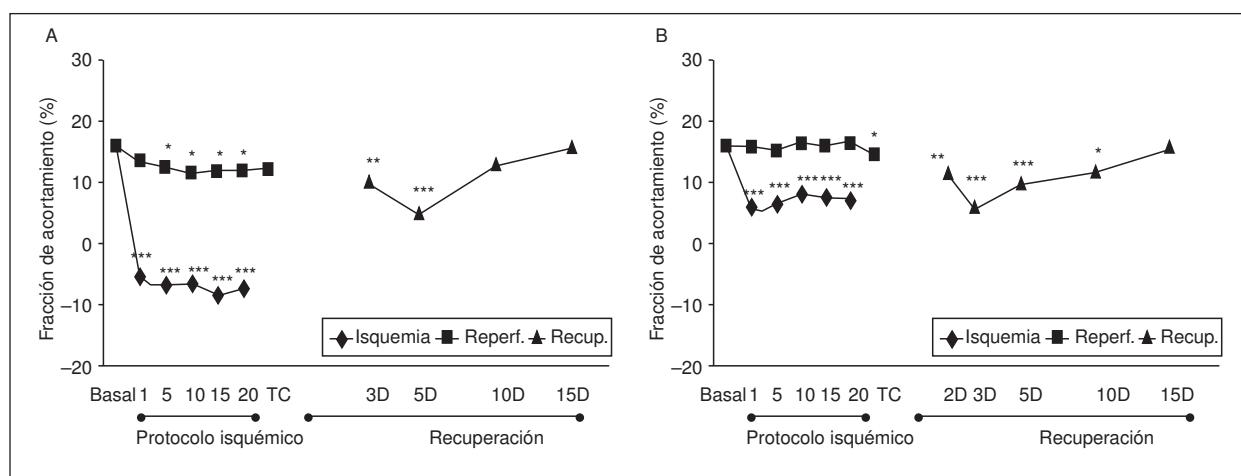


Figura 1. Evolución de la fracción de acortamiento segmentario durante el protocolo isquémico y los días posteriores. La figura A corresponde a la SI (control) y se observa discinesia (valores por debajo de 0) durante las occlusiones coronarias y una mayor afectación en la recuperación el día 5. La figura B corresponde a la SII (amiodipino) y se observa que en las occlusiones coronarias se produce hipocinesia; en los días de recuperación la mayor afectación funcional se produce el tercer día. 1, 5, 10, 15, 20: occlusiones coronarias; TC: cierre de tórax; 2D, 3D, 5D, 10D, 15D: días de recuperación tras el protocolo isquémico; Reperf.: reperfusión coronaria; Recup.: recuperación tras protocolo isquémico. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, significación respecto al valor basal.

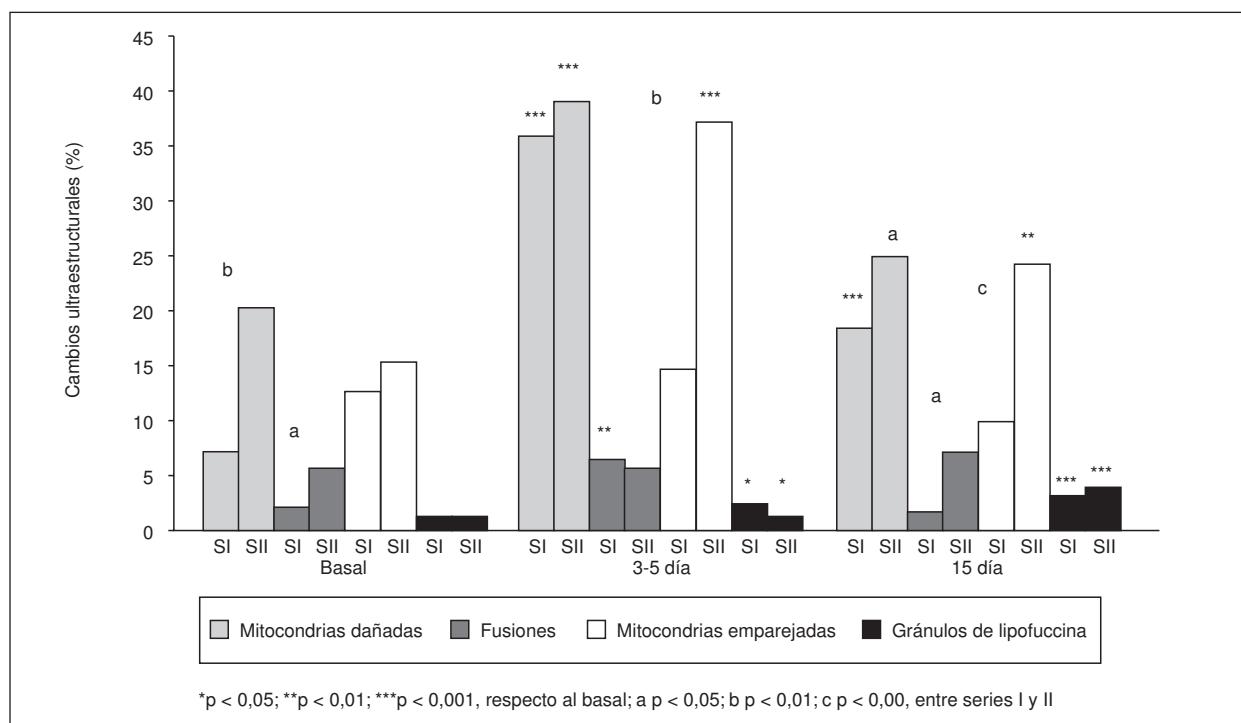


Figura 2. Cambios en las mitocondrias en las SI (control) y SII (amiodipino). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$, significación respecto al valor basal; ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,00$, significación entre las series I y II.

(1,3%) y la presencia de dos o más mitocondrias por sarcómero (9,5%) no presentaron diferencias respecto a la situación basal. La SII mostró diferencias respecto a la situación basal en el porcentaje de mitocondrias emparejadas (23,6%; $p < 0,01$) y de gránulos de lipofuccina (3,1%; $p < 0,001$); el

porcentaje de mitocondrias dañadas (24,4%) y de fusiones (6,6%) fue similar al de la situación basal. Al comparar ambas series vimos que la SII mostraba a los 15 días del protocolo isquémico un porcentaje más elevado de alteración de todos los parámetros estudiados, mitocondrias dañadas (SI: 18,1%,

frente a SII: 24,4%; $p < 0,05$), fusiones (SI: 1,3%, frente a SII: 6,6%; $p < 0,05$) y mitocondrias emparejadas (SI: 9,5%, frente a SII: 23,6%; $p < 0,001$) (fig. 2).

Discusión

El miocardio aturrido es por definición la disfunción contráctil transitoria que se observa tras la isquemia una vez restablecido el flujo sanguíneo coronario normal¹⁴. Sus principales determinantes son la gravedad y duración de la isquemia¹⁵, y sabemos que la repetición de ésta tiene un efecto acumulativo¹⁶⁻¹⁸. Nosotros hemos observado cómo isquemias muy breves (2 min), que aisladamente apenas producirían disfunción postisquémica, cuando son repetidas dan lugar a aturdimiento miocárdico que persiste a las 24 h y hasta los 10 días^{12,13} de cesado el estímulo isquémico. En este trabajo con similar protocolo isquémico y con un período de seguimiento más prolongado, hemos observado cómo la función contráctil todavía permanece deprimida a los 10 días del último episodio isquémico, y se recupera totalmente a los 15 días.

Sabemos que en el miocardio aturrido las reservas energéticas (ATP y CPK) son suficientes, y que el metabolismo oxidativo puede estar incluso aumentado¹⁹, el miocardio mantiene su capacidad contráctil latente y puede responder a agentes inotrópicos²⁰. Pese a los múltiples mecanismos propuestos, los dos más aceptados como causantes de disfunción postisquémica son la formación de radicales libres derivados de oxígeno y las anomalías en la homeostasis del calcio, mecanismos que probablemente representan diferentes partes de la misma secuencia fisiopatológica^{21,22}. Durante la isquemia las concentraciones de calcio citosólico se elevan y es muy probable que el mecanismo de la disfunción postisquémica sea diferente en fases tempranas o tardías de la reperfusión^{23,24}. En una primera fase muy temprana, inmediatamente después de la reperfusión y debido probablemente al daño que ocasionan los radicales de oxígeno en el retículo sarcoplásmico y mitocondrias, se produce una importante sobrecarga de calcio citosólico.

En una segunda fase, tras los primeros minutos de la reperfusión, los valores de calcio citosólico pueden normalizarse, pero el efecto desensibilizador ejercido por el calcio sobre las miofibrillas durante la isquemia, y sobre todo en la primera fase de reperfusión, sería la causa de la disfunción contráctil²⁵.

Según estas hipótesis fisiopatológicas, cualquier medida que disminuya el efecto de los radicales libres de oxígeno y la sobrecarga de calcio citosólico sería eficaz para evitar o mejorar el aturdimiento miocárdico.

Numerosas investigaciones han demostrado los efectos beneficiosos de los barreductores de los radicales libres de oxígeno^{26,27} y antioxidantes²⁸ en la prevención de la disfunción postisquémica, aunque también existen otros estudios que cuestionan su importancia en la etiología del aturdimiento²⁹. Por tanto, es muy probable que, además de los radicales de oxígeno, existan otros factores responsables de la sobrecarga de calcio citosólico.

Los BCC han demostrado ser capaces de disminuir el desarrollo del aturdimiento. Estudios con verapamilo^{4,30}, diltiazem^{5,31} y nifedipina^{6,29,32} han demostrado que estos fármacos, administrados antes de la reperfusión, reducen la sobrecarga de calcio y el aturdimiento miocárdico. El amlodipino, un BCC derivado de la 1,4-dihidropiridina con selectividad vascular, en investigaciones tanto básicas como clínicas, también ha demostrado ser capaz de mejorar la recuperación funcional del miocardio aturrido^{24,33-38}. En nuestro trabajo, con un modelo de isquemia-reperfusión muy breve y repetida, diferente de los encontrados en la bibliografía que se realizan con isquemias y reperfusiones de mayor duración⁹, también hemos observado que el pretratamiento con amlodipino tiene un efecto beneficioso porque preserva la función contráctil miocárdica tanto durante las isquemias (en la serie tratada con amlodipino se produce hipocinesia en las oclusiones coronarias, mientras que en la serie control se produce discinesia) como en el período de aturdimiento que origina en el corazón canino este tipo de isquemia.

El mecanismo por el que los BCC preservan y mejoran la función contráctil tras la isquemia no es bien conocido. Sabemos que disminuyen las demandas miocárdicas de oxígeno por reducción de la poscarga y de la frecuencia cardíaca, y sería lógico pensar que esta reducción del trabajo cardíaco pudiera ser la causa de una menor afectación funcional durante la isquemia y una mejor recuperación durante la reperfusión. Sin embargo, en nuestro caso la dosis administrada de amlodipino no modificó significativamente la frecuencia cardíaca ni la presión arterial; tan sólo en los últimos días del protocolo la frecuencia cardíaca fue menor en el grupo tratado con amlodipino, y no parece probable que estos cambios hemodinámicos tardíos fueran la causa fundamental de la recuperación funcional. Tampoco el incremento en las dimensiones del ventrículo izquierdo que se producen por efecto del amlodipino pueden explicar una disminución en las necesidades metabólicas de oxígeno, aunque puede implicar una mejor relajación. Algunos autores también han demostrado una disminución del aturdimiento con amlodipino, sin modi-

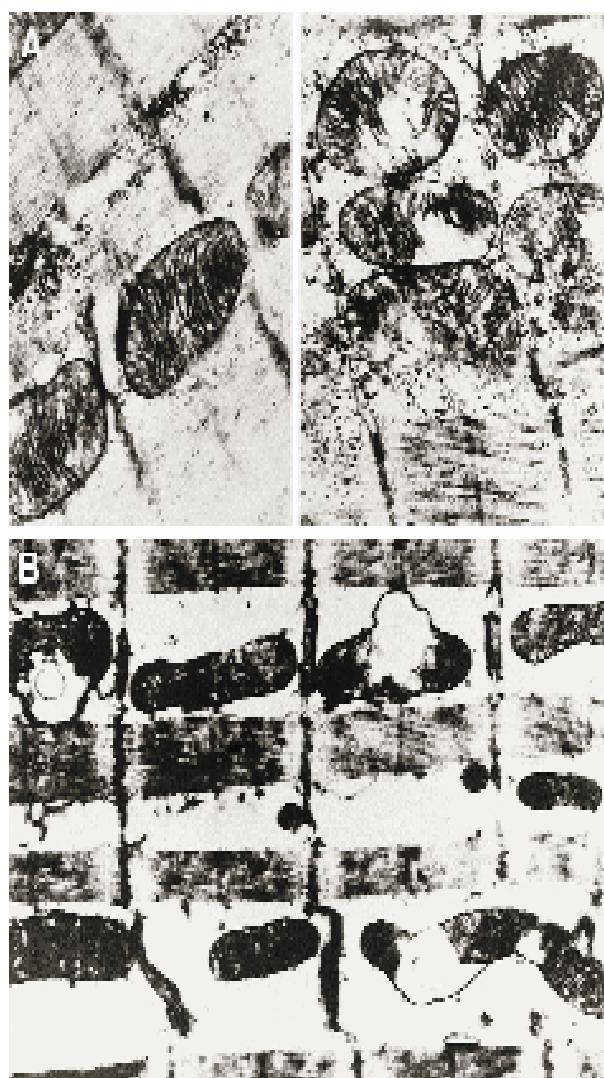


Figura 3. Microfotografías electrónicas de miocitos control (A), tras episodios breves y repetidos de isquemia (B), y previamente tratados con amlodipino (C). Nótese la destrucción mitocondrial que produce la isquemia (B) con aumento del volumen mitocondrial, presencia de procesos de vacuolización intramitocondrial, fusión entre mitocondrias de sarcómeros contiguos, y desestructuración de bandas Z. En C (tratados con amlodipino) se aprecia muestra una mayor presencia de mitocondrias por sarcómero.

ficaciones de los parámetros hemodinámicos sistémicos^{7,9,34}. Otro mecanismo lógico a través del cual el amlodipino disminuiría el aturdimiento postisquémico podría ser el incremento del flujo sanguíneo coronario colateral durante la oclusión, debido a sus efectos vasodilatadores coronarios. Sin embargo, algunas investigaciones han observado mejoría de la función miocárdica sin variaciones del flujo sanguíneo regional⁷.

Algunos autores han indicado que el mecanismo más probable por el que los BCC ejercen un efecto

beneficioso en la isquemia-reperfusión es la capacidad que poseen para evitar la sobrecarga de calcio citóslico. Nayler³⁹ observó que el pretratamiento con amlodipino atenua la sobrecarga de calcio citóslico que se produce tras episodios de isquemia de 10, 30 y 60 min, seguidos de reperfusión. También la administración tardía de BCC, después de la reperfusión, puede mejorar de forma significativa la disfunción postisquémica, sin conocer todavía el porqué de este efecto, cuando el daño de la isquemia-reperfusión ya se ha producido⁵. Es factible, pues, que existan alteraciones en la distribución del calcio dentro de los depósitos intracelulares (“sobrecarga localizada de calcio”), sin aumento del contenido cárlico total, y que los BCC actúen modulando favorablemente su homeostasis⁴⁰.

La presencia de alteraciones ultraestructurales en el miocardio aturrido es variable dependiendo de los modelos experimentales utilizados. En nuestro modelo las alteraciones ultraestructurales se concretan en modificaciones en las mitocondrias, incrementándose el porcentaje de mitocondrias dañadas en el miocito (rotura de membranas, aclaración de su matriz por pérdida de crestas y aparición de vacuolas) y, finalmente, por la presencia de gránulos de lipofuccina como producto final de la degradación mitocondrial inducida por la isquemia (fig. 3). Paralelamente se aprecian incrementos en el volumen de las mitocondrias¹³ y fusiones entre mitocondrias de sarcómeros contiguos tras rotura de la banda Z que las separa.

Finalmente, el número de “emparejamientos” mitocondriales (2 o más mitocondrias de menor tamaño en lugar de una por sarcómero, situación normal) se incrementa, lo que posiblemente indica un aumento de la división mitocondrial en respuesta a la isquemia. Aunque algunos investigadores han encontrado alteraciones mitocondriales similares a las descritas por nosotros, Nicklas et al¹⁷ no encuentran diferencias estructurales entre las mitocondrias de áreas isquémicas y control después de oclusiones repetidas de 5 min. La causa de estas discrepancias podría estar relacionada con la duración de los períodos de reperfusión⁴¹. En nuestro modelo, el grado de disfunción postisquémica guarda una relación directa con el grado de degeneración mitocondrial. Esta relación apunta a que el sustrato celular de la disfunción postisquémica es el daño mitocondrial. El pretratamiento con amlodipino incrementa el porcentaje de mitocondrias dañadas y fusionadas en situación basal. Tras los episodios de isquemia-reperfusión, se igualan los porcentajes de mitocondrias dañadas y fusionadas

das entre los perros tratados y los no tratados, y paralelamente se incrementa hasta más del doble el porcentaje de mitocondrias emparejadas en los primeros.

La interpretación de estas modificaciones ultraestructurales puede ser muy compleja. Parece que el amlodipino acelera el recambio mitocondrial, incrementando el grado de daño mitocondrial basal y acelerando su regeneración. En la serie pretratada con amlodipino (situación basal) coincide el incremento en el daño y en el número de fusiones mitocondriales con una mayor longitud del segmento miocárdico estudiado, tanto en la LTS como en la LTD, sin que ello traduzca ningún cambio significativo en los índices de contractilidad (dP/dt , fracción de acortamiento) y, por el contrario, coincide con una mejor tolerancia a los episodios de isquemia-reperfusión.

En la serie de amlodipino el mayor aturdimiento miocárdico se produce más tempranamente (tercer día) que en la serie control (quinto día), el máximo grado de aturdimiento alcanzado es menor que en la serie control ($FAC: 5,1 \pm 1,5\%$ frente a $6,9 \pm 1,9\%$) y la recuperación también es más temprana. Ultrastructuralmente, a lo largo de todo el seguimiento la serie de amlodipino siempre presenta más del doble de mitocondrias “emparejadas” que la serie control para similar o mayor número de mitocondrias dañadas.

La explicación de estos hechos difícilmente puede ser unitaria, ya que, mientras que la mejor recuperación del aturdimiento miocárdico estaría en relación con el mayor porcentaje de mitocondrias emparejadas, la mayor tolerancia a los procesos de isquemia-reperfusión tendría que depender de una mayor proporción de mitocondrias dañadas en la situación basal. Otra posible explicación sería considerar que la mayor proporción de daño mitocondrial presente en las muestras de la serie de amlodipino fuera una consecuencia de un incremento en la función y de un acelerado recambio mitocondrial.

Conclusión y comentario

Nuestros datos apuntan a que el amlodipino, un derivado dihidropiridínico de segunda generación, es efectivo para preservar parcialmente la función contráctil del miocardio sometido a isquemias breves y repetidas seguidas de cortos períodos de reperfusión, así como para acelerar, también parcialmente, la recuperación funcional y estructural del miocardio una vez cesados los procesos isquémicos.

Estos hallazgos experimentales podrían tener implicaciones clínicas. Los episodios repetidos de

isquemia, aunque sean de duración muy breve, pueden producir aturdimiento miocárdico, y en la clínica este tipo de isquemia en ocasiones podría ser equiparable a episodios de isquemia silente, lo que explicaría “brotes” de fracaso ventricular izquierdo en la cardiopatía isquémica de causa no evidente. Nuestros resultados apoyarían la opinión de aquellos autores que están a favor de tratar por igual la cardiopatía isquémica sintomática o asintomática, intentando reducir la carga de isquemia total⁴⁰⁻⁴⁷. El amlodipino podría actuar reduciendo la disfunción contráctil que ocasiona este tipo de isquemia. Esto podría mejorar el peor pronóstico que, en general, tienen estos pacientes y explicar en parte la reducción de crisis de descompensación cardíaca paralelamente a la de episodios de angina inestable que se ha visto con amlodipino en el estudio PREVENT⁴⁸.

Agradecimiento

Al personal no facultativo de la Unidad de Investigación Cardiocirculatoria del Centro de Investigación del Hospital La Fe.

Este trabajo se ha realizado con una Ayuda del Fondo de Investigaciones Sanitarias Expediente: 93/0407.

Bibliografía

1. Marban E. Pathogenetic role for calcium in stunning. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 891-895.
2. Hearse DJ. Stunning: a radical review. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 853-876.
3. Bolli R. Myocardial “stunning” 20 years later: a summary of current concepts regarding its pathophysiology, pathogenesis, and clinical significance. En: Ferrari R, Hearse DJ, editores. *Dialogues in cardiovascular medicine. Myocardial stunning*. Courbevoie (Francia): Artem, 1996; 1: 5-26.
4. Przyklenk K, Kloner RA. Effect of verapamil on postischaemic “stunned” myocardium: importance of timing in treatment. *J Am Coll Cardiol* 1988; 11: 614-623.
5. Watts JA, Norris TA, London RE, Steenbergen C, Murphy E. Effects of diltiazem on lactate, ATP, and cytosolic-free calcium levels in ischaemic hearts. *J Cardiovasc Pharmacol* 1990; 15: 44-49.
6. Przyklenk K, Kloner RA. Calcium antagonist and the stunned myocardium. *J Cardiovasc Pharmacol* 1991; 18: S93-S101.
7. Przyklenk K, Kloner RA. Nifedipine administered postreperfusion ablates the phenomenon of the “stunned” myocardium. *Am J Cardiol* 1987; 60: 934-936.
8. Reifart N, Marston W, Zierler MK, Taylor AD, Kaltenbach M, Khuri SF. Effects of bepridil on regional myocardial ischaemia and comparison with verapamil. *Am J Cardiol* 1986; 58: 541-546.
9. Gross GI, Pieper GM. Beneficial actions of amlodipine in the multiple-stunned canine myocardium. *Cardiovasc Drugs Ther* 1992; 6: 67-75.
10. Packer M, O'Connor CM, Ghali JK, Pressler ML, Carson PE, Belkin RN et al, for the Prospective Randomized Amlodipine Survival Evaluation Study Groupe. Effect of amlodipine on morbidity and mortality in severe chronic heart failure. *N Engl J Med* 1996; 335: 1107-1114.
11. Pomar F, Cosín J, Hernández A, Portolés M, Pallarés V, Andrés F. Efectos de la nitroglicerina y nifedipina sobre el miocardio aturdi-do por isquemias breves y repetidas. *Rev Esp Cardiol* 1996; 49: 360-371.

12. Pallarés V, Hernández A, Cosín J, Portolés M, Capdevila C, Pomar F et al. Evolución a lo largo de 10 días de un modelo de miocardio aturdido mediante isquemias muy breves y repetidas. *Rev Esp Cardiol* 1997; 50: 254-259.
13. Pomar F, Cosín J, Portolés M, Faura M, Renau-Piquer J, Hernández A et al. Functional and ultrastructural alterations of canine myocardium subjected to very brief coronary occlusions. *Eur Heart J* 1995; 16: 1482-1490.
14. Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged ischemic ventricular dysfunction. *Circulation* 1982; 66: 1146-1149.
15. Preuss KG, Gross GJ, Brooks HL, Waltier DC. Time course of recovery of "stunned" myocardium following variable periods of ischemia in conscious anesthetized dogs. *Am Heart J* 1987; 114: 696-703.
16. Geft IL, Fishbein MC, Ninomiya K, Hashide J, Chauxe J, Yano J et al. Intermittent brief periods of ischemia have accumulative effect and may cause myocardial necrosis. *Circulation* 1982; 66: 1150-1153.
17. Nicklas JM, Becker LC, Bulkley BH. Effects of repeated brief coronary occlusion on regional left ventricular function and dimension in dogs. *Am J Cardiol* 1985; 56: 473-478.
18. Homans DL, Laxon DD, Sublett E, Lindstrom P, Bache RJ. Cumulative deterioration of myocardial function after repeated episodes of exercise-induced ischaemia. *Am J Physiol* 1989; 256: 1462.
19. Lerch R. Oxidative metabolism in reperfused myocardium. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 953.
20. Ellis SE, Wynne J, Braunwald E, Henschke CI, Sandor T, Kloner RA. Response of reperfused-savaged, stunned myocardium to inotropic stimulation. *Am Heart J* 1984; 107: 9-13.
21. Bolli R. Mechanism of myocardial stunning. *Circulation* 1990; 82: 723-738.
22. Opie LH. Myocardial stunning we do not know the mechanism nor is there "overwhelming evidence" for a major role of the free radicals. *Basic Res Cardiol* 1998; 93: 152-155.
23. Opie HL, Du Toit EF. Postischaemic stunning: the two-phase model for the role of calcium as pathogen. *J Cardiovasc Pharmacol* 1992; 20: S1-S4.
24. Becker BF, Moberg J. Low-dose calcium antagonists reduce energy demand and cellular damage of isolated hearts during ischaemia and reperfusion. *Arch Pharmacol* 1999; 60: 287-294.
25. Kusuoka H, Koretsune Y, Chacko VP, Weisfeldt ML, Marban E. Excitation-contraction coupling in postischaemic myocardium. Does failure of activator Ca^{2+} transients underlie stunning? *Circ Res* 1990; 66: 1268-1276.
26. Jeroudi MO, Triana FJ, Patel BS, Bolli R. Effect of superoxido dismutase and catalase, given separately, on myocardial "stunning". *Am J Physiol* 1990; 259: 889-901.
27. Gross GJ, Farber NE, Hardman HF, Warltier DC. Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium of dogs. *Am J Physiol* 1986; 250: 372-377.
28. Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B, Lai EK et al. Marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion. Evidence that myocardial "stunning" is a manifestation of reperfusion injury. *Circ Res* 1989; 65: 607-622.
29. Schaper W. Molecular mechanism in "stunned" myocardium. *Cardiovasc Drugs Ther* 1991; 5: 925-932.
30. Mrak RE, Carry MM, Murphy ML, Peng CF, Straub KD. Reperfusion injury in ischemic myocardium: effects of nifedipine and verapamil. *Am J Cardiovasc Pathol* 1989; 3: 61-68.
31. Taylor AL, Golino P, Eckels R, Pastor P, Buja LM, Willerson JT. Differential enhancement of postischaemic segmental systolic thickening by diltiazem. *J Am Coll Cardiol* 1990; 15: 737-747.
32. Applegate RJ, Walsh RA, O'Rourke RA. Effects of nifedipine on diastolic function during brief periods of flow-limiting ischemia in the conscious dog. *Circulation* 1990; 76: 1409-1421.
33. Hoff PT, Tamura Y, Luchesi BR. Cardioprotective effects of amlodipine in the ischaemic-reperfused heart. *Am J Cardiol* 1989; 64: 1011-1016.
34. Gross GJ, Farber NE, Pieper GM. Effect of amlodipine on myocardial functional and metabolic recovery following coronary occlusion and reperfusion in dogs. *Cardiovasc Drugs Ther* 1989; 3: 535-543.
35. Dunlap ED, Matlib MA, Millard RW. Protection of regional mechanism and mitochondrial oxidative phosphorylation by amlodipine in transiently ischaemic myocardium. *Am J Cardiol* 1989; 64: 841-851.
36. Rinaldi CA, Linka AZ, Masani ND, Avery PG, Jones E, Saunders H et al. Randomized, double-blind crossover study to investigate the effects of amlodipine and isosorbide mononitrate on the time course and severity of exercise-induced myocardial stunning. *Circulation* 1998; 98: 749-756.
37. Zhang X, Hintze TH. Amlodipine releases nitric oxide from canine coronary microvessels: an unexpected mechanism of action of a calcium channel-blocking agent. *Circulation* 1998; 97: 576-580.
38. Mason RP, Walter MF, Trumbore MW, Olmstead EG Jr, Mason PE. Membrane antioxidant effects of the charged dihydropyridine calcium antagonist amlodipine. *J Mol Cell Cardiol* 1999; 31: 275-281.
39. Nayler WG. Amlodipine pretreatment and the ischaemic heart. *Am J Cardiol* 1989; 64: 651-670.
40. Przyklenk K, Kloner RA. Calcium antagonist and stunned myocardium: importance for clinicians? En: Opie LH, editor. *Stunning, hibernation and calcium in myocardial ischaemia and reperfusion*. Massachusetts: Kluwer Academic Publishers, 1992; 180-189.
41. Wyns JC, Kenny D, Brooks HL, Warltier DC. Regional myocardial function after repetitive brief episodes of ischaemia: effect of altering the duration of the reperfusion period. *Am Heart J* 1991; 121: 1331-1338.
42. Cohn PF. Total ischaemic burden: definition, mechanism and therapeutic implications. *Am J Med* 1986; 81 (Supl A): 2-6.
43. Pepine CJ, Hill JA. Medical therapy for silent myocardial ischaemia. *Circulation* 1987; 75: 43-44.
44. Kinnard DR, Harris M, Hassack KF. Endurance testing for evaluation of anti-anginal therapy with amlodipine, a calcium channel blocking agent. *JACC* 1988; 12: 791-796.
45. Deanfield JE, Detry J-MRG, Lichtlen PR, Magnani B, Sellier P, Thaulow E, for the CAPE investigators. Amlodipine reduces transient myocardial ischaemia in patients with coronary artery disease: double-blind, circadian anti-ischaemia program in Europe (CAPE) trial. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1460-1467.
46. Pehrsson SK, Tolagen K, Ulvenstam G. Efficacy and safety of amlodipine compared with diltiazem in patients with stable angina pectoris. *Clin Drug Invest* 1996; 11: 313-319.
47. Bech J, Madsen JK, Kelbaek H. Amlodipine reduces myocardial ischaemia during exercise without compromising left ventricular function in patients with silent ischaemia: a randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Eur J Heart Fail* 1999; 1: 395-400.
48. Pitt B, Byington RP, Furberg CD, Huntingake DB, Mancini J, Miller ME et al, for the PREVENT investigators. Effect of amlodipine on the progression of atherosclerosis and the occurrence of clinical events. *Circulation* 2000; 102: 1503-1510.