

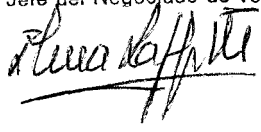
R 22913

T.D.  
F/30

UNIVERSIDAD DE SEVILLA  
SECRETARIA GENERAL

Se certifica que se registra esta Tesis Doctoral  
al tomo 74 número 81 del libro  
correspondiente.

Sevilla, 3 JUN. 1994  
El Jefe del Negociado de Tesis,



**EFFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL ANTIPORTADOR SODIO/HIDROGENIÓN  
SOBRE EL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE E HIDRO-ELECTROLÍTICO  
DURANTE EL EJERCICIO FÍSICO**



**Miguel Ángel Fernández Gómez**

**Tesis presentada para optar al grado de Doctor en Medicina  
por la Universidad de Sevilla**

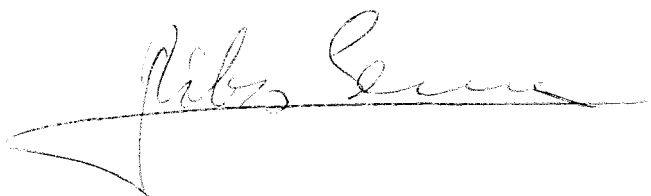
**Sevilla, 1994**

Don Juan Ribas Serna, Profesor Titular de Fisiología de la Universidad de Sevilla, adscrito al Departamento de Fisiología: Fisiología Médica y Biofísica de la Facultad de Medicina

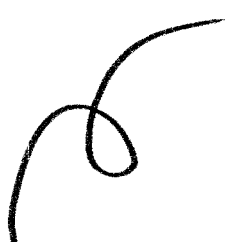
CERTIFICA

Que Don Miguel Angel Fernández Gómez, Licenciado en Medicina y Cirugía, ha realizado bajo su dirección el trabajo titulado: "EFECTOS DE LA INHIBICIÓN DEL ANTIPORTADOR SODIO/HIDROGENIÓN SOBRE EL EQUILIBRIO ÁCIDO-BASE E HIDRO-ELECTROLÍTICO DURANTE EL EJERCICIO FÍSICO", y que este trabajo reúne las características para que, una vez defendido ante el Tribunal correspondiente, se presente para optar al grado de Doctor en Medicina por la Universidad de Sevilla.

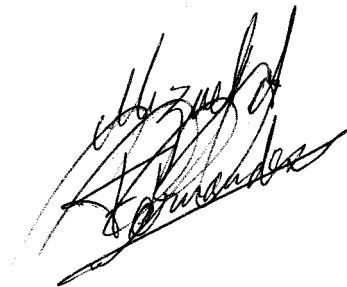
Sevilla, a 31 de mayo de 1994.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Ribas Serna', with a long horizontal stroke extending to the left.

Juan Ribas Serna

A handwritten mark or signature consisting of a few loops and a long tail, located in the bottom left corner of the page.

*A mis padres, a Sandra y a mis hermanos,  
muy especialmente a Raquel y Adrián.*

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Luis de la Torre'.

## **AGRADECIMIENTOS**

A toda aquella persona que de alguna forma haya contribuido a la realización de este trabajo: a las personas que se prestaron a los diferentes experimentos, al director de la tesis, a la DGICYT del MEC por la concesión de la beca FPI, a mis compañeros en el Departamento de Fisiología, etc. Así mismo, quiero agradecer la inestimable colaboración del Prof. Bengt Saltin y de su equipo, del III Departamento de Fisiología del Instituto Karolinska de Estocolmo, en la realización de algunos de los experimentos.



<b>Resultados</b>	22
1.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en situación de reposo: estudio con distintas dosis del inhibidor.	22
2.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ durante el ejercicio y la recuperación:	34
2.1.- Pruebas máximas progresivas en cicloergómetro.	34
2.2.- Pruebas a potencia constante en cicloergómetro.	44
2.3.- Pruebas en el ergómetro de Andersen:	49
2.3.1.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en el territorio muscular activo:	49
2.3.1.1.- Tiempo de duración de las pruebas.	49
2.3.1.2.- Modificaciones del equilibrio ácido-base.	50
2.3.1.2.1.- Lactato sanguíneo y liberación del mismo desde los músculos.	50
2.3.1.2.2.- pH y gases en sangre.	54
2.3.1.2.2.- Análisis del equilibrio ácido-base por la ecuación de Stewart.	59
2.3.1.3.- Balance hidro-electrolítico.	61
2.3.1.4.- Cambios en la concentración plasmática de potasio.	64
2.3.1.5.- Flujo sanguíneo y consumo de oxígeno.	66
2.3.1.6.- Presión parcial de oxígeno y saturación parcial de la hemoglobina por el oxígeno.	67
2.3.1.7.- Balance hidro-electrolítico en el compartimento muscular activo.	72
2.3.2.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en el territorio muscular inactivo:	79
2.3.2.1.- Modificaciones del equilibrio ácido-base.	79
2.3.2.2.- Balance hidroelectrolítico.	82
2.3.2.3.- Presión parcial de oxígeno y saturación parcial de la hemoglobina por el oxígeno.	84
<b>Discusión</b>	85
1.- Consideraciones sobre el proceder experimental:	85
1.1.- Determinación de la dosis de amiloride.	85
1.2.- Elección del protocolo ergométrico.	89

2.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en situación de reposo.	90
3.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ durante el ejercicio físico.	95
<b>Conclusiones.</b>	116
<b>Referencias.</b>	119

## INTRODUCCIÓN

El ser humano debe adaptarse a una gama muy diversa de situaciones ambientales. Cada situación exige una reacción del sujeto ante el medio externo, lo que conlleva en cada caso, a estrategias específicas a nivel interno, para asegurar no sólo que la respuesta del sujeto ante los estímulos externos sea adecuada, sino que además ésta no suponga una alteración importante del equilibrio en el medio interno u homeostasis. Al realizar ejercicios de alta intensidad se está sometiendo a los distintos sistemas fisiológicos del cuerpo humano (cardiovascular, respiratorio, etc.) a una situación de alta exigencia, cuyo objetivo final será generar una respuesta adecuada a la situación ambiental, lo cual requiere que la puesta en funcionamiento de los distintos sistemas fisiológicos esté perfectamente coordinada y controlada (Turner, 1991).

Dentro de la respuesta fisiológica al esfuerzo, los sistemas que participan en el aporte metabólico y el intercambio gaseoso van a ser activados de forma importante para satisfacer la demanda de las células funcionantes, dichas células pueden mantener su función a lo largo del tiempo siempre que los mecanismos reguladores del medio interno compensen adecuadamente los desequilibrios propios de tal situación. Caso contrario, se facilitaría la aparición de la "fatiga", considerada ésta como el aviso de una situación de "catástrofe" del organismo humano como realizador de trabajo físico. Para una descripción más detallada del concepto actual de fatiga y sus posibles causas ver Maclaren y col. (1989) o más recientemente Fitts (1994). La aparición de la fatiga y sus posibles causas, es y ha sido un tema de discusión permanente y por tanto ampliamente



revisado (Gibson y Edwards, 1985; Sahlin, 1986; Vøllestad y Sejersted, 1988; Hainaut y Duchateau, 1989; Kirkendall, 1990; Westerblad y col., 1991).

La realización de ejercicio físico de alta intensidad supone un importante reto para los diversos mecanismos que tratan de mantener el balance ácido-base e hidroelectrolítico a nivel orgánico. El que éste se mantenga dentro de unos límites aceptables y se evite o se retrase la aparición de la fatiga es el resultado de la interacción dinámica de dichos mecanismos, lo que requiere la participación integrada de diversos sistemas (respiratorio, cardiovascular, nervioso, digestivo), órganos (riñón), tejidos (muscular, óseo) y células (hematíes, células tubulares renales, fibras musculares). En todo caso, el organismo humano posee mecanismos complejos que por su versatilidad permiten la adaptación del mismo a las diversas situaciones de sobrecarga (ácida o alcalina, hidroelectrolítica, etc.), manteniéndose y controlándose de forma precisa la homeostasis del medio interno.

**A nivel celular**, se han descrito tres mecanismos fisiológicos básicos de regulación ácido-base (Boron, 1989 a y b):

1) Físico-químicos: son ácidos y bases débiles con su correspondiente par de base o ácido conjugado. Estos pueden ser considerados transferibles o no, según puedan atravesar la membrana celular o el compartimento orgánico en cuestión. Así, el tampón proteína-proteinato es intransferible, éste en realidad se trata del conjunto de grupos ionizables de las proteínas (p.ej: radicales carboxilo, grupos imidazol-histidina, grupos amino-terminales, etc.), que forman un sistema buffer cerrado, siendo una de sus características la de tener baja potencia tamponadora ( $\beta_c$ ), cuando se comparan con los sistemas bufferes abiertos. La  $\beta_c$  en el sistema cerrado depende de la cantidad total de buffer disponible ([TBuff]), tal como se puede deducir de la ecuación  $\beta_c \approx 0.58 [\text{TBuff}]$ . Por ejemplo, si se tratase de un ácido débil neutro (AH) y su base conjugada ( $A^-$ ) que se ajustara al equilibrio  $\text{AH} \leftrightarrow \text{A}^- + \text{H}^+$ , la mencionada [Tbuff] sería igual a  $\text{AH} + \text{A}^-$  y conservaría un valor constante en el sistema buffer cerrado. Además, los bufferes cerrados presentan el pico de máxima potencia en la zona de pH cercana al pK. Por contra, un ácido o base débil difusible permite que el sistema tamponador se comporte como un sistema abierto, de entre ellos el tampón carbónico-bicarbonato de indudable importancia en el líquido extracelular, juega también un importante papel a nivel intracelular, porque su potencia tamponadora ( $\beta_a$ ), tal como expresa en la siguiente ecuación:  $\beta_a \approx 2.3 [A^-]$ , depende de la cantidad de base conjugada disponible ( $A^-$ : en este caso  $\text{HCO}_3^-$ , que es un anión intercambiable y puede ser repuesto o retirado según las necesidades); no obstante, asumiendo las concentraciones habituales para los componentes de los bufferes cerrados y abiertos, a los niveles normales de pH intracelular ( $\text{pH}_i$ ) en reposo, la  $\beta_a$  para el carbónico-bicarbonato es superior a la del resto de bufferes celulares. Es importante indicar que la relación entre la potencia de los sistemas bufferes celulares abiertos y los sistemas cerrados ( $\beta_a/\beta_c$ ) se incrementa a alto

pH<sub>i</sub>, pero decrece a bajo pH<sub>i</sub> (Boron, 1989 a y b), con lo que durante el ejercicio (pH<sub>i</sub> bajo) aumentaría la importancia relativa de los sistemas bufferes no-bicarbonato intracelulares.

2) Bioquímicos: se consideran como tales a las reacciones bioquímicas que retiran cargas ácidas o básicas del medio. Durante el ejercicio físico se deben tener en cuenta las reacciones metabólicas ligadas al lactato y piruvato tanto en el interior de la fibra muscular como fuera de ella (se detallará en la pagina 4). A nivel intracelular es interesante recordar el importante papel jugado por el lactato y el piruvato en las vías metabólicas y que el paso piruvato  $\leftrightarrow$  lactato depende de la disponibilidad de ambos metabolitos y de la actividad del enzima lactato deshidrogenasa, sin olvidar que las posibles desviaciones en ésta reacción están perfectamente acoplados a los cambios en el *estado redox* y en el pH intracelular (Emmett y Seldin, 1989 b).

3) Transporte e intercambio iónico transmembrana: está mediado por una serie de proteínas de membrana que retiran o aportan cargas ácidas o básicas de la célula. Existe una enorme variedad de proteínas de membrana que realizan dichas funciones y que ayudan a controlar de forma precisa el pH<sub>i</sub> en diversos tipos celulares. De entre ellas, destaca por su posible importancia fisiológica durante la realización de ejercicio físico de alta intensidad, el antiportador Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>, que es uno de los mecanismos que retira H<sup>+</sup> del medio intracelular realizando un intercambio activo, secundario al gradiente de Na<sup>+</sup>, establecido originalmente por la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATP<sub>asa</sub>. Otros mecanismos que pueden retirar H<sup>+</sup> del medio intracelular son la bomba de H<sup>+</sup> o el intercambio activo K<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (como ejemplos de transporte activo primario: dependiente de ATP); y las proteínas transportadoras de ácidos monocarboxílicos situado en la membrana basolateral de las células tubulares renales (como ejemplo de transporte terciario). Cada uno de éstos mecanismos puede presentar a su vez diversos subtipos que adquieren mayor o menor importancia según la situación a corregir y el tipo celular, tejido u órgano en estudio (Moody, 1984; Aickin, 1986; Boron, 1986; Boron, 1989 a y b; Tonnensen y col., 1990).

Por tanto, si la célula es un sistema que integra diversos mecanismos de regulación del medio interno, el organismo humano puede ser considerado como un sistema de sistemas perfectamente interconectados y regulados. En la integración de los distintos mecanismos de regulación ácido-base e hidro-electrolítica de los diversos tejidos y células del organismo, juega un papel fundamental el **líquido plasmático-extracelular** y dentro de éste el par tamponador de mayor importancia es el carbónico-bicarbonato (Boron, 1989 a; Emmett y Seldin, 1989 a), el cual además de ser un sistema abierto está doblemente regulado, gracias al control de la pCO<sub>2</sub> por parte del sistema respiratorio (Morris y Crapo, 1989) y del HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> por parte del riñón (Sabatini y Kurtzman, 1989). Dicho par tamponador ha sido ampliamente estudiado, se sabe que juega un papel primordial en el control del intercambio de gases a nivel orgánico.

Resulta interesante que una de las piezas claves y que actualmente se considera punto limitante de la capacidad de reciclamiento de  $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$  (ciclo de Jacobs-Stewart) durante el ejercicio físico, sea la velocidad del intercambio de  $\text{Cl}^-$  por  $\text{HCO}_3^-$  llevada a cabo por el **intercambiador de aniones tipo banda-3** (Alper, 1991), localizado en la membrana plasmática del eritrocito (Klocke, 1988; Alberts, 1989). Siendo, por tanto pieza fundamental en el balance ácido-base e hidro-electrolítico en diversos compartimentos: pulmonar (Bidani y Crandall, 1988), renal (DuBose y Bidani, 1988), muscular y hepático (Gros y Dodgson, 1988).

Dentro de este complejo sistema de sistemas de regulación ácido-base e hidro-electrolítico interrelacionados entre sí presentes en el organismo humano, no se debe olvidar que además del par carbónico-bicarbonato, de extraordinaria importancia, existen otros mecanismos que se pueden activar y jugar un papel fisiológico importante. Resulta conveniente reseñar que, durante la realización de ejercicio físico de alta intensidad, existen una serie de compuestos metabólicos intermedios, entre los que destacan el lactato y el piruvato, que juegan un papel clave en la respuesta metabólica orgánica. De nuevo es curioso observar, que en el control de la cinética de intercambio de estos compuestos entre los distintos compartimentos orgánicos, juega un papel fundamental, además del gradiente de pH entre los compartimentos, la proteína de membrana que realiza el **cotransporte  $\text{Lact}^-/\text{H}^+$**  (Brooks, 1991; Roth, 1991), que ha sido descrita tanto en células musculares (Roth y Brooks, 1990; Juel, 1991 a y b) como en eritrocitos (Poole y Halestrap, 1993) y hepatocitos (Quintana y col., 1988).

En nuestros experimentos, dentro de la respuesta orgánica al ejercicio físico, se ha hecho hincapié en el estudio de los efectos de la inhibición del **antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$** , en concreto se estudiaron las posibles repercusiones de dicha inhibición sobre los procesos de regulación ácido-base e hidro-electrolítico durante el ejercicio físico. Como se citó anteriormente, el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (ver figura 3), es uno de los diversos mecanismos de intercambio iónico que parecen activarse de forma gradual a nivel celular, según el rango de  $\text{pH}_i$  y el tipo de célula en consideración. Este antiportador, al igual que los dos mecanismos de intercambio iónico transmembrana reseñados previamente, parece poseer el don de la ubicuidad (Aronson, 1985; Grinstein y Rothstein, 1986; Hoffmann y Simonsen, 1989; Clark y Limbird, 1991), existiendo evidencias de su presencia en las membranas de los principales tipos de células implicadas en el ejercicio físico (fibras musculares: Aickin y Thomas, 1977; eritrocitos: Escobales y Canessa, 1986; células tubulares renales: Garty y Benos, 1988; etc.). Por lo que resulta sorprendente que no haya recibido atención en estudios *in vivo*.

El antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se encuentra en casi todas las células en que ha sido buscado de forma experimental, participando en aquellas funciones celulares relacionadas con la entrada de  $\text{Na}^+$  y la salida de  $\text{H}^+$  de la célula (Aronson, 1985), jugando un papel importante en mecanismos fisiológicos de muy diversa índole: control

del volumen celular, control del pH citoplásmico, control del crecimiento y proliferación celular, respuesta metabólica a hormonas como la insulina o los glucocorticoides, transporte transepitelial de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$ , etc.; siendo en la actualidad relacionado con diversos procesos fisiopatológicos (Mahnensmith y Aronson, 1985; Hoffmann y Simonsen, 1989). Es un intercambiador iónico que aprovecha el gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  para extraer  $\text{H}^+$ , aunque también puede intercambiar  $\text{NH}_4^+$  y  $\text{Li}^+$  (o diversas combinaciones entre ellos), su estequiometría es 1:1, es inhibido por el clorhidrato de amiloride de forma competitiva (y por sus derivados), pero la propiedad más importante del antiportador es la de poder ser activado de forma alostérica por los protones intracelulares, siendo esto lo que determina su elevada importancia como regulador del pH citoplásmico. Los grupos imidazol-histidina ( $\text{pK} = 6.5$ ) en la cara interna del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  parecen ser el lugar de acción de los  $\text{H}^+$  intracelulares para la activación alostérica de dicho antiportador, por lo que ha sido considerado como pieza clave en la hipótesis "alfastat" para el balance ácido-base (Nattie, 1990).

Se considera que en condiciones fisiológicas, con las concentraciones de hidrogeniones ( $[\text{H}^+]$ ) y de sodio ( $[\text{Na}^+]$ ) intra y extracelulares habituales, el principal activador serían los  $\text{H}^+$  intracelulares, pero que el antiportador esté activo o inactivo depende, a su vez, de la sensibilidad del mismo a los protones intracelulares, lo cual se ha visto que varía de un tipo de célula a otro, incluso dentro de la misma especie animal. Esto quiere decir que en cada tipo celular el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se activará a partir de un determinado  $\text{pH}_i$ , dependiendo además de la presencia de moduladores específicos; así, en muchos tipos celulares el antiportador está inactivo en condiciones de reposo pero al cambiar a una situación que tienda a disminuir el  $\text{pH}_i$  (p.ej.: ejercicio físico intenso) o por desplazamiento de la zona de  $\text{pH}_i$  a la cual se activa (p.ej.: efecto de la insulina, péptidos de crecimiento celular, cambios de temperatura, etc.), se podría provocar la puesta en funcionamiento del mismo (Aronson, 1985; Clark y Limbird, 1991; Grinstein y Rothstein, 1986). La presencia de diversos factores que puedan modular la actividad del antiportador en el ser vivo debe hacernos pensar que no es tan fácil y directa la extrapolación de los conocimientos adquiridos *in vitro* a las condiciones experimentales que se dan *in vivo*.

Por tanto, a la luz de los conocimientos actuales, parece lógico pensar que el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  debe jugar un papel importante en la regulación y establecimiento del equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico en el ser humano, especialmente durante la realización de ejercicio físico intenso. Consecuentemente, estudiar los efectos que conlleva la inhibición del mismo, en el ser humano *in vivo*, puede permitir ahondar en el conocimiento del papel fisiológico que desempeña tanto en reposo como durante el ejercicio.

## OBJETIVOS

### Generales

El principal objetivo del presente trabajo fue estudiar *-in vivo-* los cambios inducidos por la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en la respuesta fisiológica ante el esfuerzo físico intenso y extenuante en el ser humano.

Dado que existe un gran número de experimentos *in vitro* que demuestran la ubicuidad del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , su importante papel como regulador del pH intracelular y la posibilidad de bloqueo del mismo con dosis altas de amiloride, y teniendo en cuenta la experiencia clínica existente en el uso de amiloride en seres humanos, se consideró de extraordinario interés, la realización de un estudio que aunara la administración de este fármaco a dosis superiores a las habituales en la práctica clínica, con la situación fisiológica que se presenta durante la realización de ejercicios de alta intensidad, ya que podría permitir ahondar en el conocimiento del papel desarrollado por dicho antiportador como mecanismo de regulación ácido-base e hidro-electrolítico; así como, sus posibles implicaciones en los mecanismos de aporte metabólico y de intercambio gaseoso a diferentes niveles. Además, al realizarse el estudio *in vivo* en el ser humano se optó por un abordaje sistémico, con la intención de tratar con una visión integradora los conocimientos obtenidos *in vitro* y en la medida de los posible redireccionar una serie de líneas de experimentación futuras.

### **Específicos**

1) Estudiar los efectos del uso de dosis crecientes de amiloride, en sujetos en situación de reposo, sobre algunas variables fisiológicas renales y sanguíneas, a fin de caracterizar el curso temporal de algunas de sus acciones fisiológicas.

2) Controlar y detectar la aparición de cualquier síntoma o signo que indicara la existencia de una situación de riesgo importante para la salud de los sujetos experimentales, derivada de las condiciones experimentales planteadas: uso de dosis crecientes de amiloride durante la realización de pruebas progresivas máximas o durante brotes de ejercicio de alta intensidad.

3) Estudiar los cambios inducidos en el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico a nivel sistémico por la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , caracterizando la cinética y la magnitud de los cambios en las presiones parciales de los gases, pH y concentraciones plasmáticas de iones a lo largo de los distintas pruebas de esfuerzo.

4) Caracterizar los cambios en la estrategia metabólica y de intercambio gaseoso a nivel respiratorio, por medio del análisis respiración a respiración durante las pruebas máximas progresivas como en los brotes de ejercicio de alta intensidad.

5) Caracterizar los cambios en la estrategia metabólica y de intercambio gaseoso, así como en la respuesta cardiovascular del territorio muscular activo, por medio del estudio del flujo sanguíneo periférico, las presiones parciales de los gases y del consumo o la producción de los mismos en dicho territorio.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### 1.- Sujetos experimentales.

El grupo fundamental de pruebas se realizaron con AML sobre un total de 32 personas, repartidas en cinco situaciones experimentales diferentes. No obstante se realizaron una serie de pruebas adicionales, unas previas para comprobar los efectos secundarios o indeseables del AML y su posible uso en humanos a dosis altas y otras simultáneas o *a posteriori* para aclarar aspectos concretos según los resultados iban siendo obtenidos.

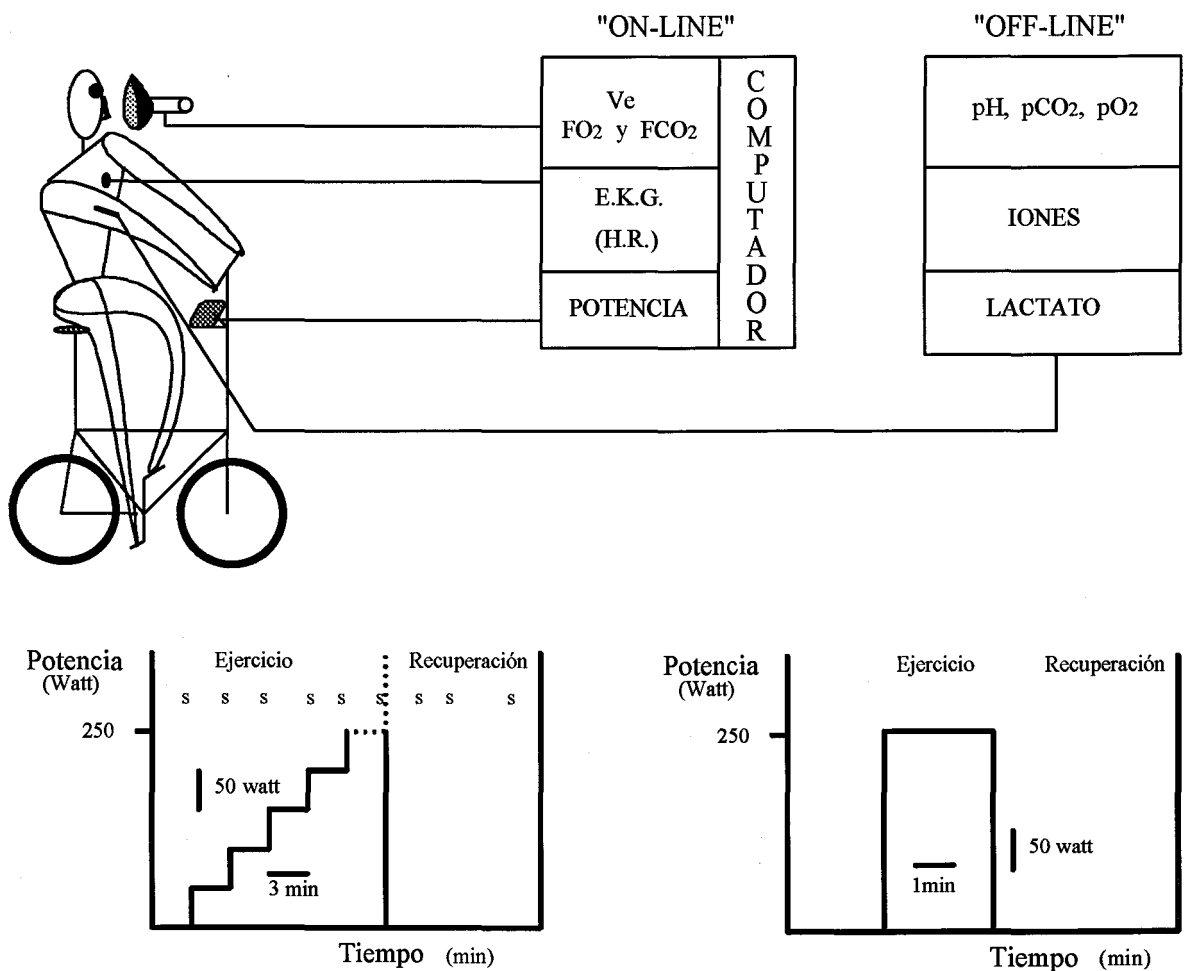
Todos los sujetos experimentales, que se prestaron de manera voluntaria a la realización de las pruebas, fueron previamente informados de las características así como de los posibles inconvenientes o efectos indeseables, secundarios a la realización de las mismas con o sin uso de la droga. Un comité de ética local aprobó la realización de dichas pruebas.

En todo caso, se realizaron estudios basales previos a la realización de las mismas; es decir, se realizó una breve historia clínica para cada sujeto que incluía, al menos, anamnesis, exploración física general y por aparatos, cineantropometría, electrocardiograma de reposo y espirometría basal forzada. Así mismo, se realizaron pruebas previas para la adaptación de los sujetos a las condiciones experimentales, laboratorio, ergómetros, etc. Las características antropométricas de los sujetos experimentales que fueron sometidos a los experimentos en reposo o de ejercicio en cicloergómetro y en el ergómetro de Andersen fueron similares. El grupo (n=10) que se

sometió a los experimentos en reposo tenía una edad de  $27.3 \pm 7.4$  años, una estatura de  $171.1 \pm 6.2$  cm y su peso fue de  $65.8 \pm 10.6$  kg. En el grupo ( $n=13$ ) que se sometió a los experimentos en cicloergómetro, la edad fue de  $28.4 \pm 7.0$  años, la estatura de  $176 \pm 10$  cm y el peso de  $71.9 \pm 11$  kg. Finalmente, en el grupo ( $n=9$ ) que se sometió a los experimentos en el ergómetro de Andersen la edad fue de  $24.8 \pm 5.2$  años, la estatura de  $180.2 \pm 4.4$  cm y el peso de  $76.8 \pm 7.6$  kg.

## 2.- Ergometrías.

Además de los experimentos realizados en condiciones de reposo, los sujetos experimentales fueron sometidos a dos tipos distintos de pruebas de esfuerzo en dos ergómetros diferentes.



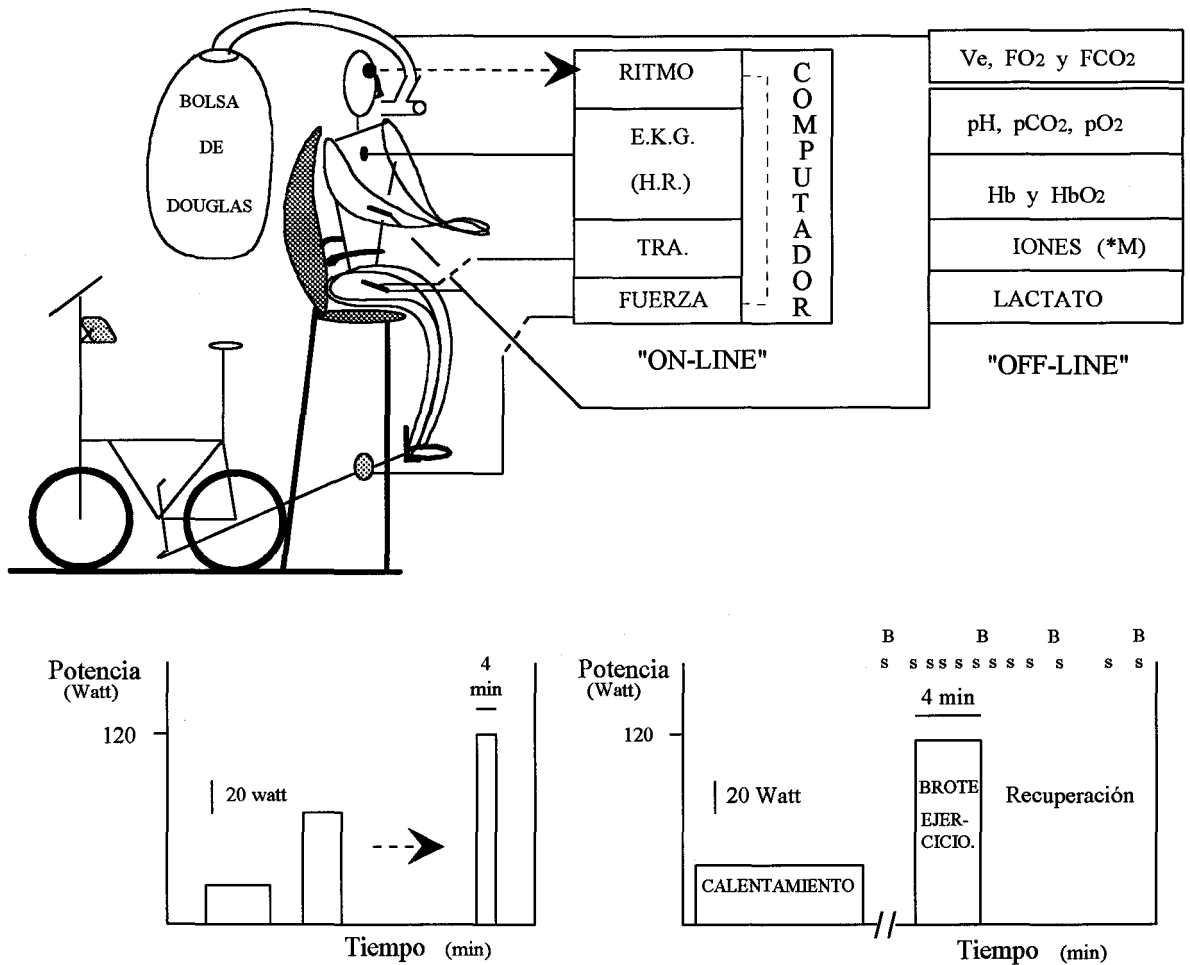
**Figura 1.-** Esquema del montaje experimental en las pruebas con cicloergómetro. En la parte superior de la figura se muestra el ergómetro y las distintas variables biológicas registradas o medidas durante el experimento. En la parte inferior, se muestran los protocolos ergométricos usados; a la izquierda el protocolo máximo progresivo y a la derecha el protocolo de un sólo brote a potencia constante. Con S, se indica la toma de muestras sanguíneas.  $V_e$ : ventilación al minuto;  $FO_2$ : fracción de oxígeno en el aire ventilado;  $FCO_2$ : Idem para el dióxido de carbono; EKG: Trazado electrocardiográfico; H.R.: Frecuencia cardíaca;  $pO_2$ : presión parcial de oxígeno;  $pCO_2$ : Idem para el dióxido de carbono.



2.1.- Ergómetros.

2.1.1. Cicloergómetros (ver figura 1):

Se usaron dos tipos, uno de freno electromagnético por corrientes de Foucault, con programador de carga controlado por microprocesador (ERG 551, Bosch); y otro de freno mecánico con control de carga manual (Monark, 818). En ambos casos el control del ritmo (que se ajustó a 60 pedaladas por minuto) se realizó por medio de una pantalla de cristal líquido controlada por microprocesador.



**Figura 2.-** Esquema del montaje experimental en las pruebas realizadas con el ergómetro de Andersen. En la parte superior de la figura se muestra el ergómetro y las distintas variables biológicas registradas o medidas durante el experimento. En la parte inferior, se muestran los protocolos ergométricos usados; a la izquierda el protocolo con brotes de carga crecientes y a la derecha el protocolo de un sólo brote a potencia constante para 4 min. Con S, se indica la toma de muestras sanguíneas, (en el caso de las obtenidas en el territorio femoral fueron arteriales y venosas, además de ir seguidas de la determinación del flujo sanguíneo). Con B, se indica la toma de biopsias musculares. Para más explicaciones ver el texto o figura 1.

2.1.2. Ergómetro de Andersen (ver figura 2):

En este aparato, el sujeto se sienta de espaldas a un cicloergómetro, en una silla confortable y elevada a un metro y medio del suelo. El sujeto se une al cicloergómetro

por medio de un sistema que incluye una talonera, una barra metálica y un tornillo de sujeción al pedal, por lo que el sujeto puede realizar extensiones cíclicas de la pierna/s fijada/s, mientras que el control de la potencia dependerá del tipo de bicicleta ergométrica adosada. En nuestros experimentos se adaptó un cicloergómetro de freno mecánico (Monark, 818). Sobre el ergómetro se había implementado un sistema computarizado de control o retroalimentación visual del ritmo, que básicamente constaba de un sensor-generador de pulsos conectado vía RS232 con un ordenador, con el software apropiado (wave-form 1.3) para que se mostrara en pantalla la duración del ciclo en milisegundos con intervalos de 50 mseg, lo que permitía al sujeto ajustar el ritmo a  $1 \pm 0.05$  Hz.

Por otro lado, para controlar que el sujeto trabajaba con los cuádriceps y relajaba la musculatura no envuelta (p. ej. bíceps femorales) se midió la fuerza desarrollada, tanto en el sentido de la extensión como de la flexión de la pierna (por medio de un transductor de fuerza lineal conectado a su correspondiente amplificador). Como características principales del ergómetro sobresalen el permitir la localización del trabajo en los cuádriceps femorales y el facilitar la toma de muestras biológicas, tanto sangre de los vasos femorales como biopsias musculares del territorio activo. Para una descripción detallada del ergómetro ver Andersen y col. (1985).

## **2.2. Tipos de pruebas ergométricas.**

### **2.2.1. Pruebas máximas progresivas:**

Este tipo de prueba es ampliamente usada en Fisiología del ejercicio por lo que no se hará una descripción detallada de la misma. Para mayor información ver Brooks y Fahey (1984) o Astrand y Rodhal (1986). En nuestro laboratorio se aplicó, en el cicloergómetro, un protocolo de escalones de tres minutos de duración con potencias crecientes, comenzando por 50 watt e incrementándose 50 watt por escalón. La frecuencia de pedaleo fue de 60 pedaladas al minuto. La prueba se prolongaba hasta la extenuación (así manifestada por el sujeto experimental), o hasta el momento en el que no se podía mantener el nivel de trabajo exigido (ver figura 1).

Cuando se usó el ergómetro de Andersen, se aplicó una variante de este tipo de prueba que fue una prueba progresiva con recuperación entre cada escalón de carga. Así, cada sujeto fue sometido brotes de potencia creciente, controlándose en todo caso el ritmo (que se ajustó a  $1 \pm 0.05$  Hz) así como el tiempo en que el sujeto se detuvo. Esto permitió establecer una relación "potencia desarrollada/tiempo de fatiga" y por tanto saber que potencia se debía desarrollar para un tiempo límite de 4 minutos; con posterioridad, se hacían varias repeticiones del mismo test para acomodar al sujeto al tipo de trabajo físico dentro del laboratorio y para comprobar la adecuación de la carga, es decir que no existieran cambios considerables en el tiempo de fatiga. En general, la adaptación al cicloergómetro suele ser más rápida que al ergómetro de Andersen, por lo que el uso del segundo ergómetro requiere entrenamiento previo tanto para adaptarse al ritmo (lo cual

era facilitado por el sistema de retroalimentación visual computarizado) como para contraer de forma exclusiva el cuádriceps femoral (ver figura 2).

### 2.2.2. Prueba de un escalón a potencia constante:

Con el cicloergómetro, una vez que por la prueba máxima progresiva se conocía la potencia desarrollada por cada sujeto al nivel del máximo consumo de oxígeno ( $W_{max}$ ), se determinó un nivel de carga a cierto porcentaje de la  $W_{max}$ , que debía ser mantenido, finalizando la prueba en el momento en que esto no fuera posible (ver figura 1). Con el ergómetro de Andersen también se realizaron pruebas cuadradas a potencia constante; si bien, la forma de obtención del nivel de potencia para cada sujeto fue diferente. Tal como se describió en el anterior apartado, se consideró oportuno buscar el nivel de potencia máxima para un tiempo aproximado de 4 minutos, a la frecuencia de 1 Hz (ver figura 2).

## 3.- Procesamiento de las muestras y señales biológicas.

### 3.1 Procesamiento de las muestras de orina:

En todas las muestras se midió el volumen (recipientes aforados), determinándose de forma inmediata el pH, las presiones parciales de oxígeno ( $pO_2$ ) y dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) -analizador de gases Ciba-Corning 278-, la concentración de  $Na^+$  ( $[Na^+]_{OR}$ ) y de  $K^+$  ( $[K^+]_{OR}$ ) en orina -fotómetro de llama, Beckman-. Esto nos permitió calcular tanto el pK ( $pK_{OR}$ ) como la concentración de bicarbonato ( $[HCO_3^-]_{OR}$ ) en orina, ver en el apartado de Cálculos.

### 3.2.- Procesamiento de muestras sanguíneas:

Las muestras sanguíneas, tras la eliminación de las burbujas de la jeringuilla, fueron guardadas en condiciones anaeróbicas en una cubeta con hielo, si bien una parte de cada muestra fue inmediatamente centrifugada (centrífuga O.DICH), para la obtención de plasma sanguíneo, que se guardó a -20 grados centígrados hasta su posterior análisis. Todas las muestras fueron analizadas a la mayor brevedad posible.

El **hemoxímetro** que se usó para la determinación de hemoglobina total (Hb) y la saturación parcial de la misma por el oxígeno ( $HbO_2$ ) fue el Hemoximeter OSM3 (Radiometer), que realiza mediciones sobre micromuestras de sangre total (35  $\mu$ l), las cuales son hemolisadas por ultrasonidos en el interior del aparato, y sometidas a espectrofotometría a 6 longitudes de onda simultáneamente. Este proceso permite realizar mediciones de alta precisión y reproductibilidad de la  $HbO_2$ , normalmente calculada en otros aparatos.

El pH y las presiones parciales de oxígeno ( $pO_2$ ) y dióxido de carbono ( $pCO_2$ ) en sangre, se determinaron por medio de electrodos selectivos integrados en el correspondiente **analizador de gases sanguíneos** (AVL 995 o CIBA-Corning 278) que fueron calibrados por medio de gases y soluciones, servidas por la correspondiente casa comercial.

Para medir la concentración de electrolitos en plasma sanguíneo, realizadas tanto en las muestras de sangre total como en las de plasma, se usó un **analizador de electrolitos** (AVL 983-S), con electrodos selectivos para  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $K^+$ , los cuales fueron calibrados por medio de soluciones servidas por la correspondiente casa comercial.

La concentración de L-Lactato en sangre total hemolisada (por medio del agente hemolisante YSI 1515) y en el plasma sanguíneo previamente obtenido por centrifugación, se midió por medio de un **analizador de L-lactato** (YSI, 1500 Sport). Este es un analizador semiautomático que posee un electrodo selectivo para L-lactato. En otros casos la concentración de lactato se determinó a partir del plasma sobrenadante, por método enzimático para micromuestras (Boehringer Mannheim) midiendo los cambios de absorbancia en un **espectrofotómetro** (Gricel RDJ 55). En todo caso se siguieron las recomendaciones de Foxdal y col. (1990).

Se usaron distintos tipos de **centrífugas**; por ejemplo, en la obtención de plasma sanguíneo o del sobrenadante de las muestras tratadas con perclórico para la posterior medición de la concentración de lactato, se usó una centrífuga O.DICH con cabezal para microprobetas Eppendorf u opcionalmente centrifugas refrigeradas con velocidad programable (Sorvall, RT6000B). Además, se determinó el valor hematócrito en microcapilares, centrifugados a alta velocidad (Haemofuge A 1228 o Gricel microhematócrito) lo cual sólo genera un atrapamiento del 1 al 2% del volumen plasmático. Tras la realización de todas estas determinaciones la sangre restante se centrifugó (Sorvall, RT6000B) y el plasma resultante se congeló a  $-80^\circ C$ .

### **3.3 Procesamiento de las biopsias musculares:**

Las muestras de 50 a 100 mg de tejido muscular fueron obtenidas del tercio superior del vasto externo del cuádriceps femoral por medio de una aguja de biopsia percutánea, según la metodología descrita por Bergström (1962); las cuales fueron pesadas, inmediatamente introducidas en nitrógeno líquido y guardadas a  $-80^\circ C$ . para su posterior análisis. Cada muestra fue limpiada de su componente graso quedando un residuo libre de grasa (FFS); que después fue liberado del tejido conectivo, quedando un residuo libre de grasa y tejido conectivo (FCFS). Después, se determinó la cantidad total de agua, electrolitos ( $Na^+$ ,  $K^+$ ,  $Cl^-$  y  $Mg^+$ ) y creatina de la muestra; según la metodología descrita por Forsberg y col. (1991). En el apartado de Cálculos, se describe como se estimaron las distintas variables relacionadas.

### 3.4 Procesamiento de señales ergoespirométricas:

El análisis del aire espirado y recolectado por medio de **bolsas de Douglas** permite la determinación del volumen total del aire espirado en un gasómetro u opsómetro húmedo (Elster & CO) y las fracciones de  $O_2$  y  $CO_2$  en el mismo por medio de analizadores de gases (Beckman). Con lo que, se puede calcular la ventilación minuto ( $V_e$ ), el consumo de oxígeno ( $VO_2$ ) y la producción de dióxido de carbono ( $VCO_2$ ). Una buena descripción del método se puede encontrar en Mellerowicz (1984). Si bien básicamente el principio es similar, el uso del **sistema ergoespirométrico abierto computarizado** (CPX/D, Medical Graphics), que consta de un neumotacógrafo desechable y analizadores rápidos de oxígeno (célula de circonio) y de dióxido de carbono (cámara de infrarrojos) y que integra la señal de frecuencia cardíaca procedente del electrocardiograma, permitió la medición respiración a respiración de las distintas variables (frecuencia cardíaca (H.R.), Ventilación minuto ( $V_e$ ), fracción de oxígeno ( $FO_2$ ) y de dióxido de carbono ( $FCO_2$ ) en el aire ventilado, así como la potencia desarrollada). Además, este tipo de instrumental realiza los cálculos "on-line" necesarios para la generación de hasta 30 variables fisiológicas diferentes.

El **trazado electrocardiográfico** (EKG) fue visualizado en todo momento por medio de un monitor (Servomed SMS181, de Hellige o monitor de datos de paciente 565, de Kone). Este tipo de electrocardiógrafos están dotados de filtros apropiados que eliminan los ruidos característicos de las pruebas de esfuerzo y permiten medir con precisión la frecuencia cardíaca, lo cual se realiza básicamente al discriminar entre los cambios de voltaje con respecto al tiempo, aceptando como latido cardíaco solo aquellos que se encuentran en un rango propio para el complejo QRS. La señal resultante se envió al CPX/D o a papel.

### 3.5.- Otras señales:

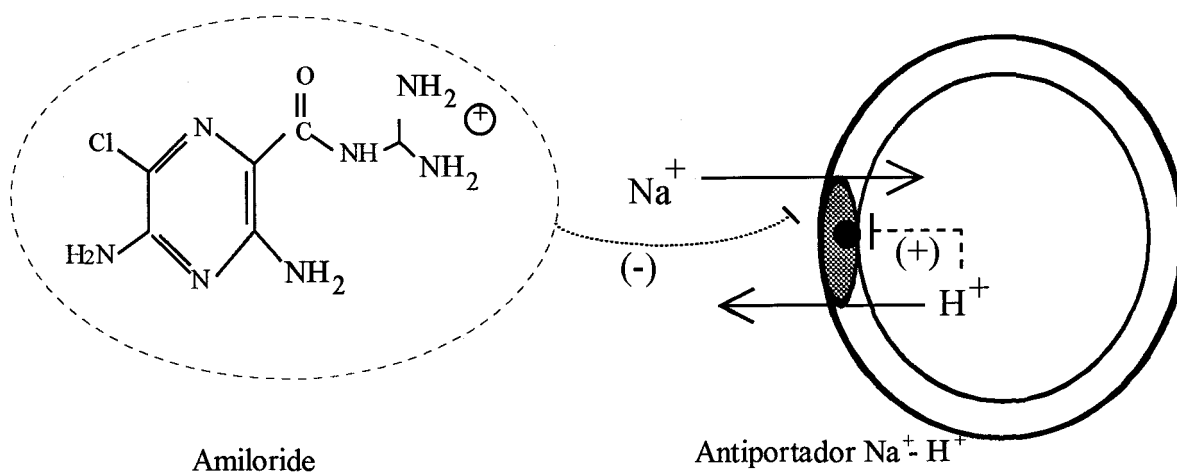
El **flujo sanguíneo** se determinó mediante termodilución tras infusión continua, siguiendo la metodología de Andersen y Saltin (1985). Para lo cual, tras la instalación del termistor en la vena femoral, se usó una bomba de infusión continua para introducir suero salino fisiológico, previamente enfriado tras hacerlo pasar por un circuito de refrigeración, en la vena canalizada. El análisis de los registros de temperatura de la sangre venosa durante la maniobra de termodilución permitió obtener los valores de flujo sanguíneo.

Adicionalmente, durante toda la prueba se monitorizó de forma continua, además del trazado electrocardiográfico, **la fuerza desarrollada y la frecuencia** de trabajo (tal como se describe en la sección de ergómetro de Andersen). Las señales anteriores más los cambios de temperatura en sangre venosa se registraron de forma discreta en papel (polígrafo Gould TA 2000), para su posterior estudio.



#### 4. Inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ :

El clorhidrato de amiloride (AML), cuya estructura química se presenta en la fórmula adjunta (ver figura 3), es ampliamente conocido por su uso clínico como diurético ahorrador de potasio, para lo cual se suele administrar de forma crónica y a bajas dosis (entre 5 y 10 mg). Por otro lado, en un gran número de preparaciones *in vitro* se conoce y se usa tanto el amiloride como alguno de sus derivados como inhibidores del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (ver figura 3). Las dosis usadas para nuestros experimentos finales, oscilaron entre 20 y 60 mg para un sujeto de 70 kg, es decir dosis de 0,29 a 0,86 mg/kg de peso. En el primer apartado de la Discusión se detallan las consideraciones previas a la elección de dichas dosis.



**FIGURA 3.-** Estructura química del amiloride y esquema de su acción en el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

#### 5.- Proceder experimental

##### 5.1. Protocolos en reposo. Determinación de la dosis de amiloride.

##### 5.1.1. Dosis única:

Cuatro sujetos sanos consintieron en la realización del test, todos ellos fueron informados previamente de los inconvenientes y riesgos derivados de la prueba.

Protocolo: En primer lugar se obtuvieron muestras de sangre venosa y de orina en ayunas, tras lo cual los sujetos experimentales ingirieron una dosis de 0.29 mg/kg de AML y se dedicaron a realizar su vida habitual, sin restricción ni control de la dieta y sin realizar esfuerzos físicos considerables. Dos nuevas muestras de sangre venosa y orina se volvieron a obtener a las 3 y 7 h. Las muestras se analizaron según se describe en el apartado 3, determinándose iones, pH y presiones parciales de gases en orina y en sangre. Adicionalmente, se controló el trazado electrocardiográfico.

### **5.1.2. Dosis múltiple:**

Seis sujetos sanos consintieron en la realización del test, todos ellos fueron informados previamente de los inconvenientes y riesgos derivados de la prueba.

Protocolo: En primer lugar se obtuvieron muestras de sangre venosa y de orina, tras lo cual, los sujetos experimentales ingirieron una primera dosis de 0.29 mg/kg de AML, otra segunda dosis de 0.29 mg/kg a las seis horas y la tercera dosis a las 12 horas. Se obtuvieron varias muestras de orina a lo largo de 18 h, contadas desde el momento en que se ingirió la primera dosis; durante este tiempo los sujetos experimentales realizaron su vida habitual (como se detalla en el experimento previamente descrito). Por otro lado, se obtuvo una nueva muestra de sangre venosa al final de la prueba.

Las muestras de orina y de sangre fueron procesadas igual que en el experimento de dosis única, controlándose igualmente el trazado electrocardiográfico.

## **5.2. Protocolos ergométricos.**

En este apartado se describen los experimentos con amiloride y ejercicio físico, tanto los realizados en cicloergómetro como los realizados en ergómetro de Andersen.

### **5.2.1.- Progresivos.**

#### **5.2.1.1.- En cicloergómetro:**

Un total de 7 sujetos realizaron este tipo de pruebas (ver 2.2.1), tanto sin AML como tras la ingesta de tres dosis de 0.29 mg/kg de peso/6 horas. En ningún caso se restringió la dieta. Durante la misma se monitorizó de forma continua el EKG, se conectó a cada sujeto al sistema ergoespirométrico computarizado (CPX/D) y se cateterizó una vena de la fosa antecubital, lo que permitió la toma de muestras sanguíneas en reposo, al final de cada escalón de carga y en los minutos 3°, 5°, 10° de la recuperación, determinándose electrolitos, pH y gases en sangre. Las diversas variables fueron analizadas de la forma habitual (Ver apartado 3 y figura 1).

#### **5.2.1.2.- En ergómetro de Andersen:**

Tal como se especificó anteriormente (apartado 2.2.1 y figura 2), este tipo de protocolo sólo se usó para determinar la carga a usar durante las pruebas a potencia constante con este ergómetro, así como para facilitar la adaptación de los sujetos al laboratorio.

### **5.2.2.- A potencia constante.**

#### **5.2.2.1 En cicloergómetro:**

Un total de 6 sujetos realizaron este tipo de pruebas (ver 2.2.2 y figura 1), en situación control y a las 4 horas de ingerir una sola dosis de 0.86 mg de AML/kg de peso; tampoco se controló la dieta. Durante la misma se monitorizó de forma continua el EKG y se conectó el sujeto experimental al sistema ergoespirométrico computarizado (CPX/D).

### **5.2.2.2.- En ergómetro de Andersen:**

#### **5.2.2.2.1.- Con obtención de muestras sanguíneas del territorio inactivo:**

Dentro de este apartado se incluye un amplio grupo de experimentos iniciales tanto en situación control (sin AML), con dosis que iban desde 5 a 20 mg de AML y la realización simultánea de ejercicio con una sola pierna o con ambas, en el ergómetro de Andersen. De todos ellos, parece interesante resaltar las pruebas realizadas por un grupo que desarrolló estas pruebas de potencia constante con ambas piernas fijadas, tras ingerir 0.29 mg AML/kg de peso.

Los sujetos llegaban, en ayunas, a las 8 h. a.m. sin haber ingerido AML (situación control) o tras 4 h de haber ingerido la correspondiente dosis de 0.29 mg/kg de AML. Previamente a la realización del ejercicio se colocaba un **catéter en una vena antecubital** y el sujeto se unía a un sistema de recolección de aire espirado en bolsas de Douglas, por medio de una boquilla y un sistema de válvulas inspiratoria-espíroria en Y.

Protocolo: Tras 10 minutos de calentamiento a una carga de 50 watt aproximadamente, y tras un mínimo de 10 minutos de reposo, se tomó una muestra de sangre venosa y se colectó una primera bolsa de Douglas. Acto seguido se inició un test cuadrado a la máxima carga sostenible para 4 minutos. El ejercicio fue interrumpido cuando decreció la amplitud de la señal de fuerza o la frecuencia de las extensiones de piernas.

Las extracciones de sangre venosa fueron realizadas en reposo y cada minuto durante la fase activa del test. Lo mismo se repitió en los minutos 1, 3, 5, 7, 10, 20 y 30 en la fase de recuperación tras el brote de ejercicio. El aire espirado se recolectó con las correspondientes bolsas de Douglas a lo largo de la prueba. El esquema del protocolo seguido se presenta en la figura 2, solo que las únicas muestras obtenidas fueron de sangre venosa.

Durante toda la prueba se monitorizó de forma continua el trazado electrocardiográfico, al que se le prestó especial atención durante estos primeros experimentos. Adicionalmente, se monitorizaron la fuerza desarrollada y la frecuencia de trabajo, que opcionalmente se registraron de forma discreta en papel.

Las muestras fueron analizadas a la mayor brevedad posible, determinándose hemoglobina total y saturación parcial de la misma, pH y presiones parciales de oxígeno y dióxido de carbono en sangre, concentración de electrolitos en plasma sanguíneo, la concentración de L-Lactato en sangre hemolisada. Finalmente se determinó el valor hematócrito en microcapilares centrifugados a alta velocidad (Ver apartado 3.2.).

#### **5.2.2.2.2.- Con obtención de muestras del territorio activo.**

Un total de 6 sujetos realizaron las pruebas a potencia constante en el ergómetro de Andersen con ambas piernas.



Los sujetos llegaban a las 8 h. a.m. sin haber tomado AML o tras 4 h. de haber ingerido la correspondiente dosis de 0.86 mg/Kg de AML. Previamente a la realización del ejercicio se colocaron catéteres en la arteria femoral (técnica de Seldinger modificada) y vena femoral, lo permite la obtención de muestras sanguíneas de forma cómoda. En el territorio venoso se insertó un catéter para angiografía unos 10-12 cm distal al ligamento inguinal y se pasó un termistor a través del mismo, situándose la punta de éste a 1-2 cm distal al ligamento inguinal; lo que permite medir el flujo sanguíneo en la pierna (LBF) mediante la técnica de termodilución tras infusión constante, descrita por Andersen y Saltin (1985). Eventualmente se midió dicho flujo por medio de la infusión en bolo. Antes y después de cada brote de ejercicio se obtuvieron biopsias de tejido muscular (ver 3.3). Adicionalmente se tomaron muestras de aire espirado en bolsas de Douglas.

Protocolo: Tras 10 minutos de calentamiento a una carga de 50 watt aproximadamente, y tras un mínimo de 10 minutos de reposo, se tomaron muestras de sangre arterial y venosa, una biopsia muscular, se determinó el LBF y se colectó una primera bolsa de Douglas. Acto seguido se inició un test cuadrado a la máxima carga sostenible para 4 minutos, siendo el ejercicio interrumpido cuando decreció la amplitud de la señal de fuerza o la frecuencia de las extensiones.

Las extracciones de sangre (arterial y venosa simultáneamente) y las determinaciones de LBF fueron realizadas cada minuto o lo más frecuentemente posible durante la fase activa del test. Lo mismo se repitió en los minutos 1, 3, 5, 7, 10, 20 y 30 tras el brote de ejercicio. Las biopsias musculares fueron tomadas en reposo, al final del ejercicio y durante la recuperación al 3° y 10° minuto. Diversas bolsas de Douglas se obtuvieron a lo largo de la prueba. El esquema del protocolo seguido se presenta en la figura 2.

Adicionalmente, durante toda la prueba se monitorizó de forma continua el trazado electrocardiográfico, la fuerza desarrollada y la frecuencia de trabajo. Estas señales y los cambios de temperatura en sangre venosa se registraron de forma discreta en papel.

## 6.- CÁLCULOS

La ecuación de Henderson-Hasselbalch en su forma logarítmica:

$$pH = pK + \log \frac{[HCO_3^-]}{0.031 \times pCO_2},$$

se usó tanto en los cálculos en orina como en los cálculos a nivel plasmático. En orina, a partir de las variables medidas (pH, pCO<sub>2</sub>, pO<sub>2</sub>, [Na<sup>+</sup>]<sub>or</sub> y [K<sup>+</sup>]<sub>or</sub>) se pudo calcular el pK de ésta, según la fórmula:

$$pK_{or} = 6.33 - 0.5 \sqrt{[Na^+]_{or} + [K^+]_{or}} \quad (\text{Laski y Kurstman, 1989}),$$

con lo que se puede estimar la concentración de bicarbonato en la orina ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{or}}$ ), al despejar de la ecuación de Henderson-Hasselbalch:

$$[\text{HCO}_3^-]_{\text{or}} = 0.031 \times \text{pCO}_2 \times 10^{(\text{pH}-\text{pK})_{\text{or}}}$$

En las muestras sanguíneas, igualmente se pudo estimar a partir de las variables medidas (pH,  $\text{pCO}_2$  y  $\text{pO}_2$ ) la concentración de bicarbonato actual ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$ ), asumiendo un valor constante de  $\text{pK} = 6.1$ . Otras variables calculadas, que se utilizan de forma habitual en la valoración del equilibrio ácido-base a nivel plasmático, fueron la concentración estándar de bicarbonato ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$ ), estimada por medio de la fórmula de VanSlyke y Cullin (1917); el exceso de bases (B.E.) que se calculó por la fórmula de Siggaard-Andersen (1966); mientras que la saturación parcial de la hemoglobina por el oxígeno ( $\text{HbO}_2$ ) se calculó a partir de la ecuación de Kelman (1966) y Thomas (1972):

$$\text{HbO}_2 = \frac{N^4 - 15N^3 + 2045N^2 + 2000N}{N^4 - 15N^3 + 2000N^2 - 3110N + (2.4 \times 10^6)} \times 100,$$

donde,  $N = \text{pO}_2 \times 10^{[0.48(\text{pH}-7.4)-0.0013 \text{ B.E.}]}$ . Estos valores calculados se compararon con los medidos en el hemoxímetro (ver en Resultados y Discusión).

Por otro lado, se realizó el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base en plasma por medio del abordaje propuesto por Stewart (1978 y 1981). Con esto se consigue calcular, entre otras variables, la concentración de hidrogeniones en plasma ( $[\text{H}^+]$ ), según la fórmula:

$$[\text{H}^+]^4 + K_A + [\text{SID}] \times [\text{H}^+]^3 + \{K_A \times ([\text{SID}] - [\text{P}_{\text{TOT}}]) - (K_C \times \text{pCO}_2 + K'_W)\} \\ \times [\text{H}^+]^2 - \{(K_A \times (K_C \times \text{pCO}_2) + K'_W) + (K_3 \times K_C \times \text{pCO}_2)\} \times [\text{H}^+] - \\ (K_A \times K_3 \times K_C \times \text{pCO}_2) = 0$$

donde, como coeficientes de la variable dependiente ( $[\text{H}^+]$ ) aparecen las distintas variables independientes, es decir: las constantes de disociación para el ácido carbónico ( $K_C$ ), bicarbonato ( $K_3$ ), ácidos débiles ( $K_A$ ) y del agua ( $K'_W$ ); la  $\text{pCO}_2$ , la concentración de proteínas totales en plasma  $[\text{P}_{\text{TOT}}]$  y la diferencia neta de iones fuertes o S.I.D., del inglés "Strong Ion Difference", calculada como  $([\text{Na}^+] + [\text{K}^+]) - ([\text{Cl}^-] + [\text{Lact}^-])$ . Para resolver esta ecuación polinomial de cuarto grado se hizo un programa que permitió el uso del algoritmo de Marquardt-Levenberg (mínimos cuadrados), disponible en un programa para gráficos científicos en ordenador, de uso cotidiano (Sigma-Plot 4.1, Jandel Scientific).

Para el estudio del equilibrio hidro-electrolítico en plasma, se midieron los cambios en el valor hematocrito (V. Hct.) lo cual permite calcular los cambios en el volumen plasmático por medio de la ecuación de Greenleaf y col. (1979); además, se compararon los cambios en el valor hematocrito medido y el estimado a partir de la concentración de hemoglobina total (Hb) con la fórmula (V. Hct. = Hb × 2.941). Por otro lado, la medición de la concentración los iones en plasma permitió una valoración cuantitativa del balance iónico por medio de la fórmula usada habitualmente en clínica (Emmet y Seldin, 1989 a):

$$A.G._{clc.} = ([Na^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-]),$$

donde, A.G.<sub>clc.</sub> expresa el desbalance o "hueco" aniónico existente en el plasma (del inglés "Anion Gap"), siendo calculado a partir de las concentraciones en plasma de los tres iones de uso cotidiano en la práctica clínica. No obstante, durante el ejercicio físico se dan cambios importantes en las concentraciones de potasio y de lactato, por lo que deben ser tenidos en consideración. Por tanto, se usó la siguiente fórmula:

$$A.G._{ejer.} = ([Na^+] + [K^+]) - ([Cl^-] + [HCO_3^-] + [Lact^-]) \quad (\text{Medb\o y Sejersted, 1985}),$$

donde, A.G.<sub>ejer.</sub> expresa el "anion gap" calculado a partir de las concentraciones en plasma de cinco iones, añadiéndose la [K<sup>+</sup>] y la [Lact<sup>-</sup>] a la fórmula del A.G.<sub>clc.</sub>, en la secciones de Resultados y Discusión se detalla la diferencia entre un abordaje y otro. Por otro lado, para calcular el flujo neto de iones en el territorio activo, se multiplicaron los valores de las diferencias arterio-venosas de las concentraciones de dichos iones por los valores de flujo sanguíneo.

En las biopsias musculares, a partir de las variables medidas, que básicamente fueron el agua muscular total (H<sub>2</sub>O<sub>m</sub>), y el contenido muscular total de electrolitos (Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>++</sup>, Cl<sup>-</sup>) en cada muestra, se pudo calcular la concentración de cada uno de los electrolitos en la muestra. Por otro lado, el cálculo del agua intracelular (H<sub>2</sub>O<sub>i</sub>) y extracelular (H<sub>2</sub>O<sub>e</sub>) se hizo por medio del llamado "*método de cloruro*" tal como han descrito Forsberg y col. (1991) y Bergström y col. (1976), que se basa en la aplicación de la ecuación de Nernst, asumiéndose una relación de cloruro extra/intracelular constante de 26:1 y aplicándose potenciales de reposo en el sarcolema (V<sub>m</sub>) de -87.2 mV previo al ejercicio y de -75 mV al final del mismo ( Sjøgaard y col., 1985).

La concentración extracelular de electrolitos se calculó a partir de las concentraciones plasmáticas de los mismos, corregidas por el contenido de proteínas y el factor de Donnan. El contenido intracelular de iones se calculó sustrayendo del contenido total de iones el contenido extracelular de los mismos.

Estos cálculos se compararon con los obtenidos a partir del "*método de inulina*", ya que el método anterior puede ser ampliamente criticado, especialmente durante el ejercicio, por lo que se recalcularon la distribución de agua y las diferentes concentraciones y contenidos de electrolitos, asumiendo que el agua intracelular fue el 90% de la total en reposo y del 85% al final del ejercicio, tal como describieron Sjøgaard y Saltin (1982) y Sjøgaard y col. (1985). El resto de cálculos fue similar a los arriba descritos.

La masa muscular del cuádriceps femoral fue estimada por medio de la técnica cineantropométrica descrita por Andersen y Saltin (1985), que aporta valores similares a los obtenidos con tomografía axial computarizada (Saltin, 1985).

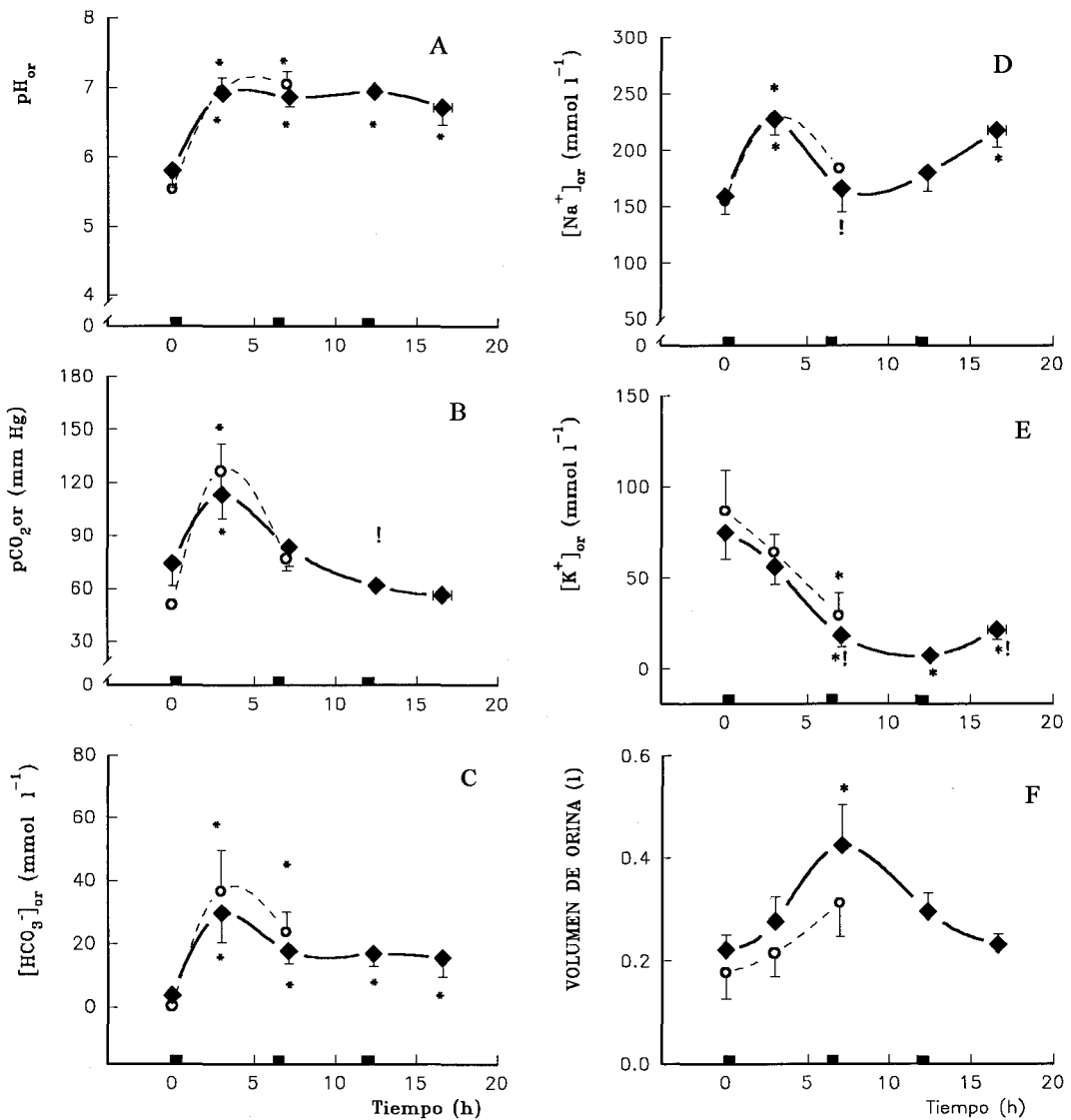
**Análisis estadístico:** En los distintos experimentos realizados, los datos se presentan como la media  $\pm$  la desviación estándar de la muestras ( $m \pm D.E.$ ). El grado de bondad del ajuste de cada variable a una distribución normal se determinó con la  $\chi^2$ , usándose la t-student para la comparación de las medias de los distintos grupos (para datos pareados o para datos independientes según cada caso). Aquellas muestras que no se ajustaban a la distribución normal fueron comparados con la prueba no paramétrica de Mann-Whitney (Carrasco, 1989). En los ajustes realizados se indicará el correspondiente coeficiente de correlación de Pearson ( $r$ ), cuando estos se hicieron simplemente para realzar la evolución temporal de una nube de puntos de exigió una  $r > 0.90$ . El nivel de significación estadística exigido fue de  $p < 0.05$ , salvo que se indique lo contrario.

## RESULTADOS

### 1.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en situación de reposo: estudio con distintas dosis del inhibidor.

La ingesta de AML, a las diferentes dosis manejadas fue bien tolerada. No se observaron efectos secundarios tras el uso del mismo, tanto en situación de reposo como durante el ejercicio físico de alta intensidad. Resulta interesante destacar que en las muestras sanguíneas obtenidas en situación de reposo, en los experimentos iniciales, se vio que los cambios a nivel renal no generaban a corto plazo acidosis plasmática ni hiperkaliemia (considerada ésta como  $[\text{K}^+]_{\text{plasma}} > 5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). No obstante, en todo momento se prestó especial atención al control del trazado electrocardiográfico, que en ningún caso presentó alteraciones dignas de mención.

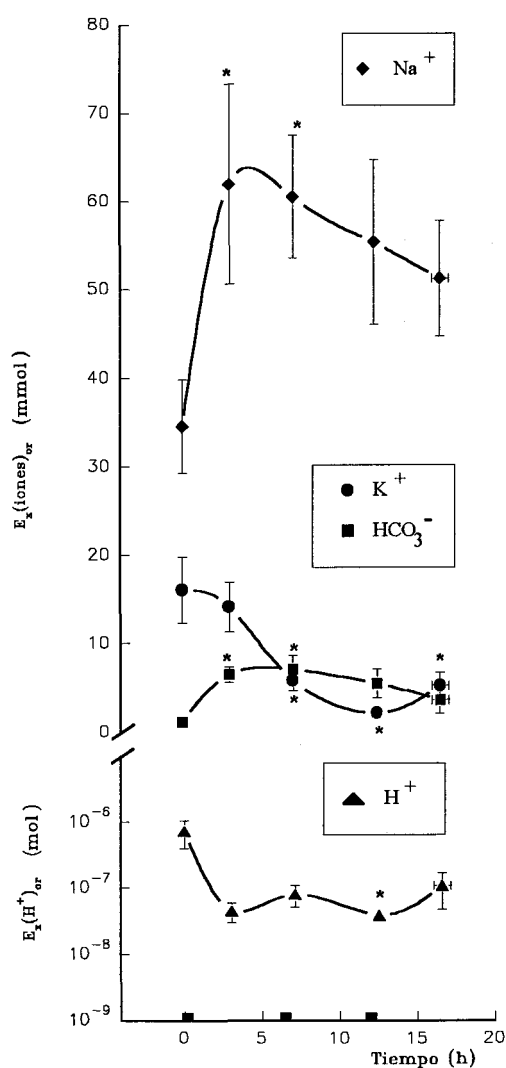
Tras la administración de la dosis única de 0.29 mg/kg de peso (ver figura 4, ○ y línea de puntos), se observó un claro incremento del pH de la orina a las 3 horas de la ingesta del AML, que se mantuvo hasta las 7 horas, siendo esto debido a que el incremento de la concentración de bicarbonato en orina ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{OR}}$ ) superó proporcionalmente la subida de  $\text{pCO}_2$  en orina, ya que ésta a pesar de presentar cambios importantes, va corregido por 0.031 en la ecuación de Henderson-Hasselbalch (ver figura 4; A, B y C). Por otro lado, se dio un aumento transitorio en la concentración de sodio en orina ( $[\text{Na}^+]_{\text{OR}}$ ) y una disminución de la concentración de potasio en orina ( $[\text{K}^+]_{\text{OR}}$ ) (ver figura 4, D y E). Tomando la primera orina de la mañana como basal, se observó que el volumen total de orina presentaba una tendencia a la subida (figura 4 F).



**Figura 4.-** Evolución a lo largo del tiempo de las variables relacionadas con el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico en las muestras de orina, obtenidas con la dosis única de amiloride (se representa la  $m \pm D.E.$  con el símbolo O y las barras, dichos puntos van unidos por una línea de discontinua) y en los experimentos con dosis múltiple (◆, unidos por la línea continua). Con \* se marcan las diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el punto señalado y el valor basal; mientras que con !, las diferencias significativas entre el punto señalado y el previo. Los cuadrados colocados en los ejes de abscisas marcan las dosis de 20 mg de AML a las 0, 6 y 12 horas.

Con la administración de las tres dosis, 0.29 mg/kg cada 6 horas (ver figura 4, ◆ unidos por línea continua), se comprobó que el incremento del pH de la orina se mantuvo prácticamente hasta las 18 horas. Los cambios observados en la  $[HCO_3^-]_{or}$  y en la  $pCO_2$  en orina presentaron inicialmente cinéticas similares, viéndose una gran subida en las primeras horas, alcanzándose un pico a la tercera o cuarta hora, momento en el que la  $pCO_2$  en orina presentó una caída exponencial, mientras que la  $[HCO_3^-]_{or}$  parece decrecer ligeramente para estabilizarse en un nivel más bajo, sobre  $18 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  (figura 4; A, B y C). La  $[Na^+]_{or}$  presentó un incremento transitorio con pico a las 3 horas y una tendencia a la subida a partir de la segunda dosis, mientras que la  $[K^+]_{or}$

presentó una importante disminución, para mantenerse a niveles cercanos a cero a partir de la séptima hora. (figura 4, D y E). Tomando la primera orina como basal, se observó que el volumen total de orina, tras la tendencia ascendente inicial, presentaba un pico a las 6 horas para descender posteriormente, volviendo a tener valores cercanos a los basales a las 15 horas, a pesar de la administración de la segunda y tercera dosis (figura 4, F).



**Figura 5.-** Evolución de la excreción por la orina ( $E_x$ ) de los distintos iones. Se presentan la  $m \pm D.E.$  de los experimentos con dosis única y múltiples tomados en conjunto.  $\blacklozenge$ , Ex de sodio;  $\bullet$ , Ex de potasio;  $\blacksquare$ , Ex de bicarbonato;  $\blacktriangle$ , Ex de hidrogeniones. Resto como en figura 4.

De los datos obtenidos y mostrados en la figura 4, se pueden calcular los cambios que indujo el amiloride en la excreción renal  $-E_x-$  de los distintos iones. En la figura 5 se presentan los datos de ambos experimentos en conjunto y se observa que el AML incrementó claramente la  $E_x$  de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{HCO}_3^-$ , mientras que provocó una

disminución en la  $E_{(x)}$  de  $K^+$  y de  $H^+$ . Por tanto los efectos inducidos por el AML en la  $E_{(x)}$  final de los distintos iones inducidos por el AML fueron evidentes, a pesar del incremento leve y transitorio de la diuresis total, visto en la figura 4, F.

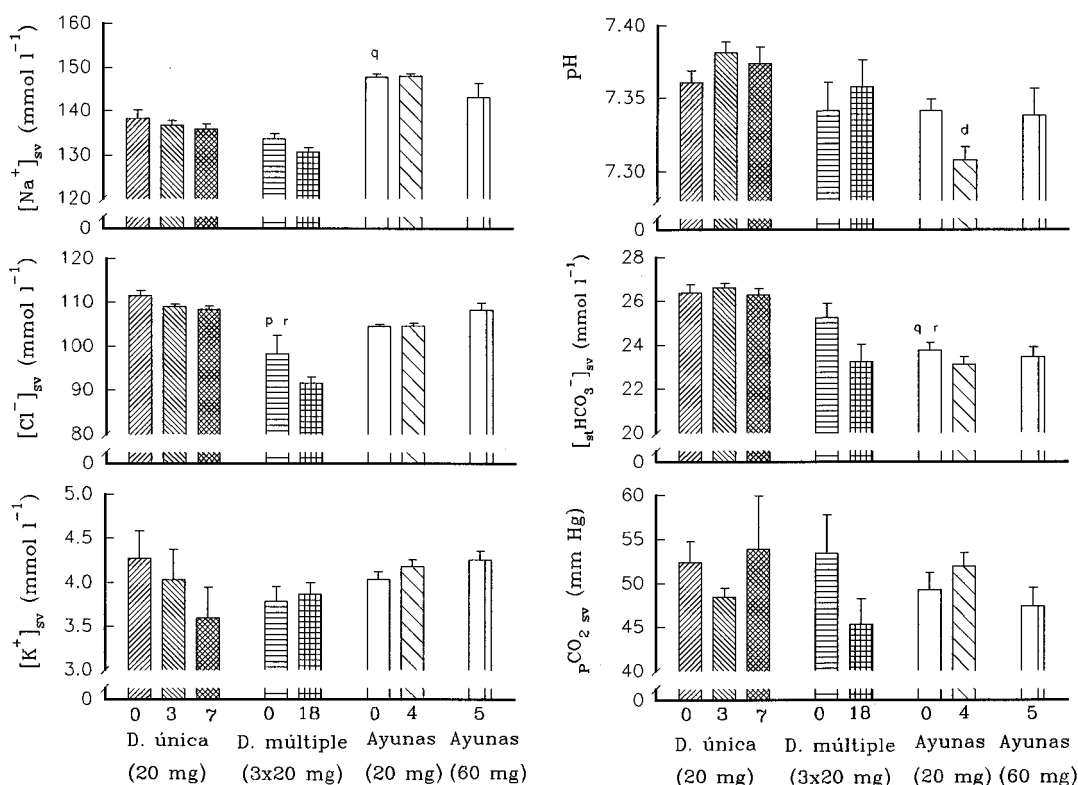
En la tabla I, se presenta el sumatorio de los incrementos o decrementos en la  $E_{(x)}$  renal de cada uno de los iones representados en la figura 5 -sólo valores promedio-, para lo cual se restó el valor basal a cada uno de los valores obtenidos en los distintos intervalos de tiempo, tras lo cual se hizo una suma acumulada de los mismos. Además se presentan los cambios en el sumatorio del volumen total de orina. Se observa que la  $E_{(x)}$  de  $Na^+$  alcanzó valores finales de 89.2 mmoles, que en todo caso fue superior a la suma del valor absoluto del resto de iones, que alcanzó un valor de 54.4 mmoles. En valores porcentuales se observó que la  $E_{(x)}$  de  $HCO_3^-$  supuso en todo momento un 20% de la  $E_{(x)}$  de  $Na^+$ , mientras que la cantidad total de  $K^+$  ahorrado incrementó progresivamente de tal forma que al final llega a alcanzar valores equivalentes al 40.8% de la  $E_{(x)}$  de  $Na^+$ . Los cambios en la  $E_{(x)}$  de  $H^+$  fueron de escasa importancia cuantitativa, si se compara con los cambios observados en el resto de los iones, si bien la valoración de dicho cambio debe ser diferente puesto que el  $H^+$  es un ion fuertemente tamponado o multitamponado, con lo que un ligero cambio en la  $[H^+]$  libres es fisiológicamente importante. Como se puede observar hay desde un 74.1 a un 39% de la  $E_{(x)}$  de  $Na^+$  que no está asociada al transporte de  $K^+$ ,  $HCO_3^-$  o  $H^+$ . Posiblemente, éste porcentaje restante se asocie principalmente con los movimientos de  $Cl^-$  a nivel renal.

$\Sigma E_{(x)}$	Tiempo				
	0 h	3 h	7.2 h	12.6 h	16.7 h
$Na^+$ (mmol)	0	27.4	53.4	72.5	89.2
$K^+$ (mmol)	0	-1.8	-11.9	-25.7	-36.9
$HCO_3^-$ (mmol)	0	5.3	11.2	15.5	18.0
$H^+$ (mol)	0	$-6.6^{-7}$	$-1.3^{-6}$	$-1.6^{-6}$	$-2.6^{-6}$
$(HCO_3^-+K^++H^+)$ (mmol)	0	7.1	23.1	41.2	54.4
$K^+/Na^+$ (%)	--	6.6	22.3	35.4	40.8
$HCO_3^-/Na^+$ (%)	--	19.3	21.0	21.4	20.2
$(HCO_3^-+K^++H^+)/Na^+$ (%)	--	25.9	43.3	56.8	61.0
Volumen orina (l)	--	0.06	0.26	0.33	0.34

**Tabla I.** Valores absolutos y relativos de los cambios inducidos por el AML en la excreción total de iones por la orina a lo largo del tiempo. Se han calculado los incrementos y decrementos (datos con signo negativo) con respecto al valor basal, mostrándose en la tabla la suma acumulada de los mismos. También se muestran los cambios en el volumen de orina.



A pesar de los cambios ejercidos por el AML a nivel renal, podemos decir que, en general, no se observaron cambios importantes en las variables sanguíneas controladas de forma simultánea, tal como se puede observar en la tabla II y en la figura 6.



**Figura 6.-** Variables fisiológicas relacionadas con el equilibrio ácido-base e hidroelectrolítico en situación de reposo, antes y después de la ingesta de AML. Se presenta la  $m \pm D.E.$  de las muestras de plasma obtenidas en territorio venoso. En primera instancia se presentan los datos basales y a las tres y siete horas del experimento con dosis única de 20 mg y control de orina simultáneo, (D. única: 20 mg para un sujeto de 70 kg). A continuación se muestran los datos basales y a las 18 horas de la ingesta de la dosis triple de amiloride (D. múltiple: 3x20 mg). Se completó la figura con los datos previos a la realización del test en el ergómetro de Andersen, en los que a diferencia de los experimentos anteriores los sujetos guardaron ayuno antes de la realización del test, tanto en el caso en que se usó la dosis de 20 mg (Ayunas + 20 mg) como en el caso de la dosis de 60 mg (Ayunas + 60 mg). En este último caso no se tomaron muestras basales. Claves de significación estadística en tabla II.

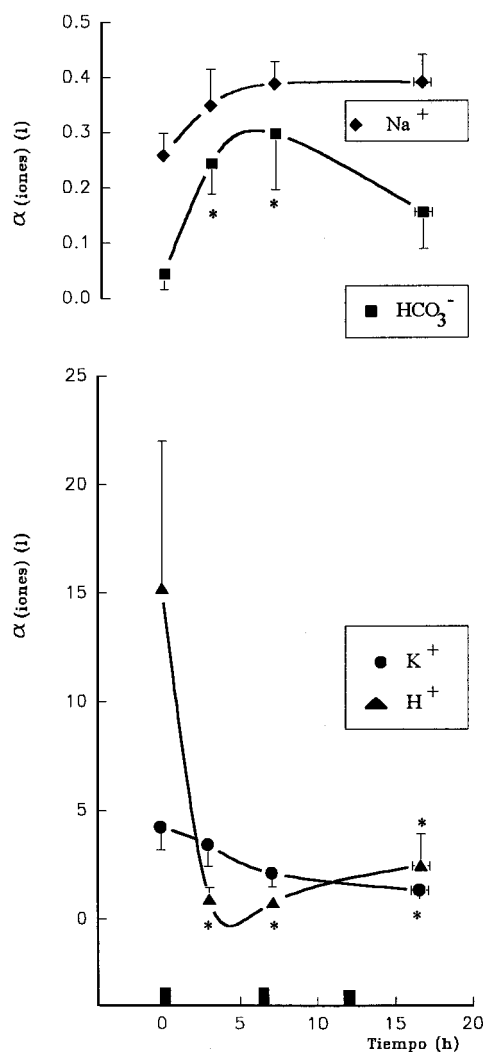
Así, tras la administración de la dosis única de 0.29 mg/kg, en sujetos que no guardaban ayuno y en los que se controló simultáneamente la orina, sólo se observó un incremento significativo en la  $pO_2$  en sangre venosa, mientras que en las demás variables sanguíneas no se vieron cambios significativos; si bien, conviene reseñar una tendencia a la disminución en la concentración de los distintos iones en plasma, entre ellos el  $K^+$ .

En los experimento con dosis múltiple -no ayuno-, se hace evidente la tendencia a la caída en la  $[stdHCO_3^-]_{sv}$  (concentración de bicarbonato estándar en el plasma de la sangre venosa), que no se acompañó de una caída importante de  $pH_v$  ya que fue contrarrestada con una disminución en la  $p_vCO_2$  plasmática. Dicha tendencia a la caída

VARIABLES	DOSIS DE AMILORIDE								S.E. P<0.05
	20 mg, no ayuno			3 x 20 mg, no ayuno		20 mg, ayuno		60 mg, ayuno	
Tiempo	0 h	3 h	7 h	0 h	18 h	0 h	4 h	5 h	
[Na <sup>+</sup> ] (mmol l <sup>-1</sup> )	138.2 ±3.8	136.7 ±2.0	135.9 ±2.1	133.7 ±2.8	130.7 ±2.6	147.7 ±1.8	147.9 ±1.8	143.2 ±2.8	q
[K <sup>+</sup> ] (mmol l <sup>-1</sup> )	4.3 ±0.6	4.0 ±0.7	3.6 ±0.7	3.8 ±0.4	3.9 ±0.3	4.0 ±0.2	4.2 ±0.2	4.3 ±0.3	
[Cl <sup>-</sup> ] (mmol l <sup>-1</sup> )	111.6 ±2.2	108.9 ±1.2	108.4 ±1.3	98.3 ±10.2	91.6 ±3.6	104.5 ±1.5	104.7 ±1.6	108.2 ±4.2	p r
pH	7.36 ±0.02	7.38 ±0.02	7.37± 0.02	7.34 ±0.05	7.36 ±0.05	7.34 ±0.02	7.31 ±0.02	7.34 ±0.03	d
pCO <sub>2</sub> (mm Hg)	52.4 ±4.7	48.4 ±2.0	53.8 ±12.2	53.4 ±10.2	45.4 ±7.1	49.3 ±5.0	51.9 ±4.0	47.4 ±5.1	
[stdHCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ] (mmol l <sup>-1</sup> )	26.4 ±0.74	26.3 ±0.6	26.3 ±0.6	25.2 ±1.5	23.2 ±2.0	23.7 ±1.0	23.1 ±0.9	23.4 ±1.1	q r
pO <sub>2</sub> (mm Hg)	33.7 ±9.7	41.0 ±10.6	48.3 ±9.7	34.8 ±9.2	43.1 ±17.9	40.9 ±6.6	37.0 ±5.3	51.0 ±6.6	b e

**Tabla II.-** Curso temporal de los efectos fisiológicos inducidos por el amiloride en reposo. Se muestran las variables fisiológicas en relación con el equilibrio ácido-base y el balance hidro-electrolítico, obtenidas en muestras de sangre venosa. Se presentan la  $m \pm D.E.$  b: diferencia estadísticamente significativa ( $p < 0.05$ ) entre los datos de los experimentos con dosis única de 20 mg, sin ayuno, obtenidos a las 0 h y a las 7h de la ingesta del AML. d: Idem entre los datos de los experimentos con dosis única de 20 mg en ayunas -previo a la prueba en el ergómetro de Andersen-, entre las muestras tomadas a las 0 h y las 4 h. e: Idem entre los datos basales del anterior experimento y los obtenidos a las 5 h de la dosis única de 60 mg de AML. p: Idem entre los datos basales del primer y segundo experimento (orden de aparición de la tabla). q: Idem para los datos basales del primer y tercer experimento. r: Idem entre los datos basales del segundo y tercer experimento.

en la  $[\text{stdHCO}_3^-]_{\text{SV}}$  se repite en los experimentos posteriores con ayuno y dosis única de 0.29 y 0.86 mg/kg peso. Conviene reseñar, que únicamente se observó una caída notable y significativa del  $\text{pH}_V$  plasmático en los experimentos con ayuno y dosis única de 20 mg, lo cual fue debido a que el descenso en la  $[\text{stdHCO}_3^-]_{\text{SV}}$  se asoció a un incremento en la  $\text{p}_V\text{CO}_2$  en plasma. Es interesante remarcar que a pesar de la cantidad considerable de mmoles de  $\text{HCO}_3^-$  eliminados por el riñón (ver tabla I), la  $[\text{stdHCO}_3^-]_{\text{SV}}$  no se modificara apenas, lo que indica la presencia de un mecanismo que restauró las pérdidas, lo que se cuantifica más adelante (ver tabla III y figura 8). En cuanto a los cambios de las concentraciones iónicas en plasma, lo más importante a destacar es la ligerísima tendencia a incrementar de la  $[\text{K}^+]_{\text{SV}}$  en los tres últimos experimentos de la figura 3, a pesar del importante ahorro de potasio inducido por el AML a nivel renal, lo que indicaría la presencia de un mecanismo que retiró del plasma el potasio ahorrado, tal como se detallará mas adelante (ver tabla III y figura 8).



**Figura 7** .- Valores para los distintos iones de la relación  $(V_{\text{OI}} \times \text{Ox})/P_x$ . Símbolos gráficos y estadísticos como en la figura 5. Para mayor explicación ver texto.

Por lo datos presentados en la figura 2, resulta evidente que se dieron cambios en la cantidad total de iones excretados (siendo éstas calculadas según la fórmula:  $E_x = V_{or} \times O_x$  donde  $V_{or}$ : volumen de orina y  $O_x$ : concentración de cada sustancia en la orina). No obstante, también se vio que dichos cambios en la excreción se asociaron a ligeras modificaciones en la concentración plasmática de los iones correspondientes ( $P_x$ ). Resulta interesante detenerse a valorar la relación entre la  $E_x$  y la  $P_x$  o de otro modo:

$$V_{or} \times \frac{O_x}{P_x} \quad (\text{ver figura 7}).$$

Puesto que  $E_x = V_{or} \times O_x = TFG_x \times P_x + T_x$  (donde  $TFG_x$  es la tasa de filtración glomerular para cada sustancia y  $T_x$  es el transporte neto a nivel tubular), los datos presentados en la figura 7 equivalen a la suma de la tasa de filtración glomerular para cada sustancia y el valor resultante de dividir el transporte neto a nivel tubular ( $T_x$ ) por la concentración plasmática de la misma - $TFG_x + (T_x/P_x)$ -, que es dimensionalmente equivalente al aclaramiento plasmático y que aquí se representa con el símbolo  $\alpha$ ,

Dado que el AML no parece afectar de forma importante a la  $TFG_x$  de los distintos iones (Weiner, 1990), ni los valores de  $P_x$  (al menos en nuestros datos), el estudio de dicha relación es interesante, ya que los cambios observados en ella se deberían principalmente a cambios en el  $T_x$ ; así, un incremento en la relación supondría un aumento en el transporte tubular neto (por activación de los procesos de secreción o por inhibición de la reabsorción), mientras que un decremento de la relación supondría un descenso en  $T_x$  (por disminución en la secreción o por aumento en la reabsorción). En éste sentido, la figura 7 indica claramente la presencia de incrementos en los valores de transporte tubular neto de  $Na^+$  y  $HCO_3^-$ , mientras que disminuyen los de  $K^+$  e  $H^+$ . Por otro lado, la relación indica la importancia de la excreción renal frente a los niveles plasmáticos de cada uno de los iones estudiados. En este sentido resulta interesante comparar las figuras 2 y 4, tras lo cual se puede observar que, aunque los cambios cuantitativos más importantes en la excreción renal fueron los de  $Na^+$ , los cambios de la  $\alpha(Na^+)$  fueron similares a los de  $\alpha(HCO_3^-)$ , siendo éstos a su vez, claramente inferiores a los cambios de  $\alpha(K^+)$  y especialmente de  $\alpha(H^+)$ ; por tanto, a pesar de que los cambios cuantitativos en la excreción de  $H^+$  no fueron importantes, vemos como éstos si lo son cuando los referimos al medio interno, es decir cuando hablamos de  $\alpha(H^+)$ . Visto de otro modo, para que se den pequeños cambios en la excreción final de  $H^+$  se tienen que dar cambios importantes en el  $T_x$ .

Para cuantificar mejor la importancia sistémica de los cambios producidos a nivel renal por el AML, se han considerado los cambios observados o medidos en el compartimento plasmático ( $O_{P_x}$ ) y se han comparado éstos con la estimación de las modificaciones inducidas por el amiloride ( $E_{P_x}$ ).

Variables	EXPERIMENTOS DOSIS ÚNICA (7 HORAS)					EXPERIMENTOS DOSIS MÚLTIPLE (18 HORAS)				
	Na <sup>+</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	K <sup>+</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	H <sup>+</sup> (mol l <sup>-1</sup> )	pH	Na <sup>+</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	K <sup>+</sup> (mmol l <sup>-1</sup> )	H <sup>+</sup> (mol l <sup>-1</sup> )	pH
O <sub>PX</sub>	135.9	26.3	3.6	4.3 <sup>-8</sup>	7.37	130.7	23.2	3.9	4.4 <sup>-8</sup>	7.36
E <sub>PX</sub>	122.9	23.2	7.7	4.1 <sup>-7</sup>	6.38	108.2	20.1	14.3	7.8 <sup>-7</sup>	6.10
O <sub>PX</sub> -E <sub>PX</sub>	+13.0	+3.1	-4.1	-3.7 <sup>-7</sup>	+0.99	+22.5	+3.1	-10.4	-7.4 <sup>-7</sup>	+1.26
	Na <sup>+</sup> (%)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	K <sup>+</sup> (%)	H <sup>+</sup> (%)	pH (%)	Na <sup>+</sup> (%)	HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (%)	K <sup>+</sup> (%)	H <sup>+</sup> (%)	pH (%)
ΔO <sub>PX</sub>	-1.7	-0.4	-16.3	-2.3	+0.13	-2.2	-7.9	+2.6	-4.5	+0.27
ΔE <sub>PX</sub>	-11.0	-12.1	+79.1	+850.9	-9.6	-19.1	-20.4	+277.4	+1625.2	-16.8
ΔO <sub>PX</sub> -E <sub>PX</sub>	+9.3	+11.7	-95.4	-853.1	+9.7	+16.9	+12.5	-274.4	-1629.7	+17.1

**TABLA III.**- Cuantificación de los cambios inducidos en el compartimento plasmático y de los cambios estimados, secundarios a los efectos del amiloride a nivel renal. Además se presenta la diferencia entre ambos, que expresa la compensación a nivel sistémico, de los cambios inducidos por el amiloride. Por tanto, se comparan los valores absolutos de las concentraciones plasmáticas medidas (O<sub>PX</sub>), estimadas (E<sub>PX</sub>) y la diferencia entre ambas (O<sub>PX</sub>-E<sub>PX</sub>). Los valores estimados se calcularon asumiendo un volumen plasmático de 3.5 l y tomando los correspondientes valores de las tablas I y II. Por otro lado, se presentan los valores de los incrementos porcentuales con respecto a los niveles basales, tanto de los valores observados (ΔO<sub>PX</sub>), de los estimados (ΔE<sub>PX</sub>), como de la diferencia entre ambos (ΔO<sub>PX</sub> - E<sub>PX</sub>). Los símbolos indican la pérdida (-) o ganancia (+) de un determinado ion en el compartimento plasmático. Ver el texto para mayor explicación.

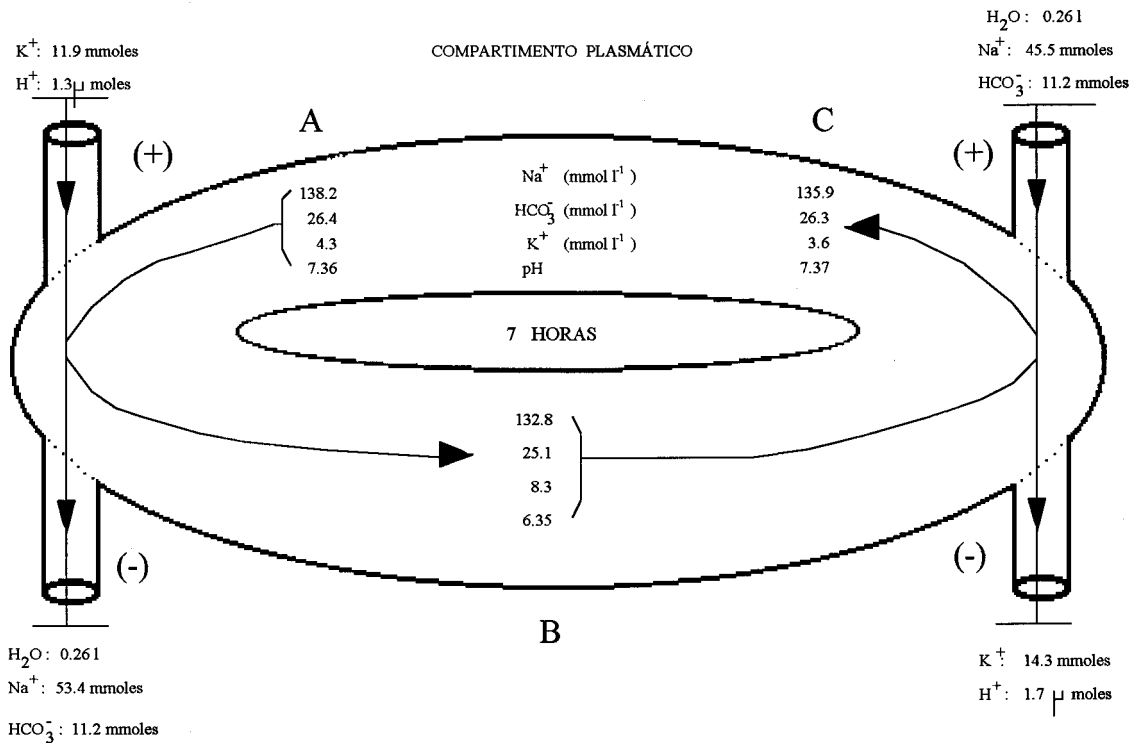
En la tabla III, se presentan los datos absolutos y relativos de los cálculos realizados, pero sólo se presentan los cambios observados y estimados a las 7 h de los experimentos con dieta habitual y dosis única de 20 mg, así como a las 18 h de los experimentos con dieta habitual y dosis múltiple. Para simplificar los cálculos, se ha considerado un volumen fijo de 3.5 litros para el compartimento plasmático y que éste es un compartimento cerrado y sin mecanismos de corrección que contrarresten los diferentes desequilibrios; a partir de lo cual, se han estimado los cambios que inducirían las pérdidas o ganancias de iones, medidas a nivel renal y reseñadas en la tabla I.

Comparando los valores de los cambios observados a nivel plasmático con respecto a los estimados, se puede ver que los cambios estimados son claramente superiores a los observados, lo que indica la existencia de mecanismos sistémicos que regulan de forma precisa los niveles plasmáticos de los distintos iones, contrarrestando los cambios previsiblemente inducidos por el AML. Por tanto, al calcular la diferencia entre "lo medido y lo estimado" a nivel plasmático podemos cuantificar la tasa de compensación llevada a cabo por parte de dichos mecanismos, lo cual se presenta en la tabla III en valores absolutos y relativos. En la primera parte de la tabla se presentan los valores absolutos de los cambios en las concentraciones plasmáticas medidas, estimadas y las diferencias entre ambas. Tomemos como ejemplo el caso del  $\text{Na}^+$  a las 7 h de la ingesta de 20 mg de AML: ya que se observó una concentración de  $135.9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  cuando los cambios a nivel renal hubiesen generado una concentración de  $122.9 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , resulta evidente que algún mecanismo compensador a nivel sistémico ha repuesto  $13 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a nivel plasmático. En la segunda parte de la tabla, se presentan los incrementos porcentuales de las concentraciones plasmáticas de los distintos iones con respecto a los valores basales, tanto de las concentraciones medidas como de las estimadas, así como el valor porcentual de la compensación sistémica de los cambios estimados. Tomando los mismos valores de  $\text{Na}^+$  como ejemplo, se observa que la pérdida a nivel renal hubiese reducido la concentración plasmática basal de  $\text{Na}^+$  en un 11% pero sólo fue reducida en un 1.7% luego los mecanismos reguladores del nivel de  $\text{Na}^+$  plasmático realizan una compensación del 9.3%, casi el total de las pérdidas renales inducidas por el AML. El orden de importancia en las compensaciones en valores absolutos fue  $\text{Na}^+ > \text{K}^+ > \text{HCO}_3^- \gg \text{H}^+$ , mientras que el de las compensaciones en valores relativos fue  $\text{H}^+ \gg \text{K}^+ \gg \text{Na}^+ \approx \text{HCO}_3^-$ , siendo el  $\text{H}^+$  y el  $\text{K}^+$  extraídos del compartimento plasmático y el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{HCO}_3^-$  repuestos en el mismo compartimento. Los cambios de pH también están indicados y son importantes, especialmente en términos relativos, al igual que los de  $\text{H}^+$ .

En la tabla III, sólo se trabajó con las concentraciones y las cantidades totales de iones en plasma y orina, pero no se debe olvidar que el uso de amiloride indujo cambios

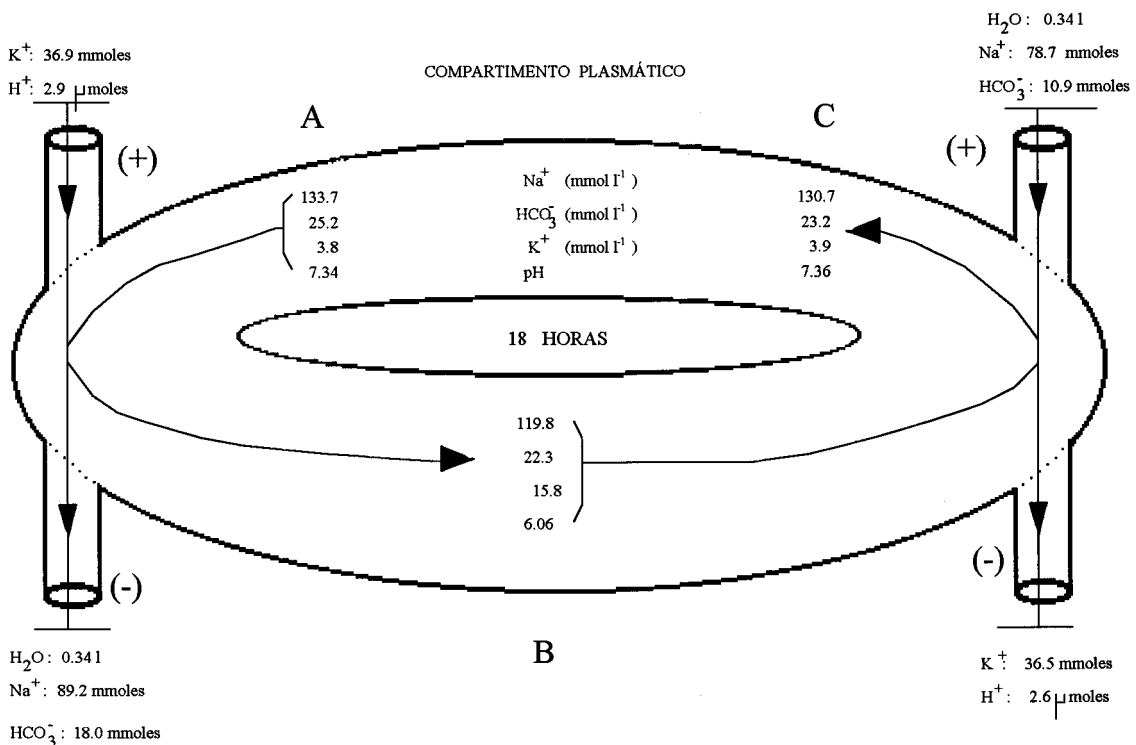
INTERCAMBIO RENAL

INTERCAMBIO SISTÉMICO



INTERCAMBIO RENAL

INTERCAMBIO SISTÉMICO



**Figura 8** - Modificaciones en el pH y movimientos hidro-electrolíticos en el compartimento plasmático tras las ingesta de AML. Se asume un volumen inicial de 3.5 l para el compartimento plasmático y se comparan los cambios medidos (comparar punto basal -A- con punto final -C-) con los cambios estimados ( punto intermedio -B-) para cada una de las variables. Con el signo (+) se indican ingresos hacia el compartimento plasmático y con el signo (-) se indican los egresos desde el mismo.

moderados en la diuresis. En la aproximación que se ha hecho arriba, se consideró un volumen plasmático constante (3.5 l); es decir, que en todo momento la pérdida de agua a nivel renal fue repuesta a nivel plasmático. En la figura 8 se presentan los mismos datos si se hubiesen considerado las pérdidas renales de agua disminuyendo directamente el volumen plasmático, con lo que éste descendería 260 ml a las 7 h y 340 ml a las 14 h, que hubiese supuesto un descenso del 7.4% y 9.7% respectivamente. Por tanto, cabría esperar un incremento de similar rango en las concentraciones plasmáticas estimadas.

Tal como se ve al comparar los datos de la figura 8 y de la tabla III, los movimientos de agua serían importantes en la compensación de los cambios de las concentraciones plasmáticas estimadas de los distintos iones, aunque no las explicarían totalmente. La hemoconcentración inducida por la pérdida renal de agua preservaría parcialmente las concentraciones plasmáticas de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  a pesar de las pérdidas renales, con lo que la cantidad a reponer a nivel sistémico sería menor que la presentada en la tabla III; pero por contra, incrementaría las concentraciones plasmáticas estimadas de  $\text{H}^+$  y  $\text{K}^+$ , requiriéndose en éste caso una mayor participación de los mecanismos que retiran del plasma dichos iones. No obstante, en nuestros experimentos no se han observado cambios importantes en el valor hematócrito ni en la concentración plasmática de Hb total en las muestras de sangre venosa, por lo que no hay indicios de hemoconcentración o hemodilución tras el uso de AML en dicho territorio. Esto parece indicar que el volumen plasmático se restituyó a pesar de la pérdida renal de líquidos. Asumiendo que la reposición de líquidos perdidos a nivel renal se hace a expensas de otros territorios, la cantidad final de iones a reponer o retirar para que se alcanzaran las concentraciones plasmáticas observadas no sería diferente de las calculadas en la tabla III, a pesar de la previsible infraestimación de las concentraciones plasmáticas de los iones a la salida del territorio renal.

En la figura 8 también se muestran los cambios en el pH, que siguen una evolución similar a lo antes expuesto, observándose la restitución de los valores basales a pesar de los cambios inducidos a nivel renal por el AML.

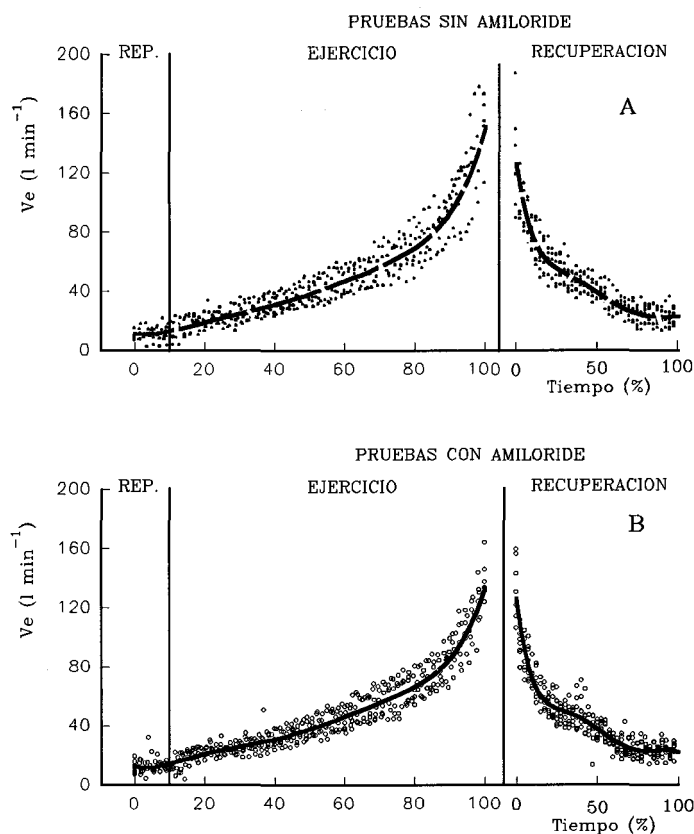




## 2.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ durante el ejercicio y la recuperación.

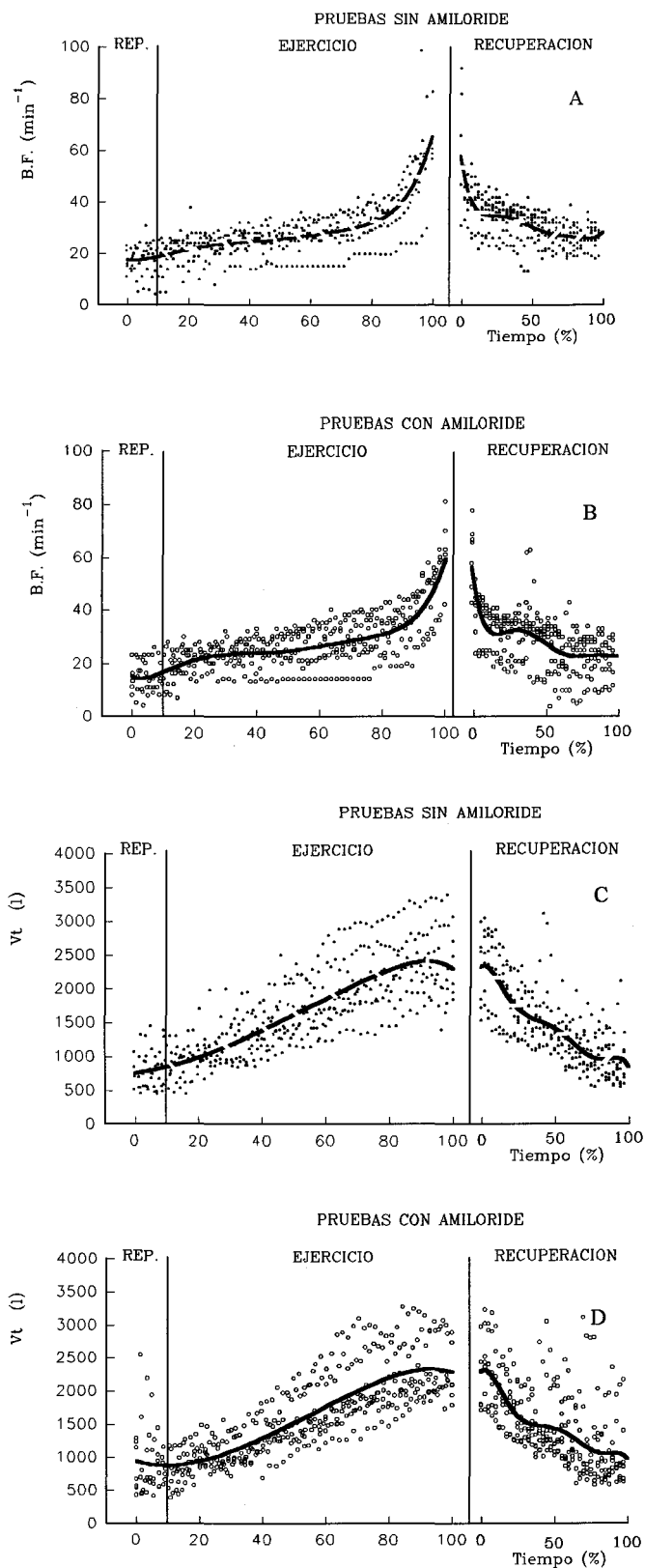
### 2.1.-Pruebas máximas progresivas en cicloergómetro:

No se observaron diferencias significativas en la duración de las distintas pruebas máximas progresivas realizadas en cicloergómetro, que fueron de  $13.03 \pm 2.6$  min en los casos controles y de  $12.82 \pm 2.4$  min tras la ingesta de amiloride (dosis total de 0.86 mg/kg, repartidos en tres dosis de 0.29 mg/kg cada 6 horas). La potencia máxima desarrollada fue de  $243 \pm 45$  vatios, tanto en situación control como tras la ingesta de amiloride.



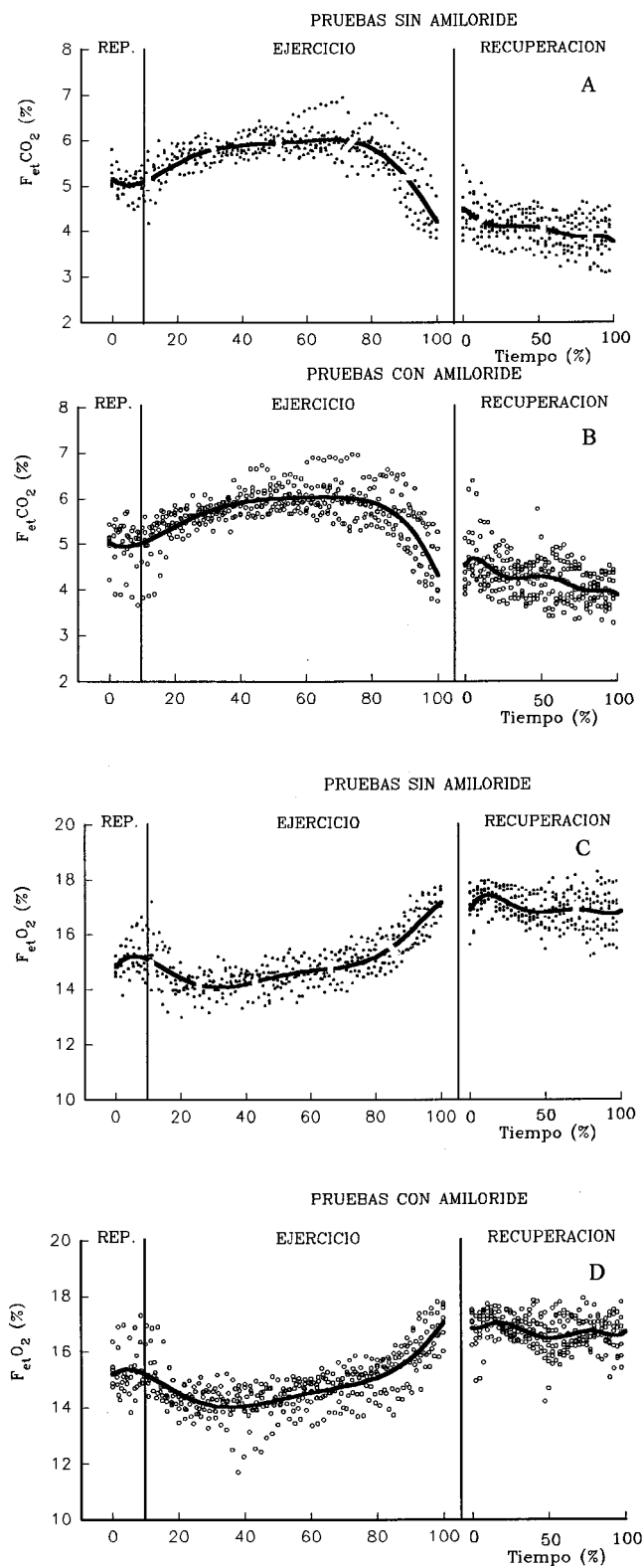
**Figura 9.-** Curso temporal de la ventilación minuto ( $V_e$ ) durante las pruebas máximas progresivas. En A, se representa la nube de puntos de los valores medios, obtenidos cada 15 segundos, en cada una de las pruebas realizadas por los distintos sujetos experimentales en situación control ( $\bullet$ ), representándose la curva de regresión con una línea discontinua. En B, se representa la nube de puntos de los valores medios obtenidos cada 15 segundos en cada una de las pruebas de los mismos sujetos experimentales tras la ingesta de amiloride ( $\circ$ ), representándose la curva de regresión con una línea continua. En las curvas de regresión representadas se aceptó una  $r \geq 0.90$ .

Tal como se muestra en la figura 9, no se observaron diferencias en la respuesta ventilatoria tras la ingesta de AML. Así mismo, la evolución del patrón ventilatorio no se modificó tras la ingesta de amiloride. Como se puede observar en la figura 10, ni la frecuencia respiratoria, ni el volumen tidal cambiaron tras el uso de amiloride durante las pruebas máximas progresivas.



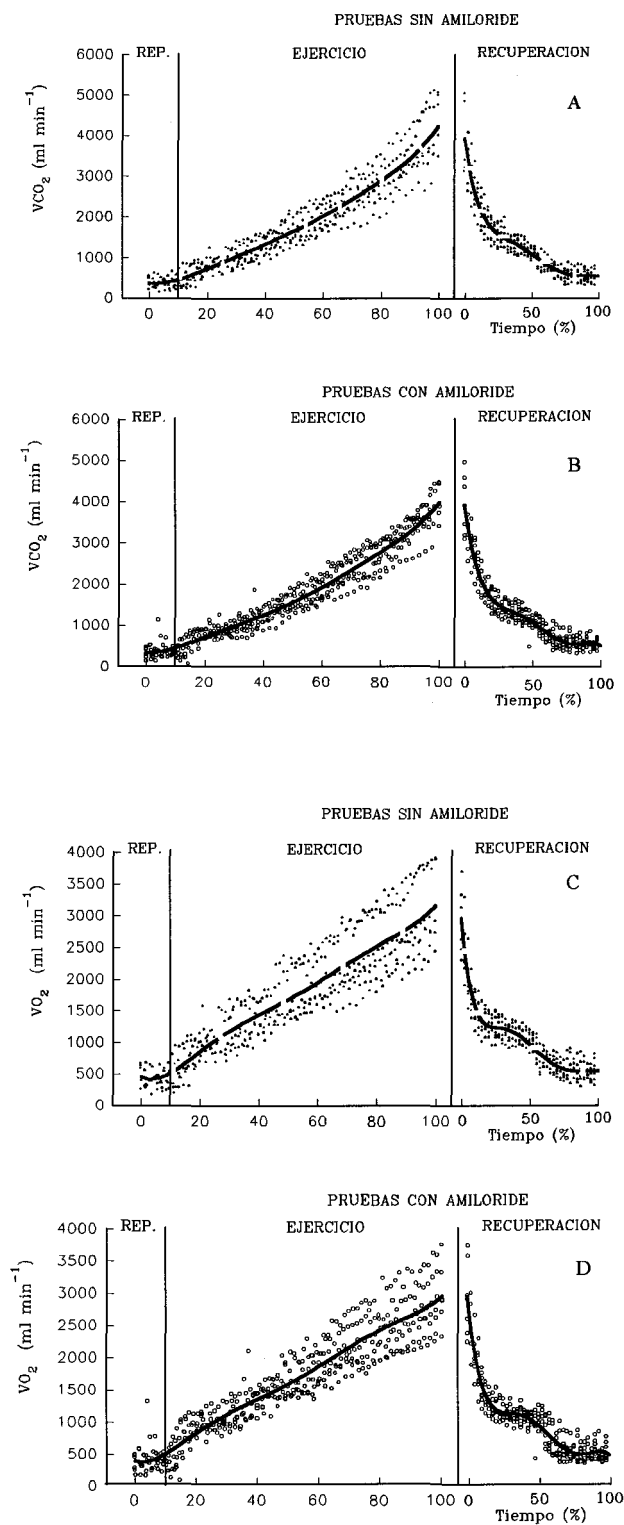
**Figura 10.-** Curso temporal del patrón ventilatorio a lo largo de las pruebas máximas progresivas. En A y C se representan la frecuencia respiratoria y el volumen tidal en situación control. En B y D se representan las mismas variables tras la ingesta de amiloride. Resto como en la figura 9.

La evolución de las fracciones de oxígeno y dióxido de carbono en el gas ventilado durante la prueba, no se modificó con el uso de amiloride (ver figura 11).



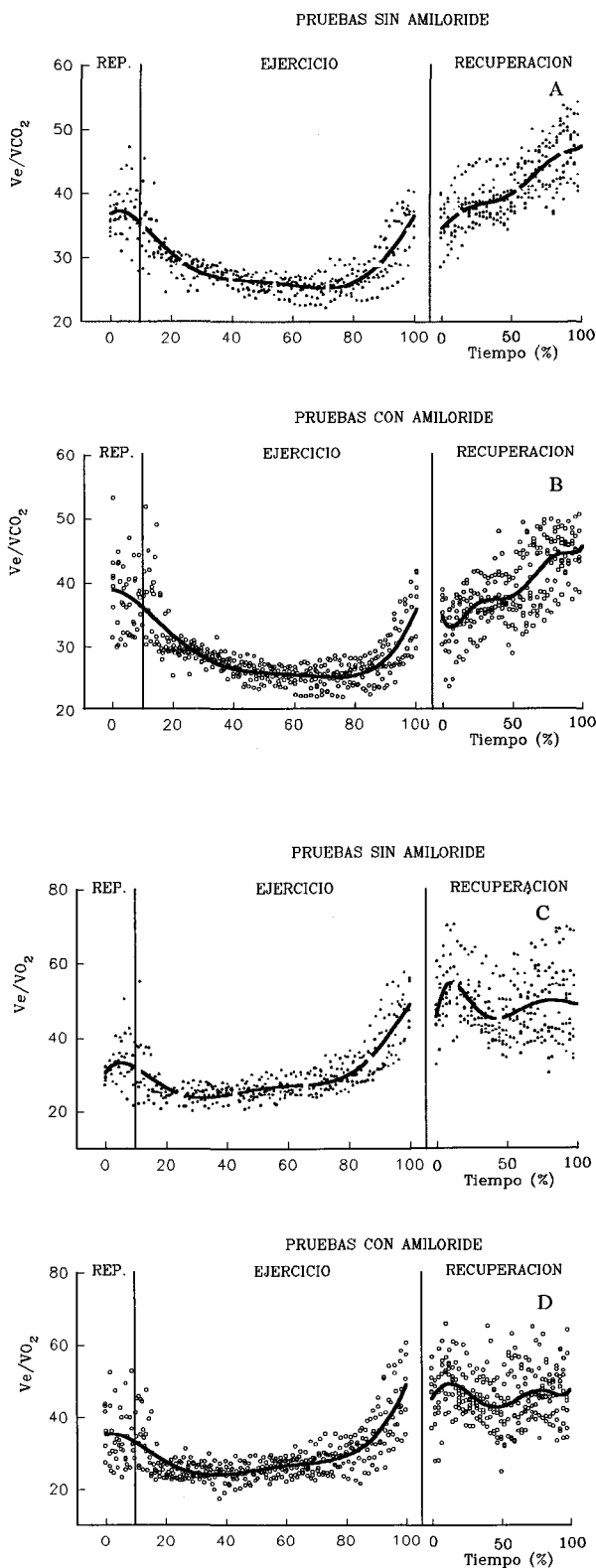
**Figura 11.-** Curso temporal de las fracciones de los gases al final de la espiración. En A y C se representan la fracciones "end tidal" de  $CO_2$  y  $O_2$  respectivamente, en situación control; en B y D, las mismas variables tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en la figura 9.

Por lo que, tampoco se observaron cambios en la respuesta metabólica tras las ingesta de amiloride; así, la evolución del  $\text{VO}_2$  y  $\text{VCO}_2$  a lo largo de la prueba de esfuerzo fue similar en ambas situaciones (ver figura 12).



**Figura 12.-** Curso temporal de la producción de  $\text{CO}_2$  y del consumo de  $\text{O}_2$ . En A y C se representan los valores de  $\text{VCO}_2$  y de  $\text{VO}_2$  respectivamente, en situación control. En B y D se representan las mismas variables tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en la figura 9.

Así mismo, los equivalentes ventilatorios fueron similares en la situación control y tras la ingesta del fármaco (ver figura 13).



**Figura 13.-** Curso temporal de los equivalentes de  $CO_2$  y de  $O_2$ . En A y C se representan los valores del equivalente de  $CO_2$  y del equivalente de  $O_2$  respectivamente, en situación control. En B y D se representan las mismas variables tras la ingesta de amiloride. Resto como en la figura 9.

En la figura 13 también se observa que los umbrales ventilatorios no se modificaron de forma notable tras el uso de amiloride, presentándose el punto de transición o umbral ventilatorio I al 25% del tiempo total de la prueba y el umbral ventilatorio II al 80% del tiempo total de la prueba; siendo estos determinados según los criterios de Skinner y Maclellan (1980).

El resto de variables controladas con el ergoespirómetro computarizado (frecuencia cardíaca, tiempos inspiratorios y espiratorios, etc.), tampoco cambiaron con el uso de AML.

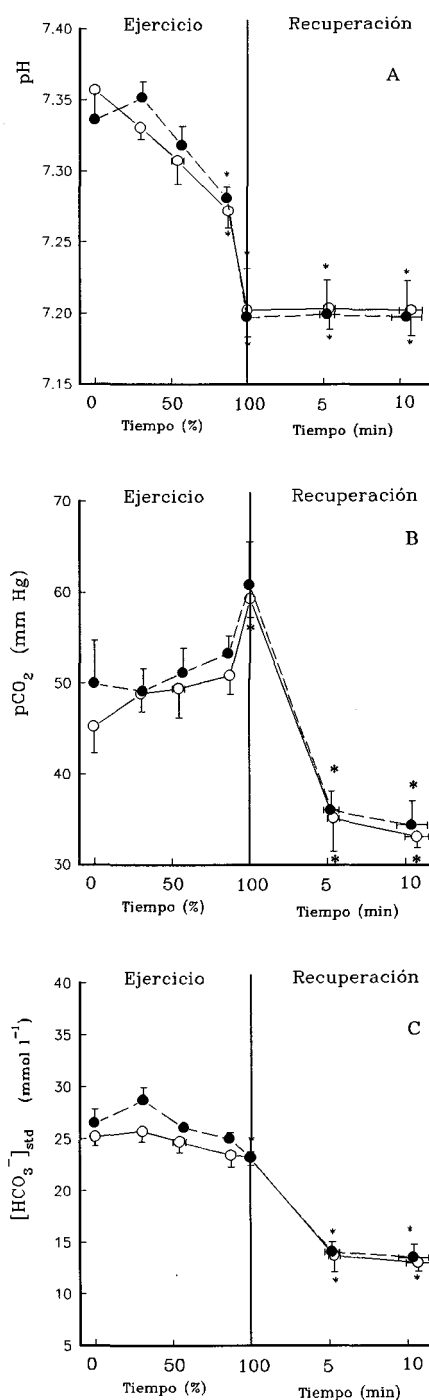
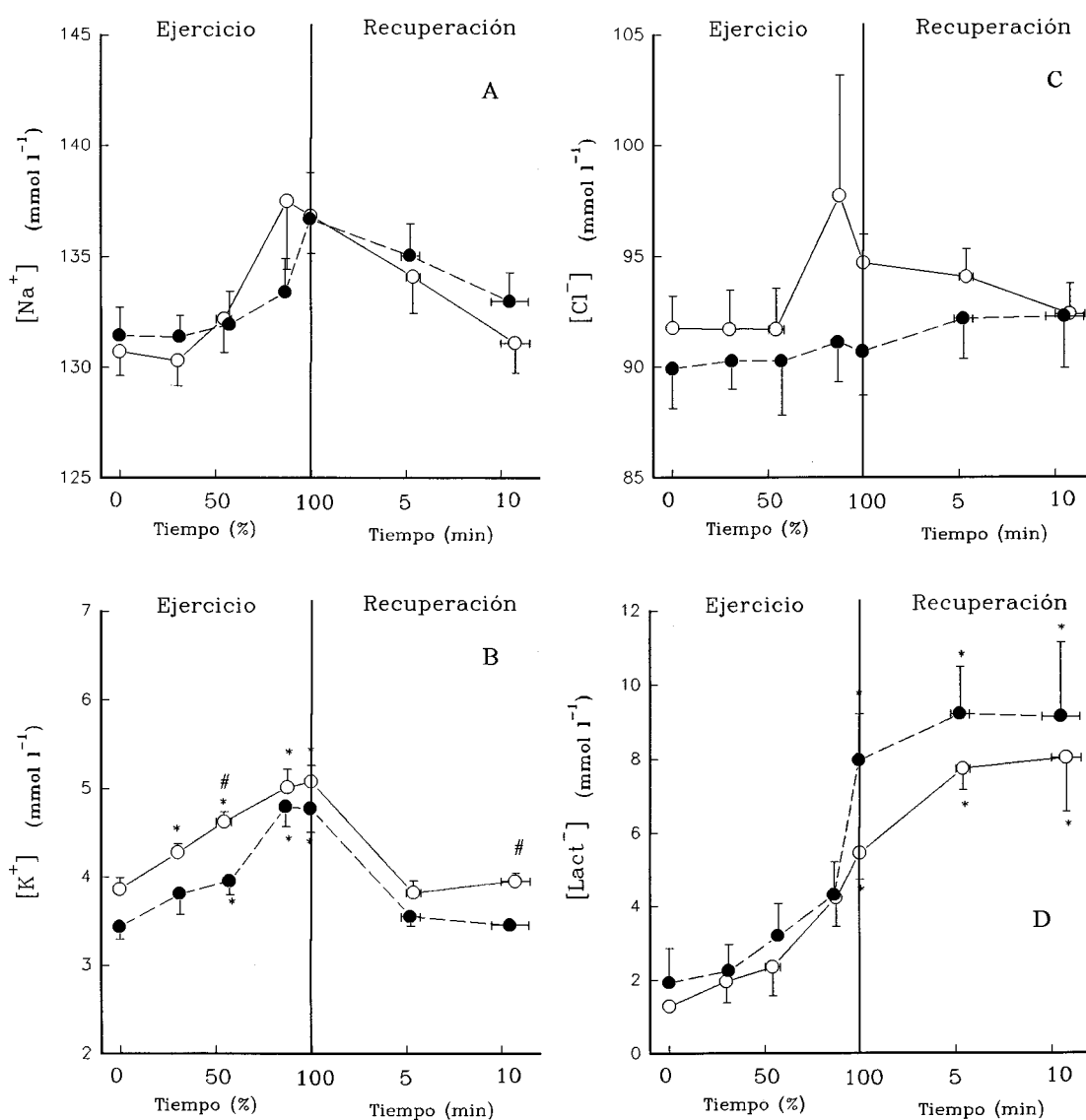


Figura 14.- Curso temporal de los cambios inducidos por el ejercicio en cicloergómetro, sin (●) y con amiloride (○). A: pH; B: pCO<sub>2</sub>; C: [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>std</sub>. (\*: diferencias frente al valor basal, p < 0.05).

En cuanto al equilibrio ácido-base, se puede observar en la figura 14, que el amiloride no indujo cambios importantes respecto a la situación control. Durante el ejercicio se produjo un importante descenso del pH que se mantuvo en los primeros minutos de la recuperación (ver A). Durante la realización del ejercicio se observó un ligero incremento en la  $p\text{CO}_2$ , para decrecer en la fase de recuperación. En consecuencia, la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$  (ver C) se mantuvo estable durante la fase de ejercicio y decreció en la recuperación.

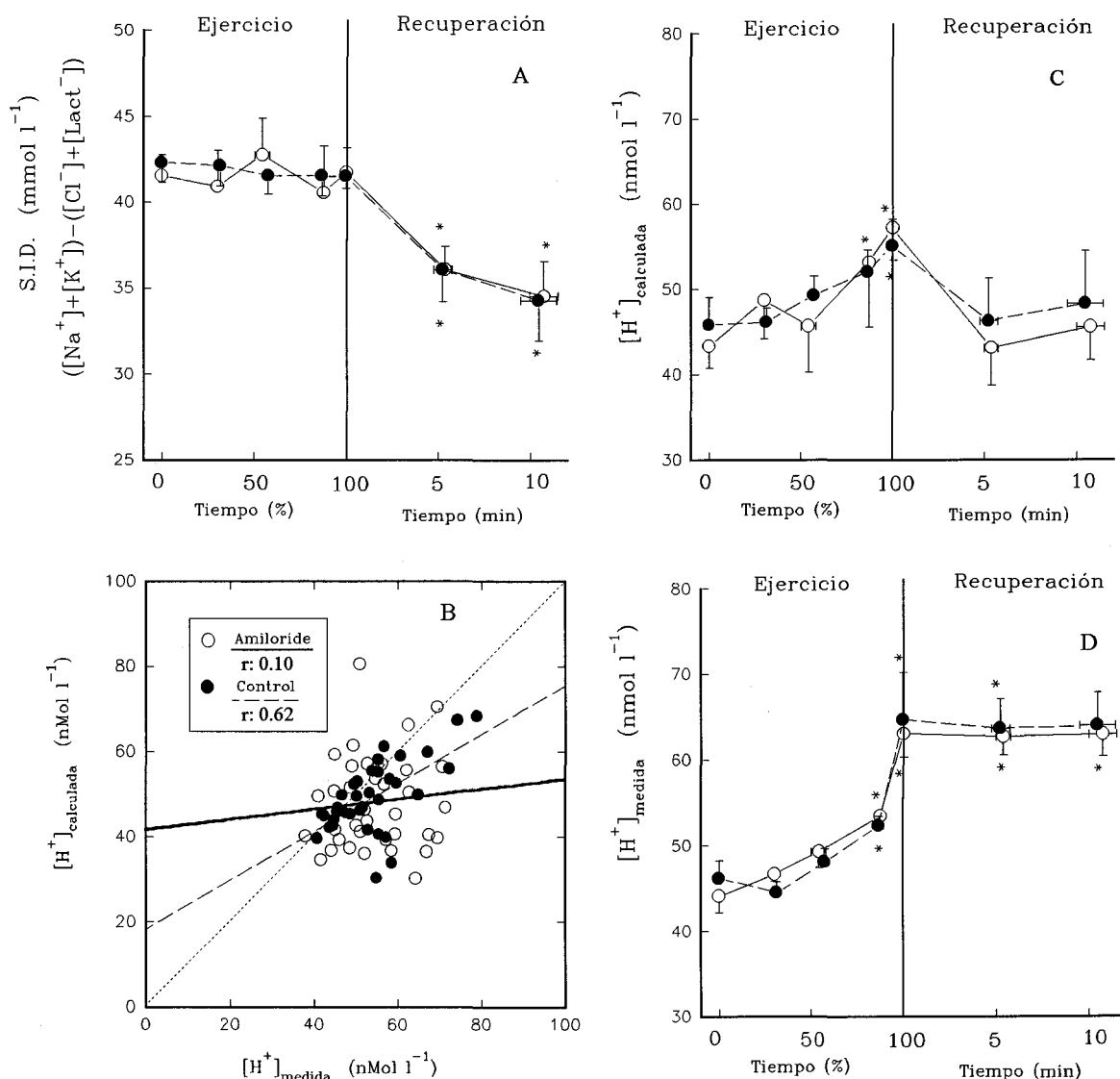
En la figura 15 se representan los cambios en la concentración plasmática de los distintos iones, como se puede observar, el uso de amiloride indujo un incremento en la  $[\text{K}^+]$  en reposo, dicho incremento se mantuvo a lo largo del ejercicio y la recuperación. En el resto de iones estudiados los cambios inducidos por el AML fueron poco importantes y fueron similares a los cambios observados en situación control.



**Figura 15.-** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los iones durante la prueba progresiva en cicloergómetro. En A se muestran los cambios en la  $[\text{Na}^+]$ ; en B se muestran los cambios en la  $[\text{K}^+]$ ; en C los cambios en la  $[\text{Cl}^-]$  y en D los de la  $[\text{Lact}^-]$ . Símbolos como en figura 14. (\*: diferencias respecto al valor basal. #: Idem respecto al valor previo.  $p < 0.05$ )

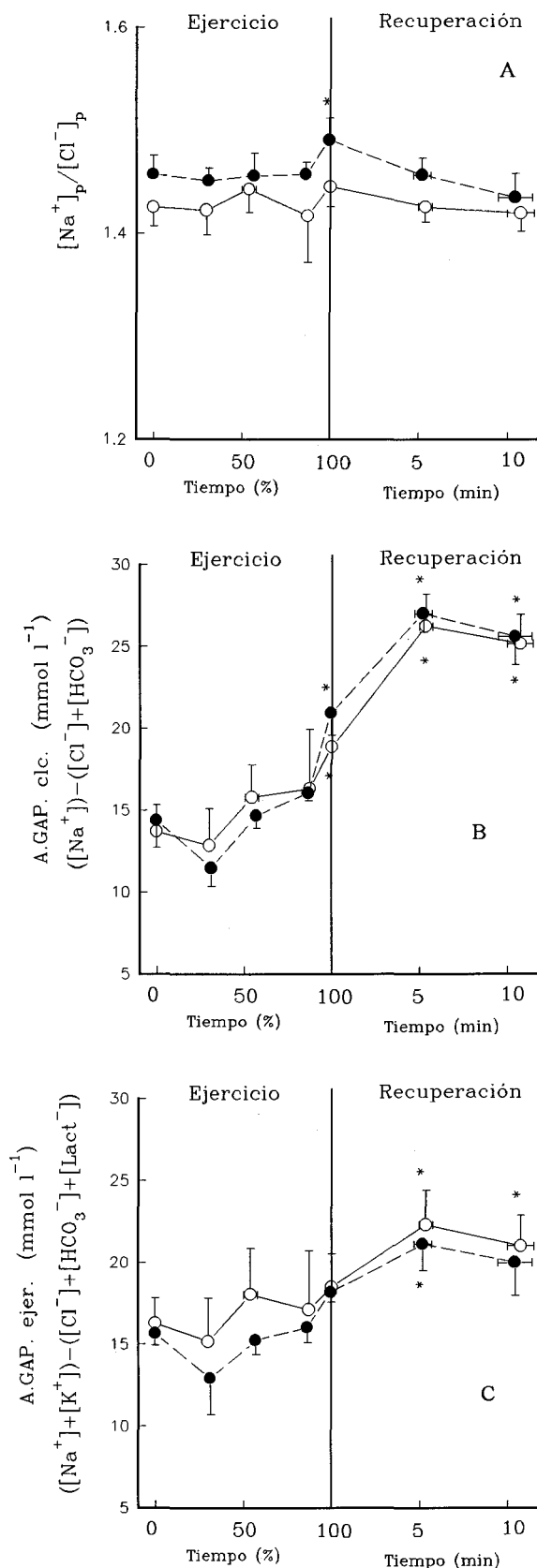
La  $[\text{Lact}^-]$  presenta una subida importante al final del ejercicio y continúa subiendo en la fase de recuperación; mientras que el resto de iones estudiados presentan una subida durante el esfuerzo para volver a los niveles de reposo durante la recuperación.

La figura 16 muestra los datos obtenidos al aplicar el algoritmo de Stewart para el estudio del equilibrio ácido-base (ver Material y Métodos). La S.I.D. se mantuvo sin cambios durante el ejercicio, para descender en la recuperación (ver A). Los valores de la  $[\text{H}^+]$  calculados con la ecuación de Stewart (ver C) fueron siempre infraestimadas, pero durante la fase de ejercicio se acercaron más a los valores de  $[\text{H}^+]$  medidos (ver D) que en la fase de recuperación, donde se observaron valores muy diferentes.



**Figura 16.-** Análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base. En A, se muestra el curso temporal de la SID bajo los efectos del amiloride y en la situación control. En C, la concentración de hidrogeniones calculada a partir del algoritmo de Stewart. En D, la concentración de hidrogeniones medida con el electrodo selectivo de pH. En B, la relación de los valores calculados de  $[\text{H}^+]$  frente a los medidos (Línea continua: con AML, línea discontinua: sin AML, línea de puntos: identidad). Símbolos como en figura 14.

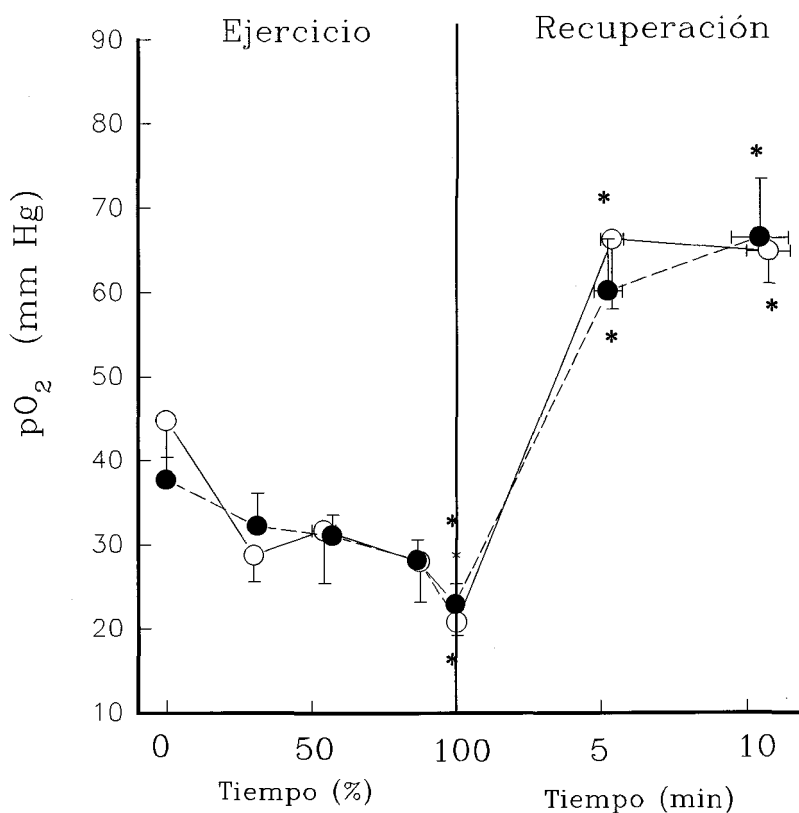




**Figura 17.-** Análisis del balance hidro-electrolítico. En A: relación sodio-cloruro; en B: Curso temporal del "anion gap" usando la fórmula habitual en la práctica clínica. En C: Curso temporal del "anion gap" usando los fórmula propuesta por Medbo y Sejersted (1985), a partir de cinco iones. Símbolos como en la figura 14.

Además, tal como se muestra en la figura 17, se estudió la evolución de la relación sodio-cloruro que se mantuvo prácticamente constante a lo largo del ejercicio, con valores algo menores para los sujetos con AML. Por otro lado, el "anion gap" estudiado a partir de la fórmula de tres iones presenta cambios más importantes que los observados cuando se usa la fórmula de cinco iones, propuesta por Medbø y Sejersted (1985). En ambos casos se muestra una ligera subida, para incrementar de forma importante durante la recuperación.

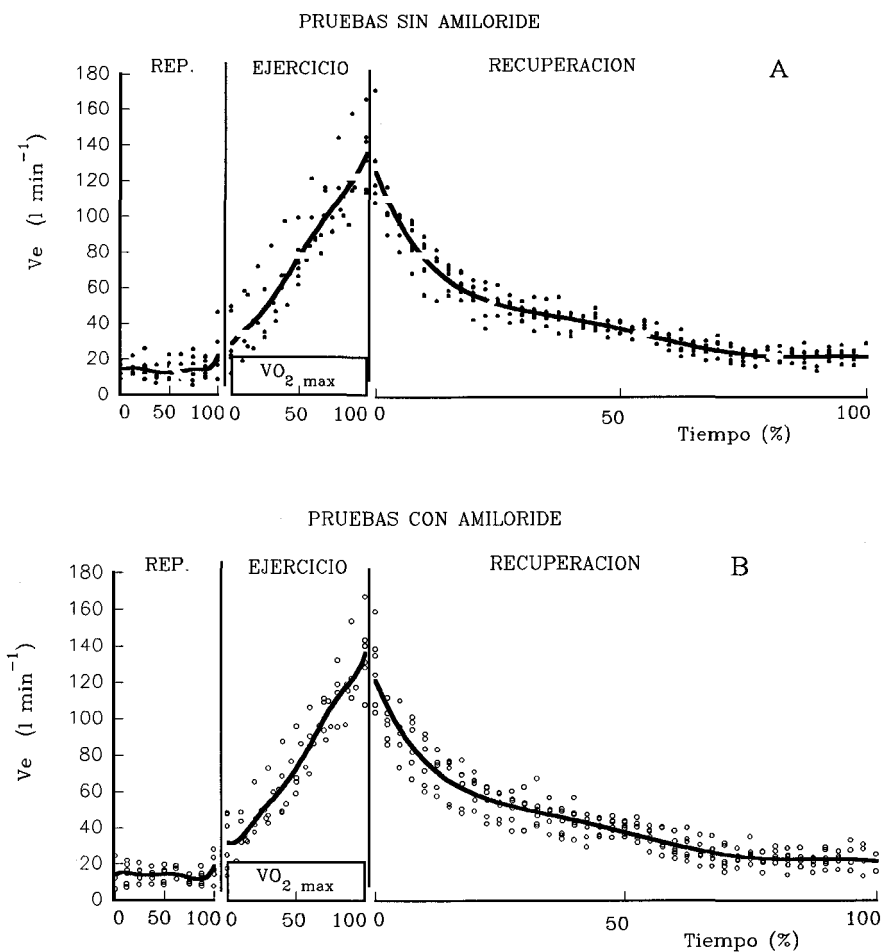
Finalmente, los cambios inducidos por el AML en la  $pO_2$  se presentan en la figura 18. Si bien se observaron cambios importantes a lo largo de la realización de la prueba, con una caída importante de la  $pO_2$  durante el ejercicio para subir en la fase de recuperación muy por encima de los valores basales; no se vio que el amiloride indujera cambios importantes.



**Figura 18.-** Curso temporal de la  $pO_2$  durante la prueba progresiva en cicloergómetro. Símbolos como en figura 14.

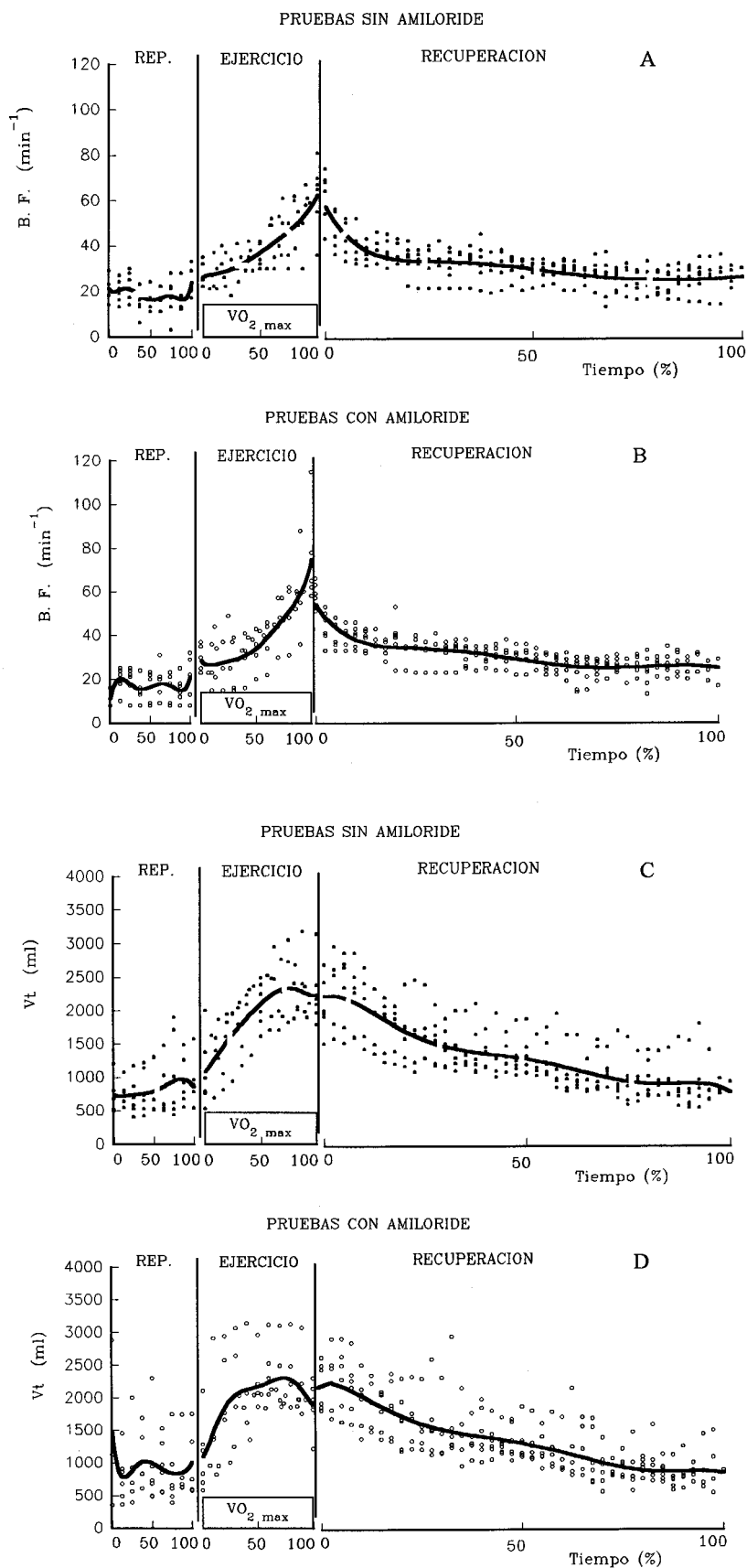
## 2.2.- Pruebas a potencia constante en cicloergómetro:

La duración media del test fue de  $2.83 \pm 0.9$  min en situación control y de  $2.75 \pm 0.7$  min tras la ingesta de amiloride (dosis única de 0.86 mg/kg de peso, sin control de la dieta). En estas pruebas se solicitó el desarrollo de la potencia máxima alcanzada en las pruebas máximas progresivas realizadas con anterioridad, que en este grupo fue de 250 watt. La respuesta ventilatoria fue la habitual en este tipo de pruebas, siendo similar en ambas situaciones experimentales (ver figura 19)



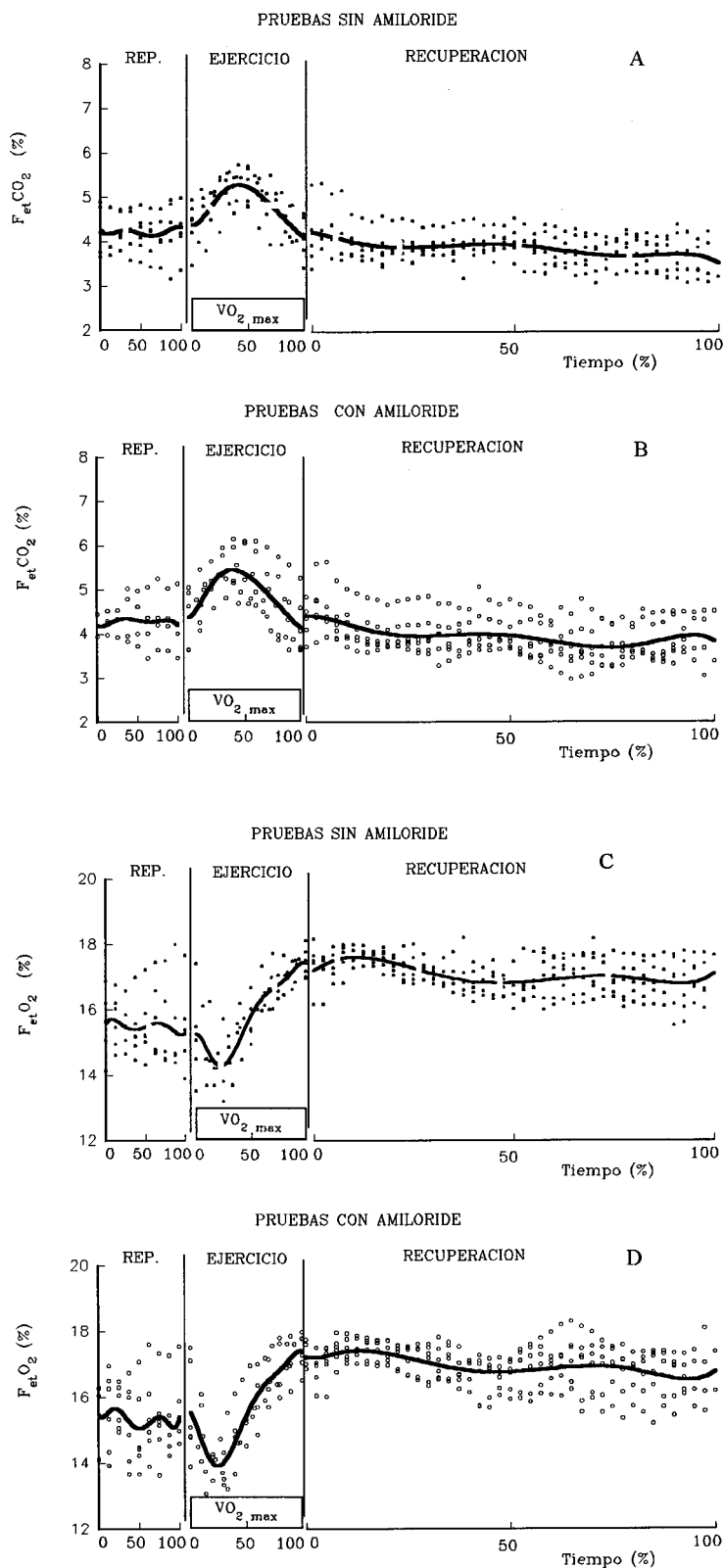
**Figura 19.-** Curso temporal de la ventilación minuto durante las pruebas a potencia constante. En A, se representa la situación control y en B tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en la figura 9.

Como se puede ver en la figura 20, la evolución del patrón ventilatorio de igual modo, fue la habitual para este tipo de pruebas ergométricas, siendo prácticamente idéntico en la situación control que tras la ingesta de amiloride. Conviene incidir en que tras la ingesta de amiloride, al final del ejercicio, se observa una mayor caída en los volúmenes tidales ( $V_t$ ), pero asociados a frecuencias respiratorias algo más elevadas, por lo que, en todo caso y tal como se vio en la figura 19, la ventilación minuto se mantuvo al mismo nivel en ambas situaciones experimentales.



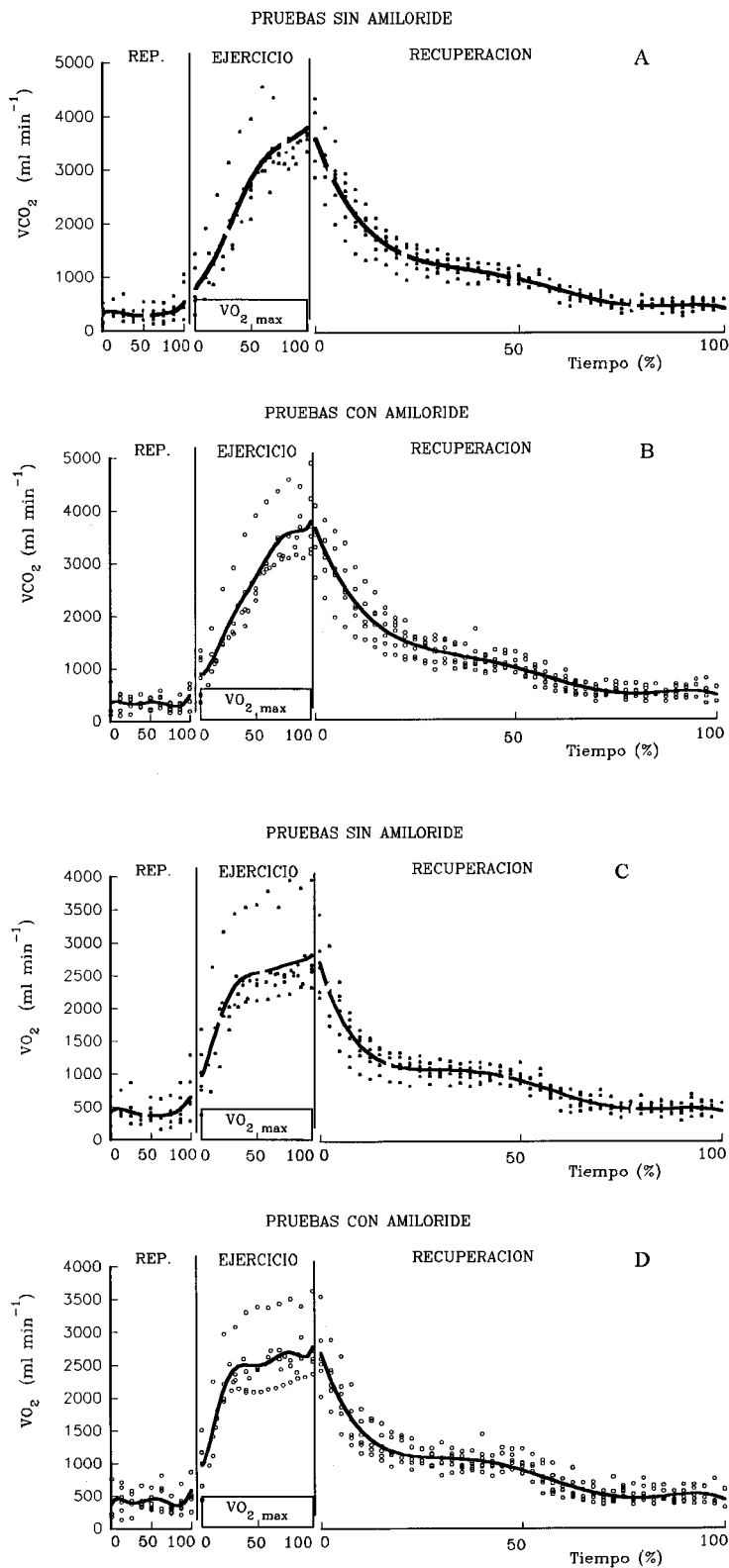
**Figura 20.-** Curso temporal del patrón ventilatorio durante las pruebas a potencia constante. En A y C se representan la frecuencia respiratoria y el volumen tidal en situación control. En B y D se representan las mismas variables tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en la figura 9.

La evolución de las fracciones de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$  en el aire ventilado no sufrieron modificaciones importantes con el uso de amiloride (ver figura 21).



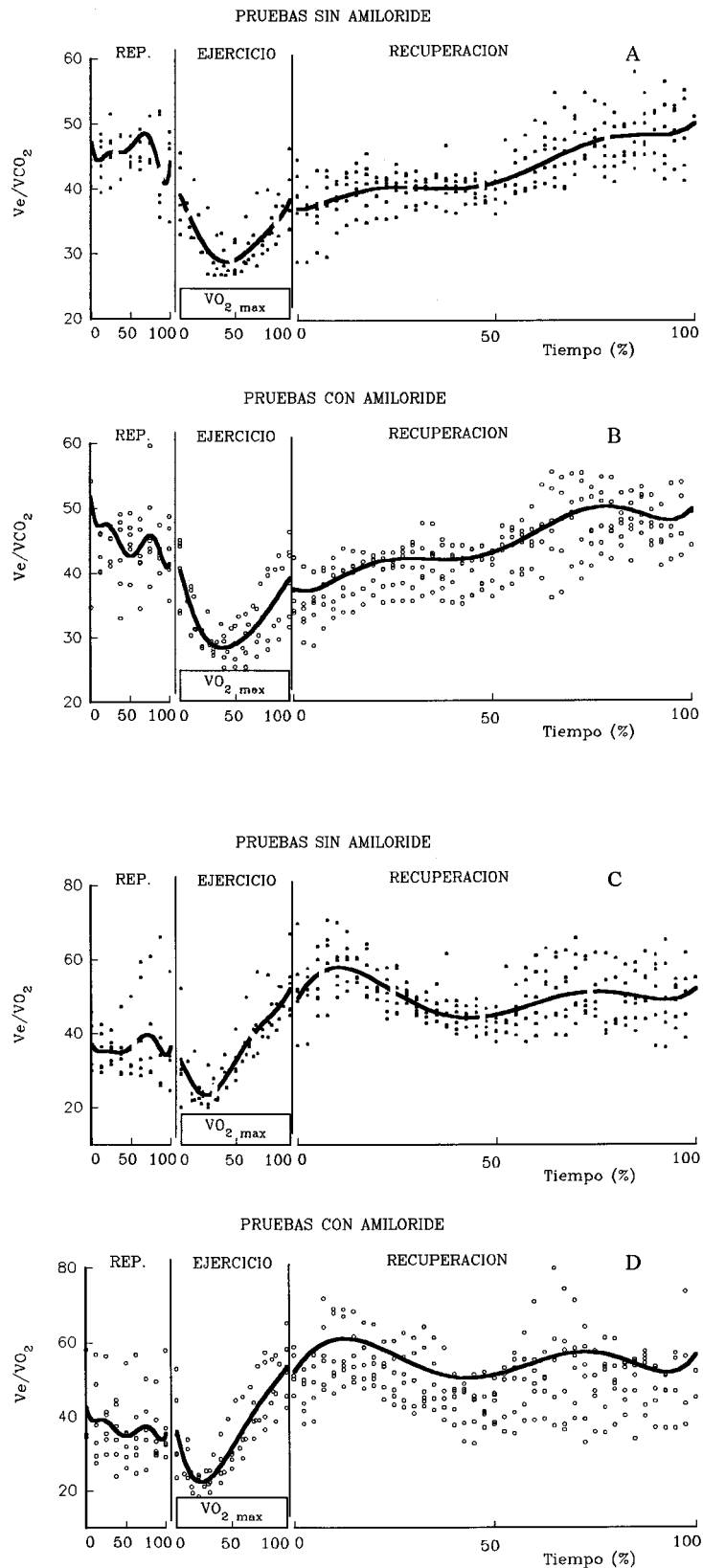
**Figura 21.-** Curso temporal de las fracciones "end tidal" de  $\text{CO}_2$  y  $\text{O}_2$ . En A y C se muestran dichas variables en situación control, siendo representadas en B y D tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en figura 9.

Dada la evolución de las variables antes vistas, era de esperar que no se dieran cambios en la respuesta metabólica tras la ingesta de amiloride, tal como se ve en la figura 22.



**Figura 22.-** Curso temporal de la VCO<sub>2</sub> y del VO<sub>2</sub>. En A y C se muestran dichas variables en situación control, siendo representadas en B y D tras la ingesta de amiloride. Resto igual que en figura 9.

Así mismo, los equivalentes ventilatorios mostraron cursos temporales similares en la situación control y tras la ingesta de amiloride (figura 23).



**Figura 23.-** Curso temporal de los equivalentes de  $CO_2$  y de  $O_2$ . En A y B se muestran dichas variables en situación control, mostrándose en B y D las mismas tras la ingesta de amiloride. Resto como en figura 9.

### 2.3.- Pruebas en el ergómetro de Andersen.

#### 2.3.1.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en el territorio muscular activo.

El grupo que se sometió a las pruebas bajo los efectos del AML (dosis única de 0.86 mg/kg de peso en ayunas) y al que llamaremos AS, fue comparado con los datos de otro grupo control, al que llamaremos CS, que realizó el mismo tipo de experimento, en el mismo laboratorio, pero sin haber ingerido AML. Además, en algunos casos se presentarán datos de algunas de las variables obtenidas del grupo AS cuando *a posteriori* se repitió la prueba en condiciones control, sin amiloride; en las que se observó en todo caso las mismas diferencias que las descritas al comparar AS y CS.

##### 2.3.1.1.- Tiempo de duración de las pruebas.

La duración media de las pruebas previas fue de 4.0 minutos, tiempo al que se intentó ajustar todos ellos, mientras que con el uso de la droga la duración media de los test subió hasta 4.83 minutos. La potencia desarrollada en ambos tipos de test fue la misma, oscilando ente 115 y 130 watt (ver Tabla IV).

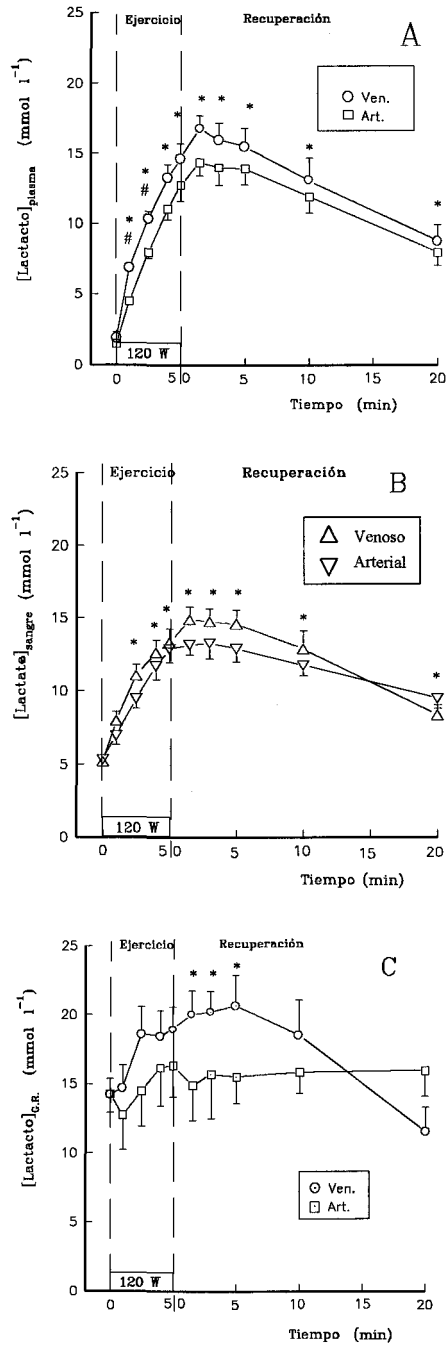
SUJETO	POTENCIA (watt)	TIEMPO PRE-TEST (min)	TIEMPO TEST (min)
1	115	4.16	4.75
2	115	4.00	5.50
3	120	4.16	5.41
4	115	4.16	5.00
5	130	4.33	4.50
6	120	3.10	3.83
<b>Media</b>	<b>119</b>	<b>3.98</b>	<b>4.83 *</b>
<i>D.E.</i>	<i>5.84</i>	<i>0.44</i>	<i>0.62</i>

**TABLA IV.-** Valores individuales y promedios de la potencia desarrollada (en vatios: watt) y de los tiempos de aparición de la fatiga en las pruebas preliminares ( sin uso de la droga: ver columna tiempo pre-test) y en las pruebas tras la ingesta de la droga (ver columna tiempo test). \*: diferencia antes y después de la ingesta de amiloride ( $p < 0.05$ ).



## 2.3.1.2.- Modificaciones del equilibrio ácido-base.

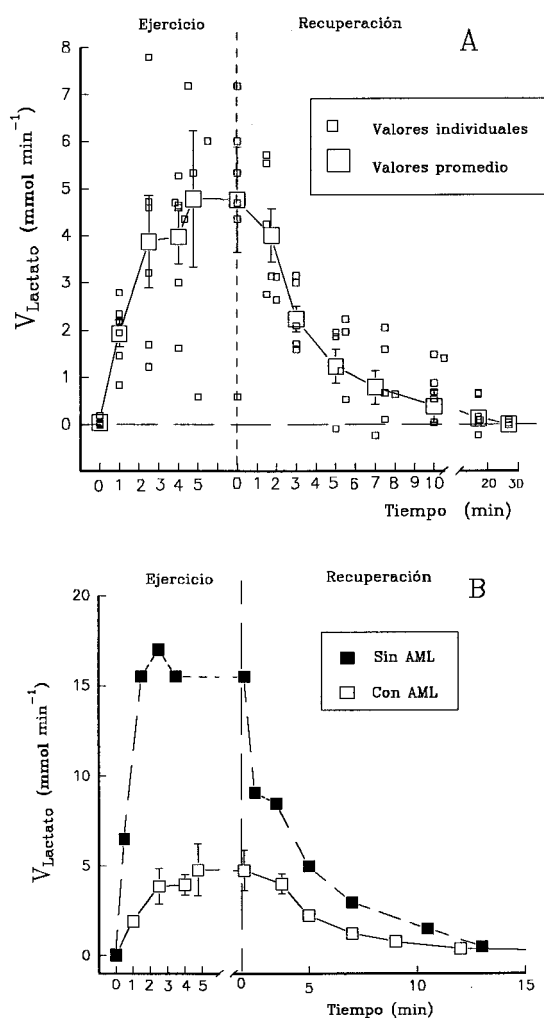
## 2.3.1.2.1.- Lactato sanguíneo y liberación del mismo desde los músculos.



**Figura 24.-** Concentraciones de lactato en plasma, sangre y eritrocitos; en situación de reposo, de ejercicio y durante 20 minutos de recuperación. A) Concentración de lactato en plasma: ○, Valores en sangre venosa; □, valores en sangre arterial. B) Concentración de lactato en sangre total: ●, Valores en sangre venosa; ■, valores en sangre arterial. C) Concentración de lactato en el eritrocito: ○, Valores en sangre venosa; □, valores en sangre arterial.  $m \pm$  E.E.M. (\* diferencias significativas respecto al basal ( $p < 0.05$ ); # Idem venoso frente a arterial).

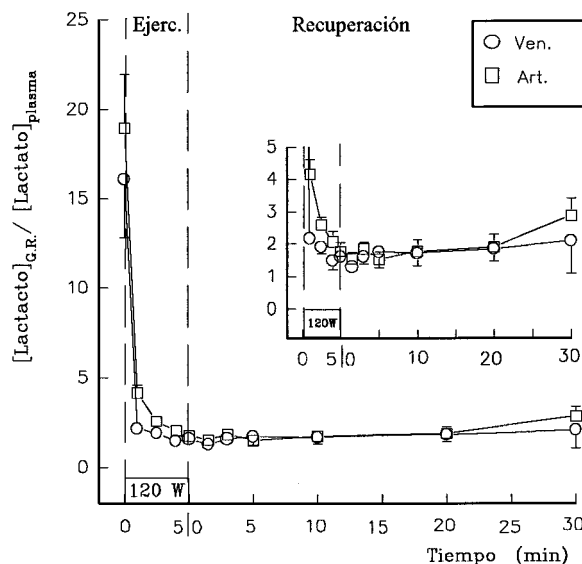
Durante el ejercicio, la  $[\text{Lact}^-_v]_p$  (concentración de lactato plasmático en vena) aumentó desde un valor de reposo de 1.87 (rango 0.68-3.31)  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  a un valor de 14.62 (rango 12.2-18.1)  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , mientras que a nivel arterial ( $[\text{Lact}^-_a]_p$ ) los valores oscilaron entre el de reposo de 1.46 (rango 0.60-2.97)  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  y 12.77 (rango 10.1-16.05)  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ , alcanzándose los valores máximos en los primeros minutos de la recuperación (16.8 y 14.4  $\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  de  $[\text{Lact}^-_v]_p$  y  $[\text{Lact}^-_a]_p$  respectivamente), para después disminuir de forma lenta y progresiva (figura 24, A), de tal forma que tras 20 min de recuperación no se habían alcanzado aún los niveles de reposo.

Puesto que los valores de  $[\text{Lact}^-_v]_p$  fueron siempre superiores que los de  $[\text{Lact}^-_a]_p$  podemos considerar que se produjo liberación y aclaramiento de lactato desde la musculatura activa durante el ejercicio y en reposo. El flujo o producción neta de lactato al final del ejercicio presentó un valor promedio de 4.74  $\text{mmol}\cdot\text{min}^{-1}$  (figura 25, A), como resultado de una diferencia arterio-venosa de  $[\text{Lact}^-]_p$  que se mantenía estable durante el ejercicio (ver figura 24, A), y un LBF que presentó una franca elevación (ver figura 40).



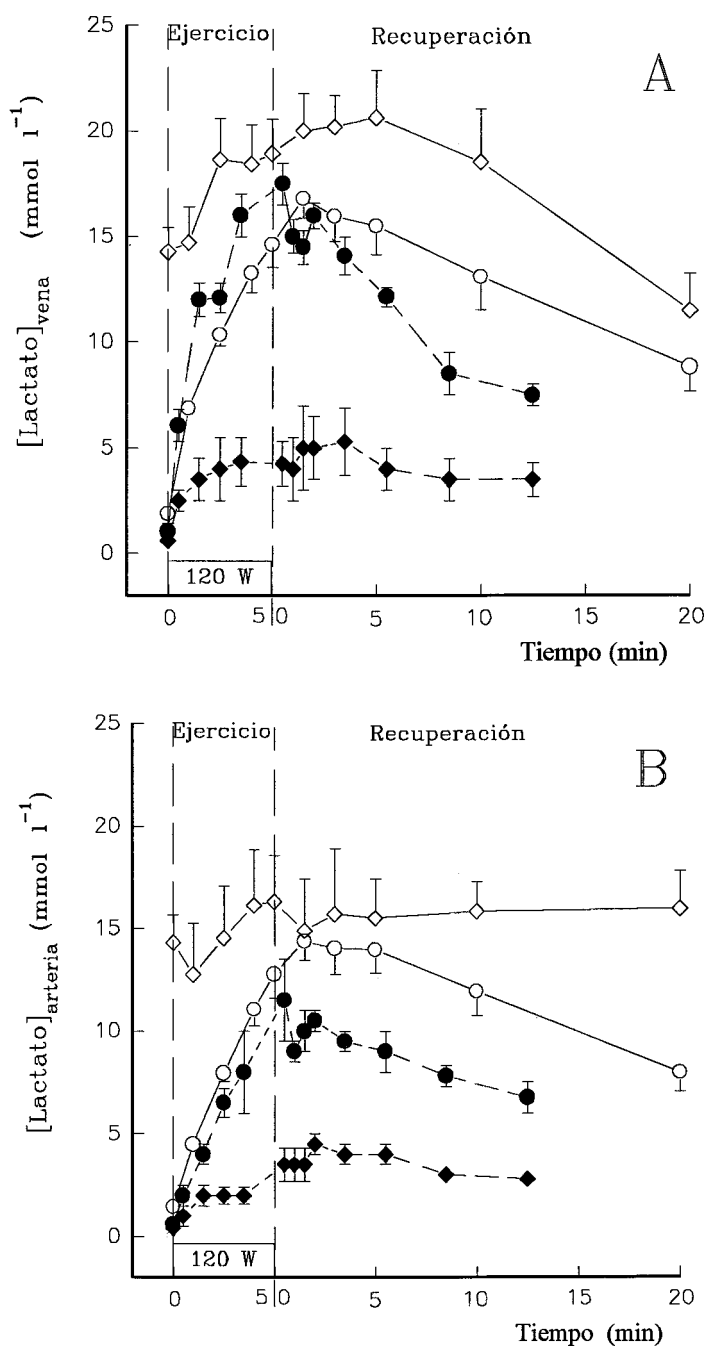
**Figura 25.** - Valores individuales y promedios del flujo neto de lactato desde el músculo en reposo, durante el ejercicio y en la recuperación. A) □, Valores para los AS; B) Los datos mostrados en A comparados con los CS (■).

Los valores de concentración media de lactato en sangre total venosa ( $[Lact_v]_s$ ) siguieron una evolución similar a los valores de  $[Lact_v]_p$  (figura 24 A y B). Tras los 5 primeros minutos de recuperación, la  $[Lact_v]_s$  presentó una caída más rápida que la  $[Lact_a]_s$ . Por otro lado los valores de las concentraciones de lactato en el interior del eritrocito ( $[Lact]_{GR}$ ) fueron muy superiores a las plasmáticas en los sujetos bajo AML, tanto en sangre venosa como en sangre arterial. En cuanto a las cinéticas, se observó que la  $[Lact_v]_{GR}$  se incrementó en los tres primeros minutos de recuperación para después caer, mientras que la  $[Lact_a]_{GR}$  permaneció estable a lo largo de toda la recuperación (figura 24 C). Por tanto, AML indujo un incremento de la relación  $[Lact]_{GR}/[Lact]_p$  tanto en reposo como durante el ejercicio y la recuperación. De hecho, la relación  $[Lact]_{GR}/[Lact]_p$  fue superior a uno durante todo el test y con valores similares para sangre venosa y arterial (ver figura 26).



**Figura 26.-** Relación entre las concentraciones de lactato intraeritrocitarias y plasmáticas. Se presentan los valores de  $m \pm E.E.M.$ , de los datos obtenidos a nivel arterial (□) y venoso (○), en las pruebas de esfuerzo realizadas por los sujetos tratados con amiloride. El detalle incluido en esta figura muestra con mayor claridad que dicha variable presentó siempre valores superiores a 1.

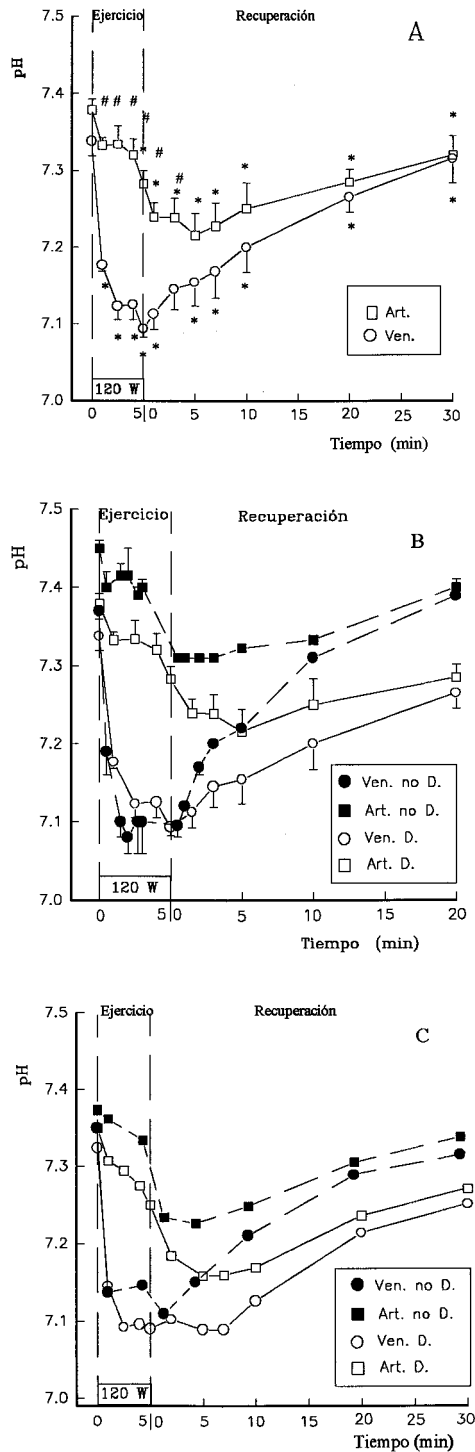
Es importante destacar que en los AS los valores de  $[Lactato]_{GR}$  fueron bastante elevados y superiores a los valores de  $[Lactato]_p$  tanto a nivel arterial como venoso, contrastando con los datos observados en los CS, donde se dieron valores de  $[Lact]_{GR}$  muy inferiores a los medidos a nivel plasmático. Estudiando la figura 27 (A y B) se observa que las concentraciones plasmáticas con y sin droga no fueron muy diferentes, mientras que el uso de amiloride indujo un importante incremento en las  $[Lactato]_{GR}$ .



**Figura 27.-** Valores de la [lactato] en plasma e intraeritrocitarios durante la prueba de esfuerzo. En la gráfica A se muestran los datos obtenidos en las muestras de sangre venosa y en B las de sangre arterial. Se representa la media  $\pm$  E.E.M. de las [lactato]: En plasma se marca con  $\circ$  los valores de los AS y con  $\bullet$  los valores de los CS; en el caso de las concentraciones intraeritrocitarias se determina con  $\diamond$  los valores obtenidos en los AS y con  $\blacklozenge$  los valores de los CS.

Si bien las diferencias más importantes fueron las observadas a nivel intraeritrocitario, cabe destacar que a nivel plasmático se observó un evidente enlentecimiento en la cinética de recuperación de las concentraciones de lactato de los sujetos que ingirieron amiloride (ver figura 27), tanto a nivel venoso como arterial.

## 2.3.1.2.2.- pH y gases en sangre.



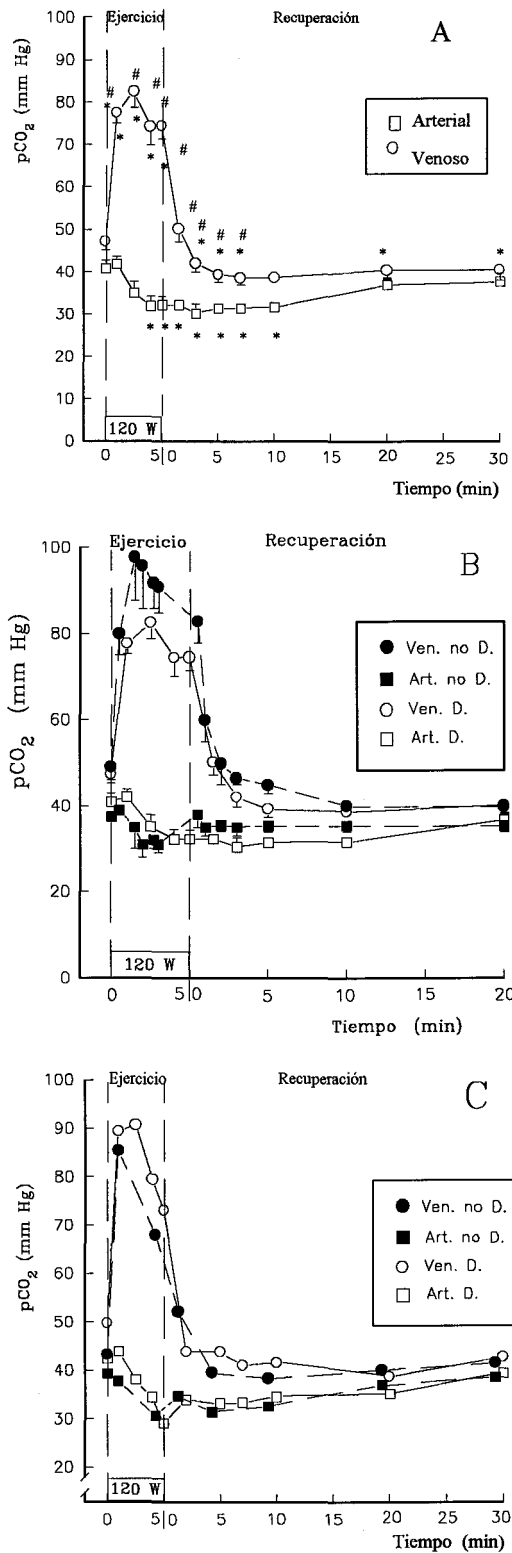
**Figura 28.-** Curso temporal de los cambios del pH arterial y venoso, en los sujetos controles y tras la ingesta de amiloride, a lo largo de la prueba de esfuerzo. En A, se muestran los valores ( $m \pm E.E.M.$ ) de pH venoso (○) y arterial (□) en los AS. En B, los datos mostrados en A comparados con los datos de los CS (●, venoso y ■, arterial; unidos por línea discontinua). En C, se comparan los datos de AS (○, venoso y □, arterial) con los datos tras retestar sin amiloride (●, venoso y ■, arterial; unidos por la línea discontinua). D = AML.

Dentro del estudio del equilibrio ácido-base se hicieron las mediciones de pH y pCO<sub>2</sub> en plasma y el análisis posterior por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbalch; pero además, se hizo una valoración cuantitativa a partir del algoritmo de Stewart y adicionalmente se valoraron los cambios hidro-electrolíticos. Todo ello permite un profundo análisis de los cambios observados en el equilibrio ácido-base.

Como se observa en la figura 28, en los sujetos tratados con AML el pH en sangre venosa (pH<sub>V</sub>), pasó de 7.34 a 7.1 en los tres primeros minutos de ejercicio, donde se mantuvo hasta el final del mismo, para volver al nivel de reposo de forma paulatina durante la recuperación, pero sin haber alcanzado los valores de reposo tras 30 min de recuperación. El pH en sangre arterial (pH<sub>A</sub>) pasó de 7.39 a 7.29 durante el ejercicio y aún presentaba una clara tendencia a descender al final del mismo. En la fase temprana de recuperación el pH<sub>A</sub> presentó una tendencia descendente para alcanzar valores de 7.22 unidades de pH a los 5 minutos, a partir de ese momento se observó una recuperación lenta del pH<sub>A</sub> de tal forma que a los 20 min de recuperación aún no se había alcanzado los niveles del final del ejercicio. Por contra, el pH<sub>V</sub> comenzó a subir desde el primer momento de la recuperación, en la mayoría de los casos y con mayor velocidad de subida que el pH<sub>A</sub> (figura 28, A). El decremento total de pH causado por el test ( $\Delta$ pH) fue de 0.16 unidades de pH en la sangre arterial y de 0.24 unidades de pH en la sangre venosa y tras 20 min sólo se había recuperado un 37.5% del  $\Delta$ pH<sub>A</sub> y del 66.6% del  $\Delta$ pH<sub>V</sub>, sin llegar a alcanzar en ningún caso los valores de pH basal. Cuando los sujetos no estaban bajo los efectos del AML (CS: figura 28, B y C en trazos discontinuos) los cambios en pH<sub>A</sub> fueron paralelos a los descritos arriba, pero los valores absolutos fueron en todo momento mayores que los visto en los AS, mientras que los  $\Delta$ pH<sub>A</sub> fueron menores que los observados en los AS. Las diferencias en las cinéticas de las curvas de pH<sub>V</sub> entre los sujetos tratados y no tratados fueron mínimas durante el ejercicio, pero la velocidad de recuperación del pH<sub>V</sub> en los AS fue claramente inferior, más lenta (figuras 28, B y C).

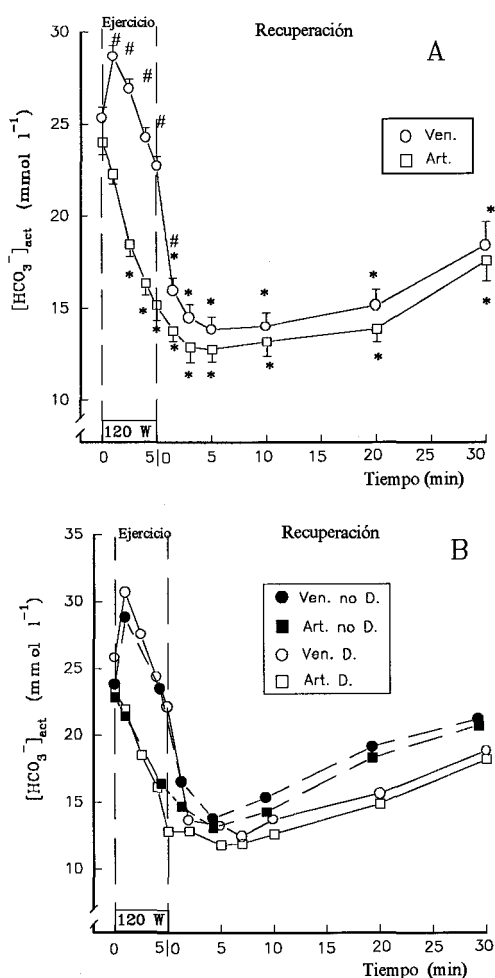
Durante el ejercicio la p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> pasó de 40 a 32 mm Hg. En la recuperación, la p<sub>a</sub>CO<sub>2</sub> se incrementó rápidamente en los primeros 2.5 minutos y muy lentamente en los 20 minutos siguientes. Por otro lado, la p<sub>v</sub>CO<sub>2</sub> incrementó de 46 a 85 mm Hg durante el ejercicio, mostrando una rápida vuelta a los valores de reposo en la recuperación temprana (figura 29, A). Se observaron ligeras diferencias entre los valores de pCO<sub>2</sub> de los AS y los CS (ver figuras 29, B y C).

Las presiones parciales de oxígeno se estudiaron de forma separada, presentando la evolución que se muestra en la figura 41, B.



**Figura 29.-** Curso temporal de los cambios en la pCO<sub>2</sub> arterial y venosa, en los sujetos controles y tras la ingesta de amiloride, durante la realización de la prueba de esfuerzo. A) Se muestran m ± E.E.M de pCO<sub>2</sub> venosa (○) y arterial (□) tras la ingesta de amiloride. B) Se compara los datos de los AS (○, venoso y □, arterial) frente a los CS (●, venoso y ■, arterial; línea discontinua). C) Se comparan los datos de los AS (○, venoso y □, arterial) y con los datos obtenidos tras retestar sin amiloride (●, venoso y ■, arterial; línea discontinua).

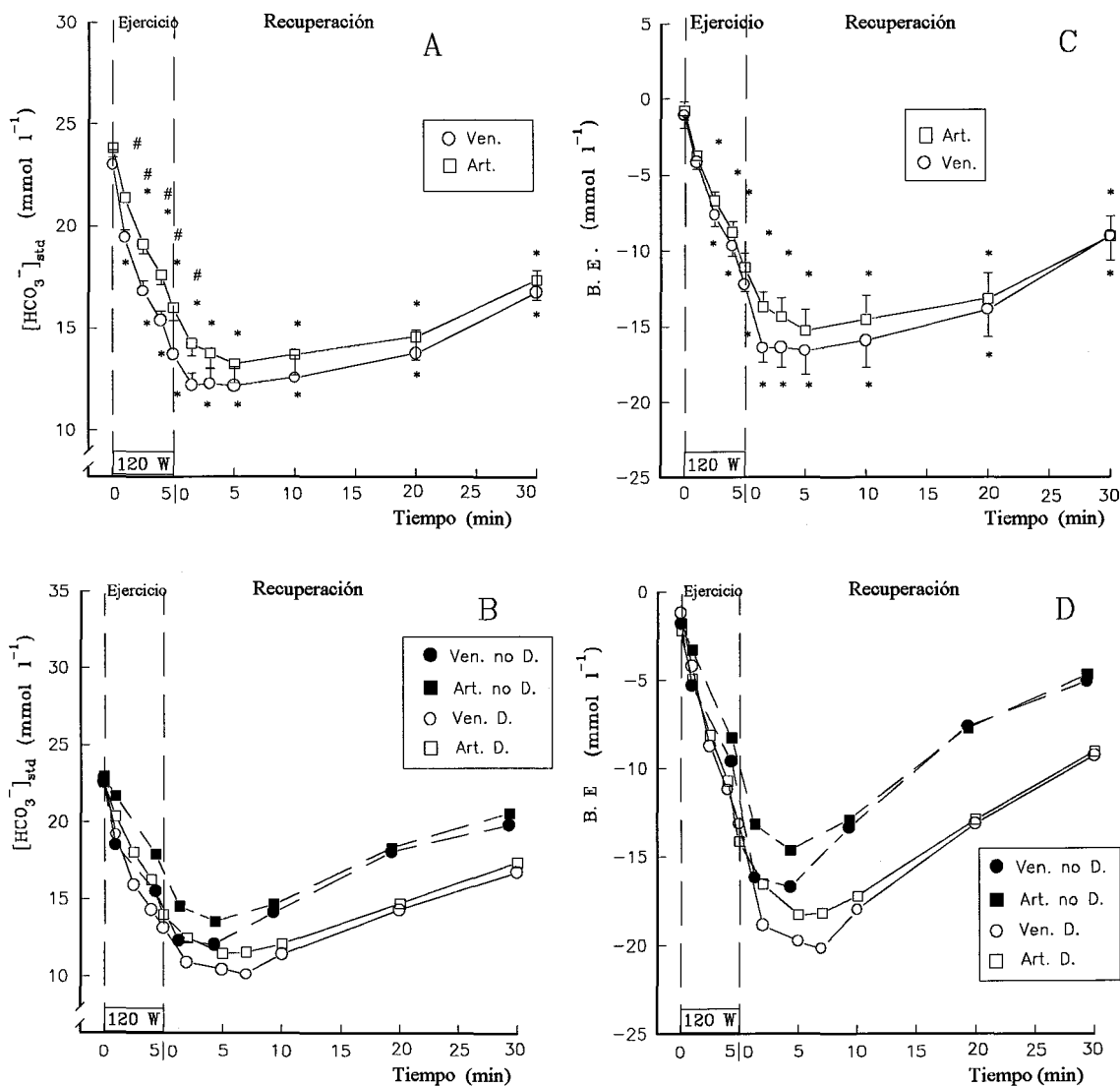
La concentración real o actual de bicarbonato en sangre venosa ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_v}$ ) se incrementó en el primer minuto y después decreció durante el ejercicio y los 5 primeros minutos de la recuperación. Tras 20 minutos de recuperación solo el 36% del valor inicial de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_v}$  había sido restablecido, sin haberse alcanzado en ningún caso los valores observados al final del ejercicio. La concentración actual de bicarbonato a nivel arterial ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_a}$ ) cayó marcadamente durante el ejercicio y más suavemente durante los 5 primeros minutos de recuperación. Tras 20 minutos de recuperación solo el 42% del valor inicial de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_a}$  había sido restablecido. En todo momento los valores observados para la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_a}$  fueron inferiores a los valores de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}_v}$ , dándose las mayores diferencias entre ellas durante el ejercicio. Las cinéticas de las  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$  se muestran en la figura 30, A; siendo la velocidad de recuperación de las  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$  más lenta en los AS que en la situación control (figura 30 B).



**Figura 30.-** Valores de la concentración de bicarbonato actual  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$ , a nivel arterial y venoso durante la realización de las pruebas de esfuerzo. A: valores ( $m \pm E.E.M.$ ) de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$  venosa ( $\circ$ ) y arterial ( $\square$ ) tras la ingesta de amiloride. B: se comparan los datos obtenidos en los experimentos tras la ingesta de amiloride ( $\circ$ , venoso y  $\square$ , arterial) y en situación control ( $\bullet$ , venoso y  $\blacksquare$ , arterial; línea de puntos).

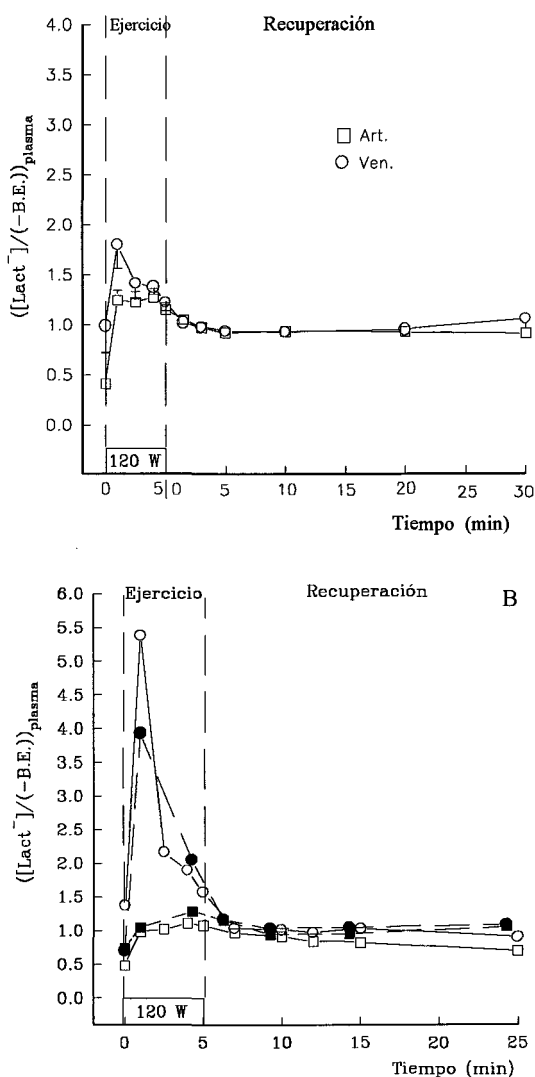


El exceso de base (B.E.) y la concentración de bicarbonato estándar ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$ ) presentaron cinéticas similares (figura 31), pero diferentes a la que acabamos de ver en la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{act}}$ , especialmente en sangre venosa.



**Figura 31.-** Curso temporal de las modificaciones en la concentración de bicarbonato estándar ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$ ) y del exceso de base (B.E.), a nivel arterial y venoso durante la realización de la prueba de esfuerzo. En A, se muestran los valores ( $m \pm \text{E.E.M.}$ ) de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$  venosa (○) y arterial (□) tras la ingesta de amiloride. En B, se comparan los datos tras la ingesta de amiloride (○, venoso y □, arterial) y sin amiloride (●, venoso y ■, arterial). En C y D, se muestran los cambios en B.E.; usándose las mismas claves que en A y B. \*, como en la figura 24.

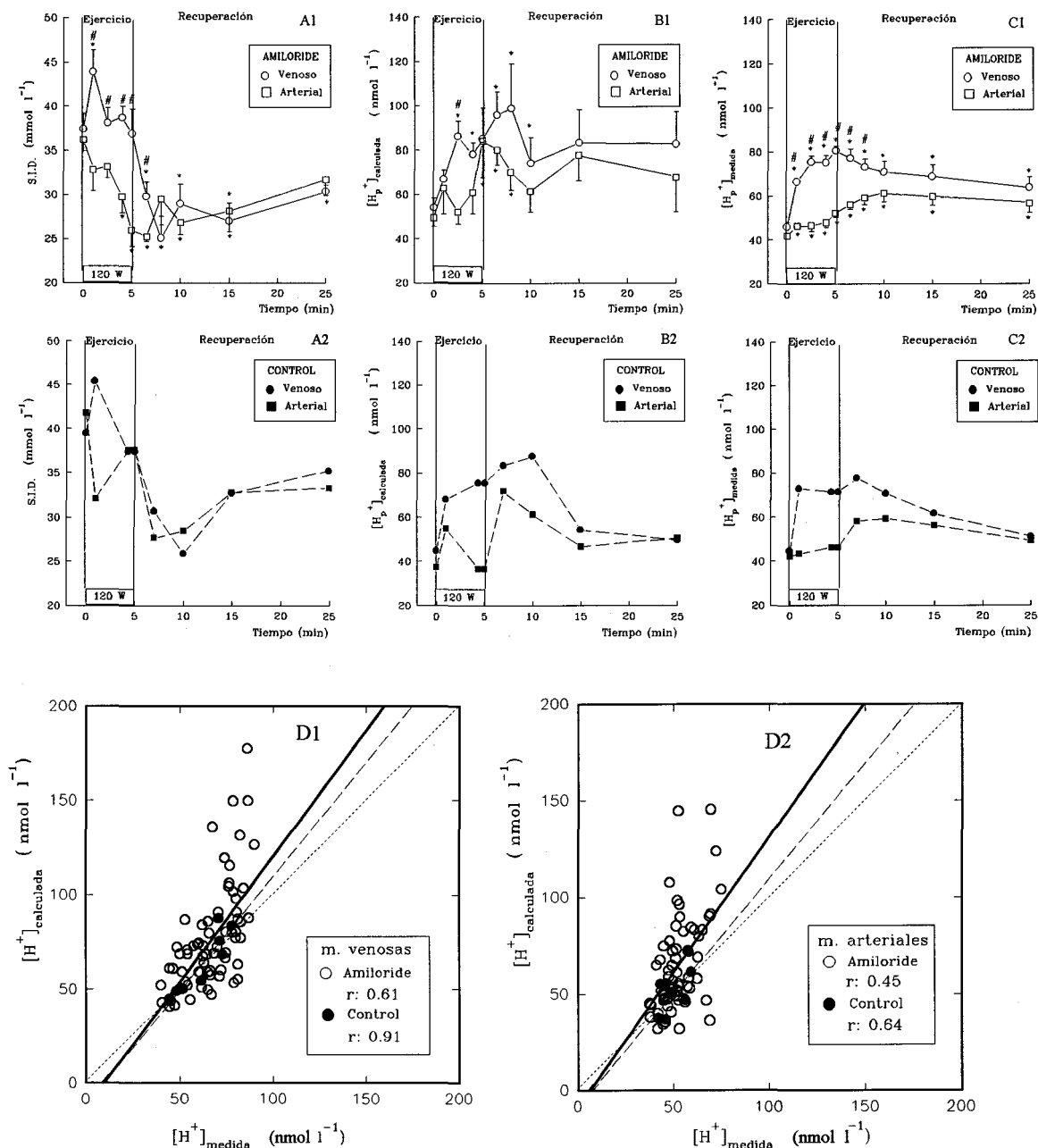
Por otro lado, la relación  $[\text{lact}^-]/\text{B.E.}$  en sangre arterial fue prácticamente equimolar en cualquier momento de los experimentos realizados bajo los efectos de AML y en situación control; por contra, en sangre venosa se observó un pico inicial en dicha relación al inicio del ejercicio, para caer después hasta alcanzar la unidad (figura 32).



**Figura 32.-** Curso temporal de la modificaciones en la relación  $[\text{lact}^-]/(-\text{B.E.})$ ; que muestra la relación entre los incrementos de la concentración plasmática de lactato y los valores absolutos de los decrementos en el exceso de base. Se muestran los valores (media  $\pm$  E.E.M.) de la relación a nivel venoso ( $\circ$ ) y arterial ( $\square$ ) tras la ingesta de amiloride. En B, se compara los datos de tras la ingesta de amiloride ( $\circ$ , venoso y  $\square$ , arterial) y sin amiloride ( $\bullet$ , venoso y  $\blacksquare$ , arterial) en un sujeto experimental que presentó un pico importante de la relación durante el ejercicio.

### 2.3.1.2.3.- Análisis del equilibrio ácido-base por la ecuación de Stewart.

Además del análisis por medio de la ecuación de Henderson-Hasselbalch, se realizó el análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base por medio del abordaje propuesto por Stewart (1981). Al calcular la diferencia de iones fuertes en plasma o SID (figura 33, A1 y A2), se vio que ésta, en el territorio venoso, presenta un pico inicial para volver al nivel basal donde se mantiene constante durante el ejercicio, mientras que, a nivel arterial, presenta una franca caída. En ambos casos, se observa una cinética de recuperación lenta tras el esfuerzo. Es difícil valorar si el uso de amiloride produjo grandes cambios en dicha variable, aunque en todo caso no fueron evidentes.



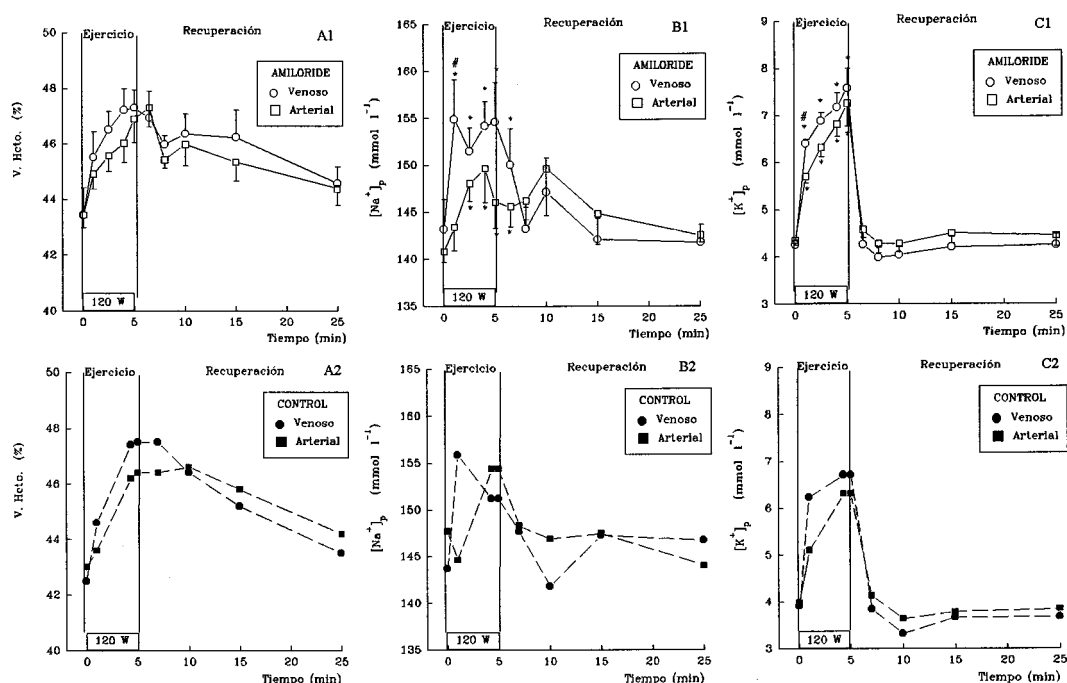
**Figura 33.-** Análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base. En A1 y A2, se muestra, respectivamente, el curso temporal de la SID bajo los efectos del amiloride y en la situación control; en B1 y B2, la concentración de hidrogeniones calculada a partir del algoritmo de Stewart; en C1 y C2, se presentan los valores de [H<sup>+</sup>] medidos con el electrodo selectivo de pH. En D1 se representa la relación, a nivel venoso, de los valores calculados de la [H<sup>+</sup>] frente a los medidos, con sus correspondientes rectas de regresión y coeficientes de correlación; en D2, se representa lo mismo pero a nivel arterial (Línea continua: con AML, línea discontinua: sin AML, línea de puntos: identidad). Para explicación ver el texto. (\*, diferencias significativas con respecto al reposo; #, diferencias significativas entre los valores arteriales y venosos. En ambos casos p<0.05).

Por otro lado, los valores de [H<sup>+</sup>] calculados, con la ecuación de Stewart (figura 33, B1 y B2), difieren de los valores medidos de [H<sup>+</sup>] (figura 33, C1 y C2), obteniéndose valores calculados superiores a los medidos al final del ejercicio y al principio de la

recuperación; especialmente a nivel arterial y tras el uso de amiloride. De hecho, en las gráficas D1 y D2 se observa que la nube de puntos más cercana a la línea de identidad fue la de muestras venosas en situación control ( $r: 0.91$ ), acercándose a la precisión demostrada por Weinstein y col. (1991) en muestras venosas en reposo y tras una prueba de esfuerzo máxima en tapiz rodante ( $r: 0.99$ ). No obstante, se observa que dicho algoritmo bajó en precisión en el resto de los casos; es decir, en las muestras arteriales en situación control ( $r: 0.64$ ), en las muestras venosas tras la ingesta de amiloride ( $r: 0.61$ ) y en las muestras arteriales tras la ingesta de amiloride ( $r: 0.45$ ). La desviación de la línea de identidad se observó en los niveles altos de  $[H^+]$ , con valores calculados superiores a los medidos.

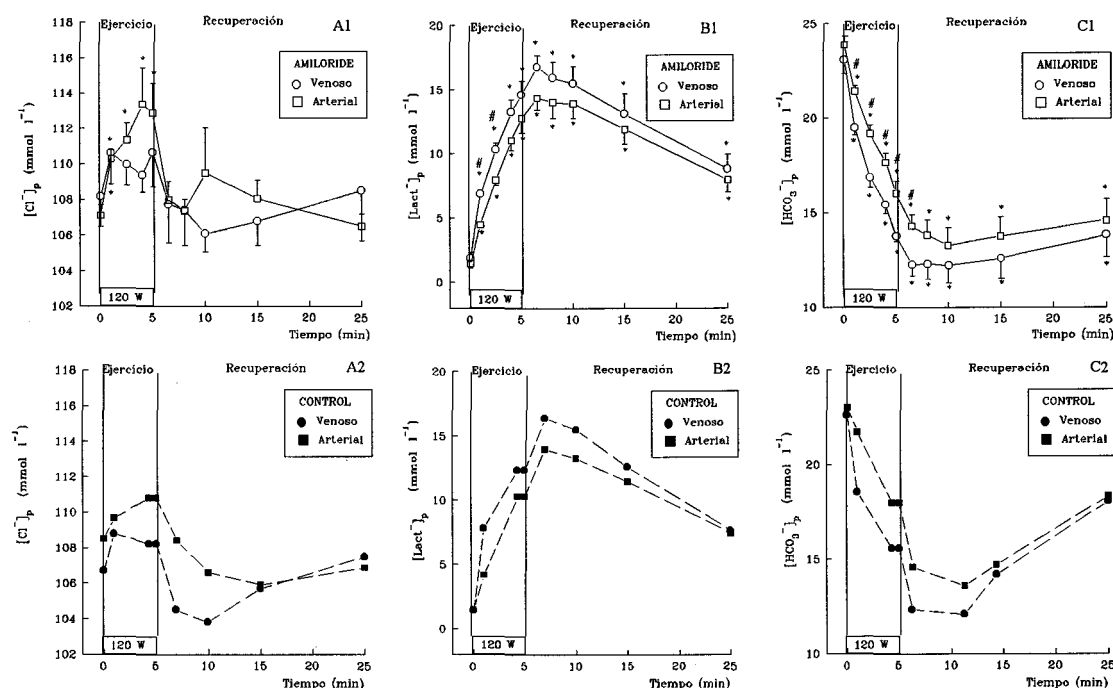
### 2.3.1.3.- Balance hidro-electrolítico.

En la figura 34 se observa la elevación de la  $[Na^+]$  (B1 y B2) durante el ejercicio, con su posterior caída durante la fase de recuperación. Estos cambios en la  $[Na^+]$  no siempre fueron proporcionales a los cambios observados en el volumen plasmático (ver A1 y A2). La  $[K^+]$  presentó un claro incremento durante el esfuerzo para caer bruscamente en la recuperación, se puede observar que su incremento es muy superior al producido por la hemoconcentración secundaria al ejercicio y que el uso de amiloride indujo un incremento adicional de la misma. Este ion se abordará en el apartado 2.3.1.4. de Resultados.



**Figura 34.-** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los cationes, así como del volumen plasmático. Se presentan muestras de sangre venosa y arterial. En A1 y A2 se muestran los cambios en el valor hematocrito durante la prueba de esfuerzo en los sujetos que ingirieron amiloride y en situación control, respectivamente. En B1 y B2 se observa la evolución de la  $[Na^+]$  en el plasma de sangre venosa y arterial -con y sin amiloride respectivamente-; en C1 y C2 se muestra lo mismo para la  $[K^+]$ . (\*, diferencias significativas con respecto al reposo, #, diferencias significativas entre los valores arteriales y venosos. En ambos casos  $p < 0.05$ ).

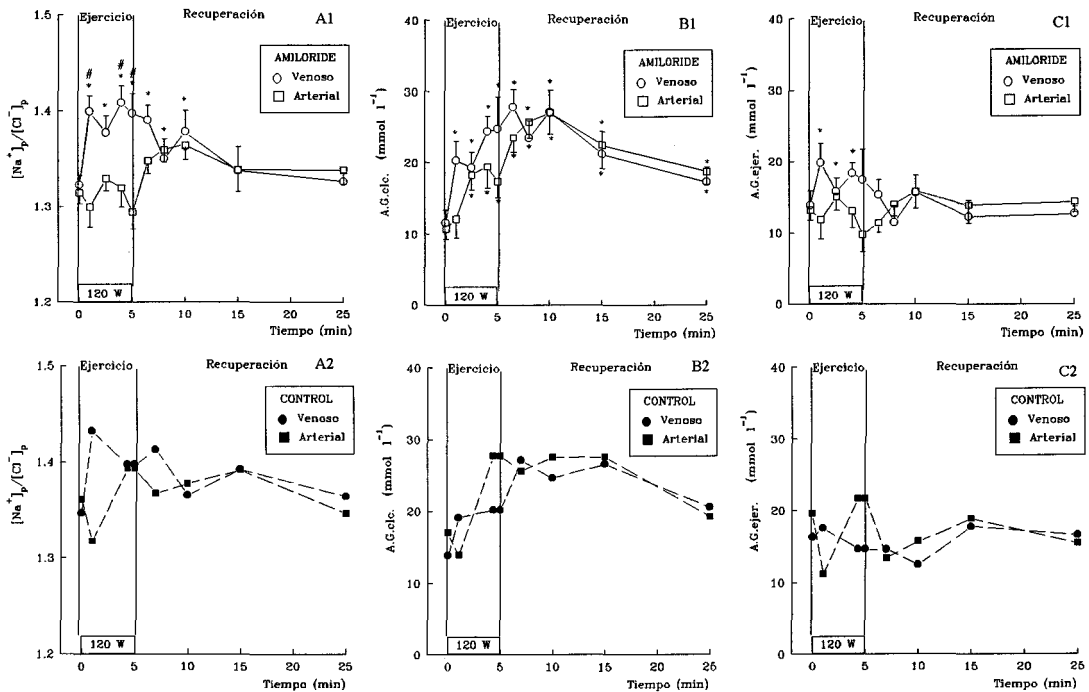
El curso temporal de los principales aniones plasmáticos se presenta en la figura 35. La  $[Cl^-]$  se incrementó a lo largo del ejercicio para volver a los valores basales en los primeros minutos de la recuperación. Es importante incidir en que la subida de la  $[Cl^-]$  a nivel arterial fue superior a la observada a nivel venoso, y que ésta no siguió los cambios inducidos por la hemoconcentración. La  $[Lact^-]$  presentó incrementos superiores a los previsiblemente inducidos por la hemoconcentración. Como ya se había visto, la  $[HCO_3^-]$  presentó un notable descenso a lo largo de la prueba de esfuerzo, observándose un evidente enlentecimiento de la curva de recuperación en los sujetos que ingirieron amiloride. Así mismo, dicho enlentecimiento se observó en la  $[Lact^-]$  tras la administración de amiloride.



**Figura 35.-** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los aniones. Se presentan muestras de sangre venosa y arterial. En A1 y A2 se muestran los cambios en la  $[Cl^-]$  durante la prueba de esfuerzo en los sujetos que ingirieron amiloride y en situación control, respectivamente. En B1 y B2 se observa la evolución de la  $[Lact^-]$  en el plasma de sangre venosa y arterial -con y sin amiloride respectivamente-; en C1 y C2 se muestra lo mismo para la  $[HCO_3^-]$ .

El análisis cuantitativo de los cambios inducidos en el balance hidro-electrolítico se representa en la figura 36. La relación sodio-cloruro (ver A1 y A2), nos indica que la pérdida de agua en el compartimento plasmático se asoció, durante el ejercicio a una "salida" proporcionalmente mayor de  $Cl^-$  que de  $Na^+$  en el territorio venoso, pero que la relación se mantiene estable a nivel arterial. Dicha relación se mantiene alrededor de los valores basales en la recuperación en ambos territorios. Por otro lado, al calcular el A.G.clc. se observó un incremento importante en los valores obtenidos (ver B1 y B2), debido al incremento en la  $[Na^+]$  y especialmente a la pérdida de  $HCO_3^-$ . Esta pérdida se

balancea, durante el ejercicio y la recuperación, por medio del anión  $\text{Lact}^-$ . Como se puede observar la  $[\text{HCO}_3^-]$  y la  $[\text{Lact}^-]$  presentan cinéticas y cambios cuantitativos similares pero en direcciones opuestas, por lo que cuando se usa la fórmula con cinco iones, es decir, cuando se calcula el A.G.ejer. (ver C1 y C2 ) no se observan cambios importantes, manteniéndose los valores alrededor de  $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  durante toda la prueba de esfuerzo.



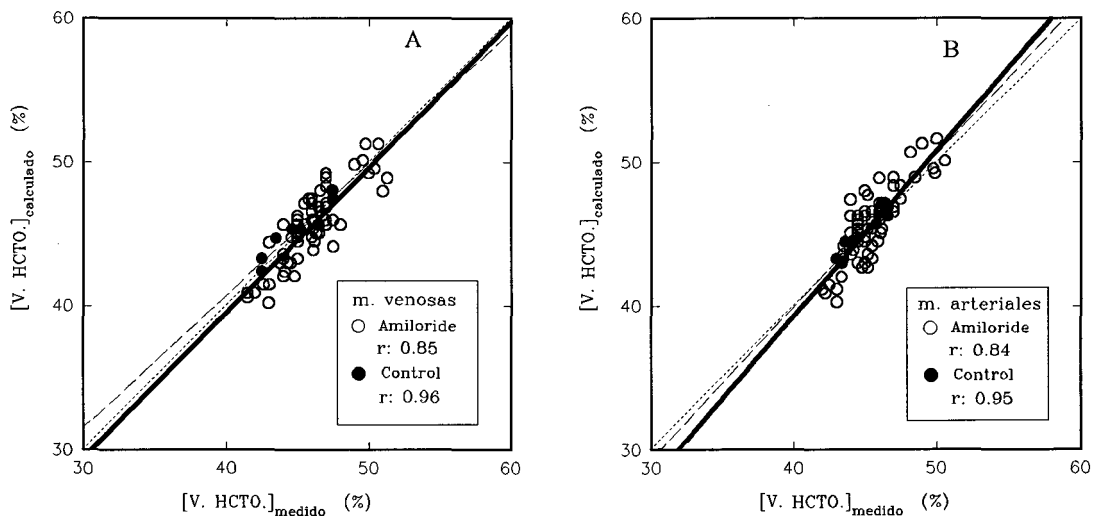
**Figura 36.-** Análisis cuantitativo del balance hidro-electrolítico. En A, se muestra la relación sodio-cloruro. En B, el curso temporal del "anion gap" obtenido a partir de los iones  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{HCO}_3^-$ . En C, se representa el "anion gap" calculado a partir de los cinco iones.

Por otro lado se comprobó si los valores calculados para el hematócrito a partir de la concentración de Hb total en plasma presentaba algún cambio con el uso del amiloride. Tal como se ve en la figura 37 el uso de amiloride no alteró de forma notable la relación entre los valores medidos y estimados del hematócrito. El valor calculado se obtiene con la fórmula:

$$\text{V. HCTO. calculado} = [\text{Hb}] \times 2.941$$

El factor 2.941 se obtiene con la fórmula  $\text{V. HCTO. calc (\%)} = ([\text{Hb}] / [\text{CMHbG}]) \times 100$ , asumiendo una concentración media de Hb globular ( $[\text{CMHbG}]$ ) de  $34 \text{ g}\cdot\text{dl}^{-1}$ , por tanto el factor resulta de dividir  $100/34$ . Puesto que la relación entre los datos calculados y medidos del valor hematocrito se mantuvo siempre cerca de la línea de identidad, cabe pensar que dicho factor y por ende el valor de la MCHbC no se modificó de manera drástica en ningún caso. Por tanto, se puede concluir que ni con el uso de amiloride ni en situación control se produjeron ganancias o pérdidas importantes del volumen total de

agua en el interior del eritrocito, con lo que los desplazamientos de agua observados a nivel vascular se deben producir entre el compartimento plasmático y otros compartimentos (ver Discusión).

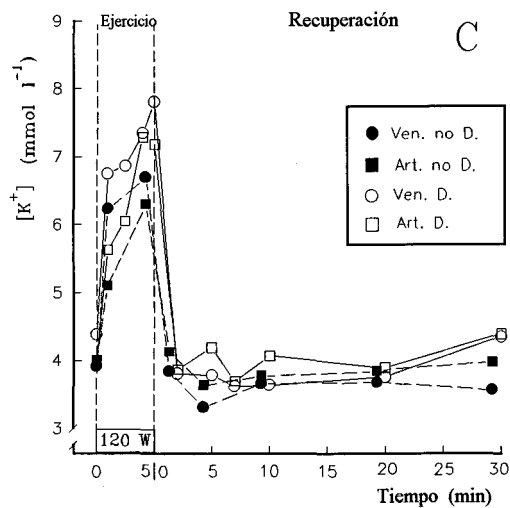
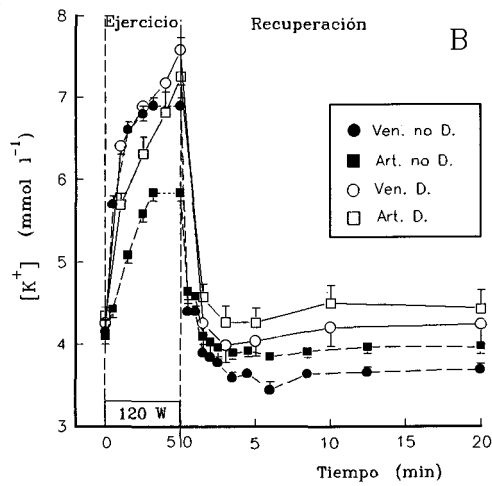
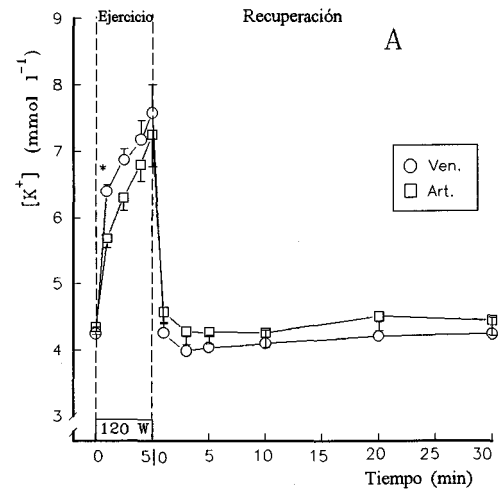


**Figura 37.-** Estudio del desplazamiento de agua en el compartimento vascular. Para ello se presenta la relación de los datos calculados para el valor hematocrito frente a los valores medidos con sus correspondientes rectas de regresión y coeficientes de correlación (línea continua: con AML, línea discontinua: sin AML, línea de puntos: identidad). Para explicación ver el texto.

#### 2.3.1.4.- Cambios en la concentración plasmática de potasio.

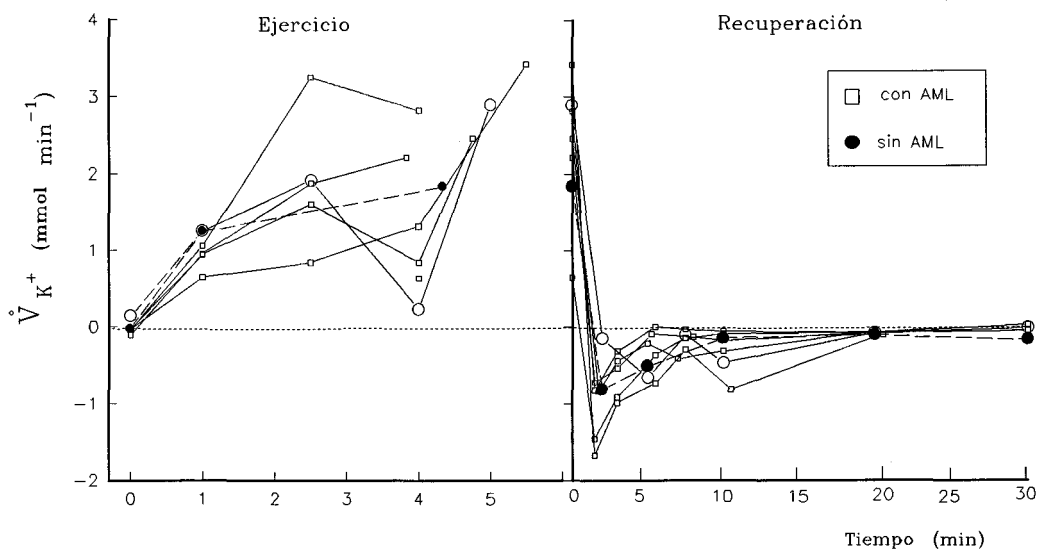
Durante el ejercicio, la concentración media de potasio plasmático en vena aumenta desde un valor de reposo de 4.25 (rango 3.85-4.53)mmol·l<sup>-1</sup> a un valor de 7.58 (rango 6.59-9.08)mmol·l<sup>-1</sup>, mientras que a nivel arterial los valores oscilan entre el de reposo de 4.35 (rango 4.00-4.66)mmol·l<sup>-1</sup> y 7.26 (rango 6.56-8.53)mmol·l<sup>-1</sup>, alcanzándose ambos valores máximos al final del ejercicio (fig. 38, A). En la recuperación se observa una caída brusca de las concentraciones arteriales y venosas de potasio, quedando los niveles de concentración arterial por encima de las concentraciones venosas.

Comparando los datos de los AS con los obtenidos en los CS se comprobó un ligero incremento de los valores de reposo con el uso de AML, siendo claramente superiores durante el ejercicio, especialmente para los valores de potasio a nivel arterial; alcanzándose en todo caso, valores superiores en los AS al final del ejercicio tanto en vena como arteria (figuras 38, B y C). Dadas las diferencias entre [K<sup>+</sup>]<sub>p</sub> venosas y arteriales durante el ejercicio es evidente que existe liberación y aclaramiento de potasio desde el territorio muscular, mientras que durante la recuperación la dirección del flujo neto de potasio se invierte, lo que sugiere que en esta fase predomina la recaptación del mismo por parte del músculo. Los datos calculados para el flujo muscular neto de K<sup>+</sup> durante la prueba de esfuerzo, se representa en la figura 39.



**Figura 38.-** Curso temporal de las concentraciones de potasio durante la prueba de esfuerzo. Se muestran los valores ( $m \pm E.E.M.$ ) de la  $[K^+]$  a nivel venoso (○) y arterial (□) tras la ingesta de amiloride. En B, se comparan los datos antes vistos para los AS (○, venoso y □, arterial) con los datos de los de CS (●, venoso y ■, arterial). En C, datos obtenidos tras la ingesta de AML (○, venoso y □, arterial) comparados con los datos obtenidos tras retestar sin amiloride (●, venoso y ■, arterial).





**Figura 39.-** Flujo muscular neto de potasio en reposo, durante el ejercicio y en los 30 minutos de la fase de recuperación. □, los datos de los sujetos tratados con amiloride se comparan con la situación control (●), sin amiloride.

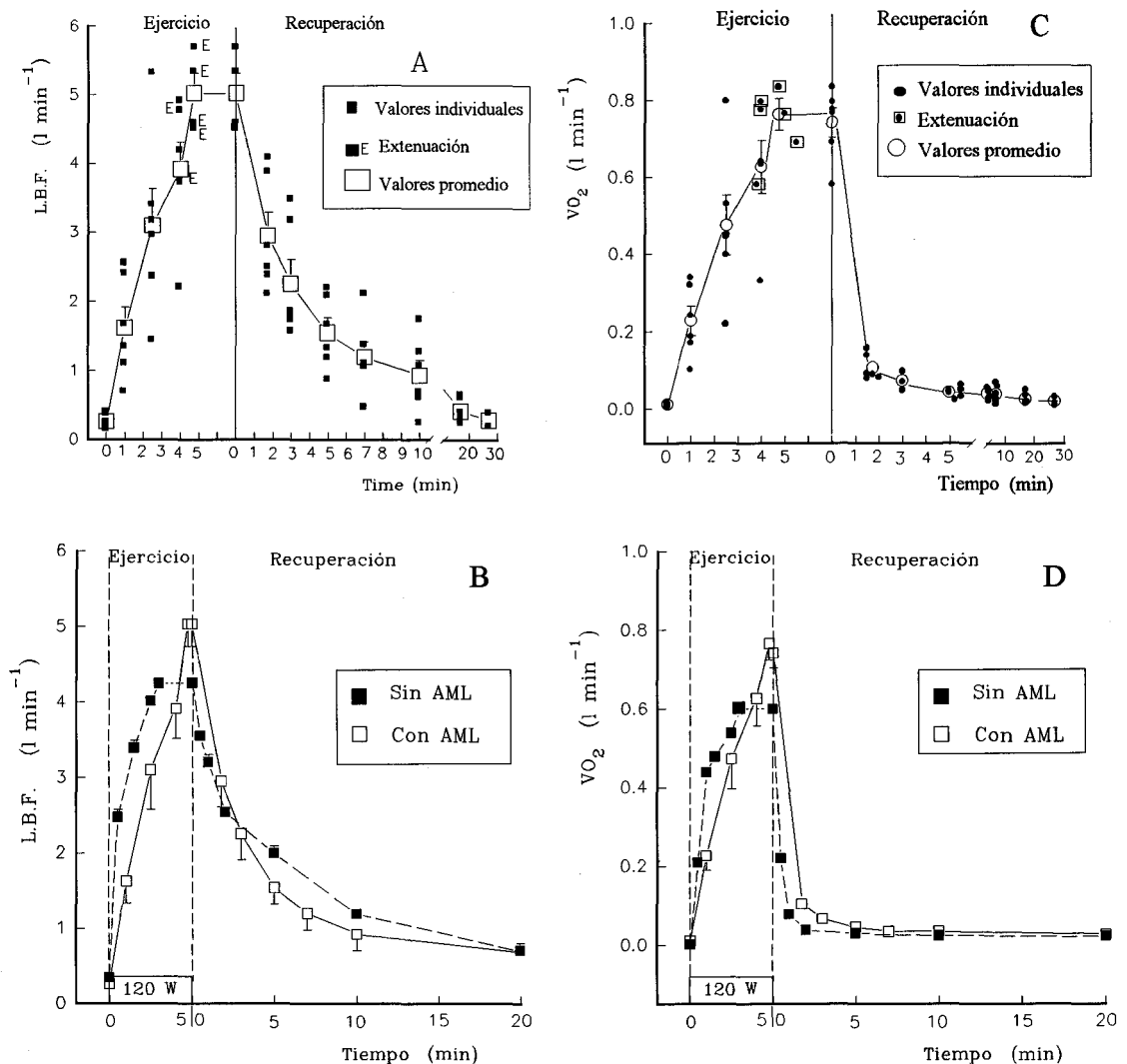
La producción o flujo neto de potasio ( $\dot{V}K^+$ ) en el territorio muscular activo durante el esfuerzo presenta una subida inicial para alcanzar un pico entre los 2-3 minutos con tendencia a la estabilización o a decrecer hasta los 4 minutos, para presentar un incremento final una vez superados los 4 minutos. Los valores de  $\dot{V}K^+$  que se representan en la figura 39, fueron calculados mediante la fórmula:  $\dot{V}K^+ = LBF \times ([K^+]_V - [K^+]_a)$ . El sumatorio del flujo neto de  $K^+$  durante la fase de ejercicio fue de 5.88 (rango 5.45-6.68) mmol. (calculado midiendo el área bajo la curva de producción de  $K^+$ ).

### 2.3.1.5.- Flujo sanguíneo y consumo de oxígeno.

En la figura 40 A se representan los valores de LBF obtenidos con la técnica descrita previamente (Andersen y Saltin, 1985), tras la ingesta de AML. Se observó que LBF incrementaba inmediatamente tras el inicio del ejercicio, alcanzando un máximo valor de  $5 \text{ l}\cdot\text{min}^{-1}$  al final del mismo. En la fase de recuperación, el valor de LBF decreció de forma brusca en los cinco primeros minutos, pero después se observó una caída lenta y progresiva durante la recuperación, pero sin llegar a alcanzar los niveles de reposo hasta los 30 minutos de recuperación. Comparado con los valores de los CS (figura 40, B) se observa que sólo durante el ejercicio los valores de los AS fueron inferiores y únicamente si comparamos los distintos valores en tiempo real. No obstante, al final del ejercicio los valores en los AS superan los de los CS, si bien el final del ejercicio en los experimentos con AML se dio 1.5 minutos más tarde. En reposo y en la recuperación los valores de ambos grupos se igualaron.

La evolución de los consumos de oxígeno del territorio activo durante el test en los AS y su comparación con los datos de los CS se presenta en la figura 40 (C y D) y siguieron una evolución similar a los cambios descritos para el LBF; es decir, se elevó

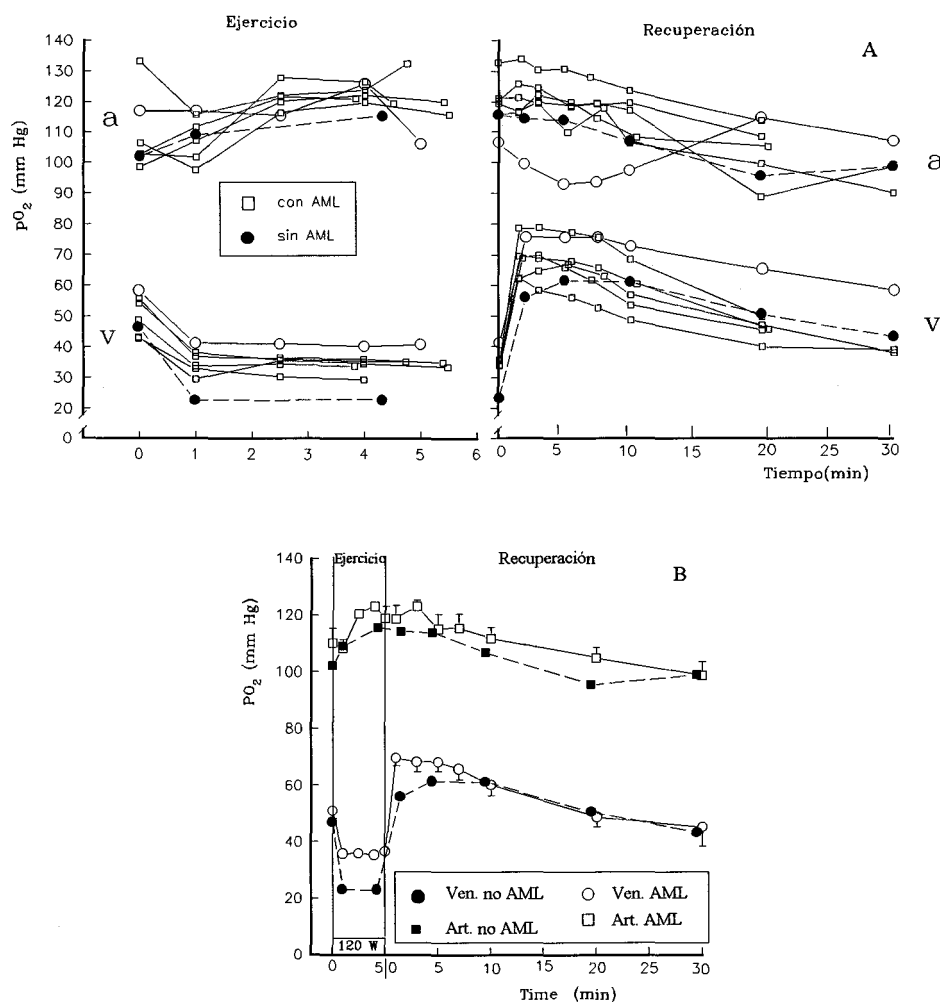
rápidamente en el ejercicio, cae de forma brusca al inicio de la recuperación y de forma lenta posteriormente.



**Figura 40.-** Valores individuales y promedios del flujo sanguíneo periférico (L.B.F., medido en la pierna derecha) y del consumo de oxígeno del territorio activo ( $VO_2$ , medido en la misma pierna). Se presenta el curso temporal de las dos variables a lo largo de la prueba de esfuerzo: En A, los valores individuales (■), en el momento de la extenuación (■E) y los valores de la  $m \pm E.E.M.$  (□). En B, se presentan los datos obtenidos tras la ingesta de AML (□) y en los sujetos en situación control (■). En C, los valores de los consumos de oxígeno individuales (●), en el momento de la extenuación (⊙) y los valores de las  $m \pm E.E.M.$  (○). En D, se muestran los datos de los AS (□) comparados con los CS (■).

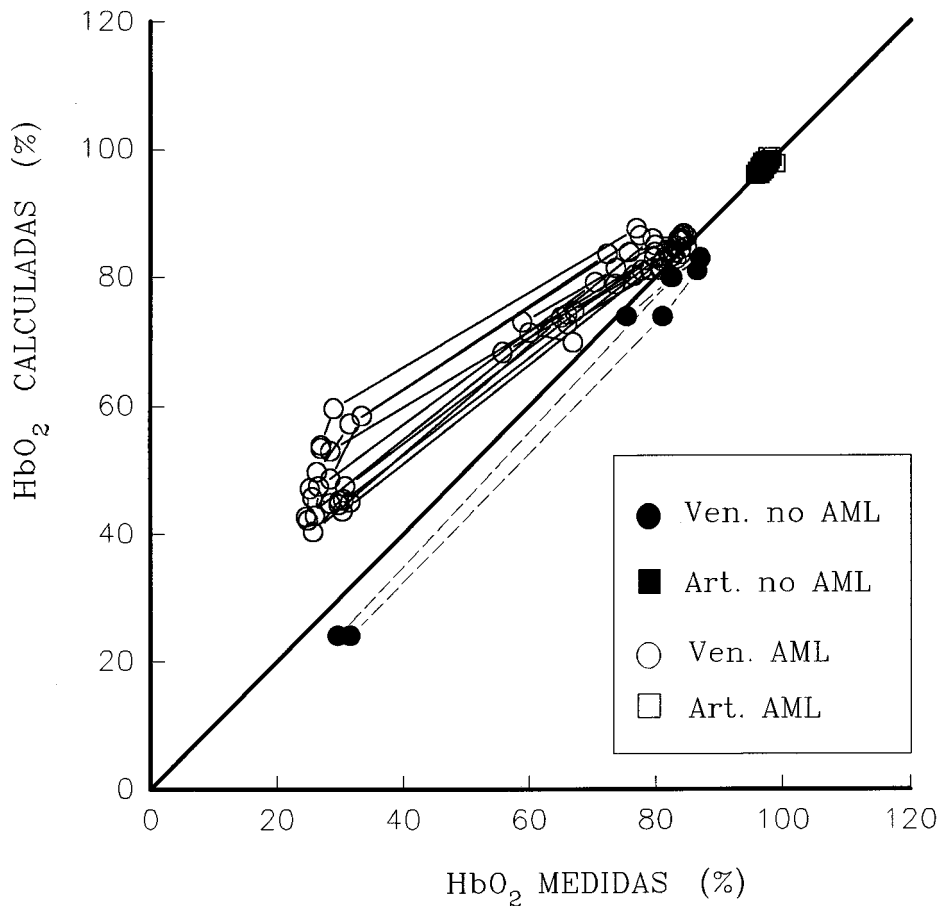
### 2.3.1.6.- $pO_2$ y $O_2Hb_{sat}$ .

Al comparar los datos de los sujetos que realizaron los test con y sin droga, se observa que con la droga se produjo un claro aumento de la  $pO_2$  en sangre venosa. La  $p_vO_2$ , muestra valores de 40 mm Hg en los AS en vez de los 23 mm Hg de los CS durante el ejercicio (figura 41, A y B). Durante la recuperación los datos tienden a igualarse



**Figura 41.-** Valores arteriales y venosos de la  $pO_2$ . En A, se muestran los valores de los sujetos tratados con amiloride ( $\square$ ) y comparados con la situación control. ( $\bullet$ ). En B, se compara los datos obtenidos en situación control con los obtenidos tras la ingesta de amiloride.

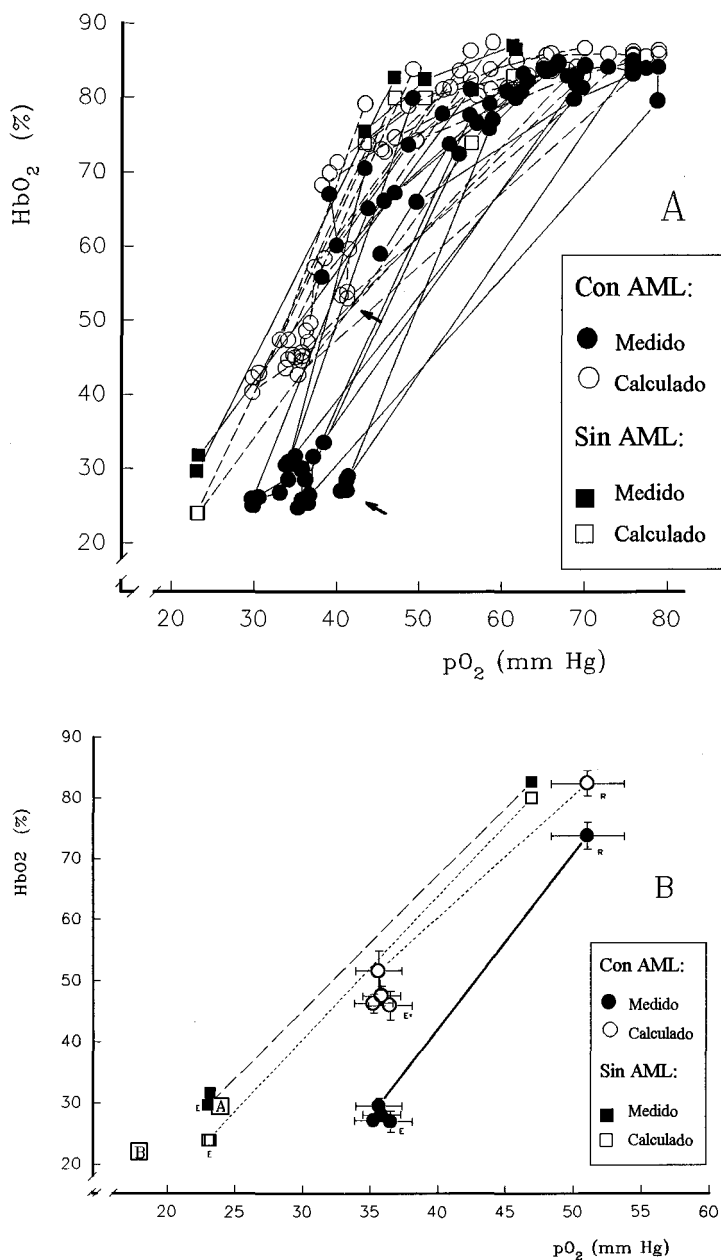
A pesar de esta elevación en la  $p_vO_2$ , el valor de  $O_2Hb_{sat}$  (medida con el hemoxímetro) fue similar en todos los casos, alrededor de 25% en sangre venosa. No obstante, cuando la  $O_2Hb_{sat}$  fue calculada por medio de la ecuación de Kelman y Thomas (Kelman, 1966; Thomas, 1972), se obtuvieron, durante el ejercicio, valores alrededor del 50% de  $O_2Hb_{sat}$  en la sangre venosa de los sujetos que tomaron AML. Curiosamente, en la situación control se dieron siempre valores del 25% de  $O_2Hb_{sat}$ , ya fueran medidos con el hemoxímetro o calculados por medio de la mencionada ecuación (figuras 42 y 43); es por tanto importante reseñar que en los CS los valores calculados quedan cerca de los valores medidos, a los diferentes porcentajes de  $O_2Hb_{sat}$  observados durante el test (de 20% a 100%), mientras que esto no es cierto en los sujetos que tomaron AML, especialmente en los niveles de baja  $O_2Hb_{sat}$ .



**Figura 42.-** Valores medidos y calculados de la saturación parcial de la Hb por el oxígeno. Se representan los valores arteriales y venosos para la situación control y tras la ingesta de amiloride. La línea diagonal corresponde a la línea de identidad, indica por tanto la precisión en el cálculo realizado.

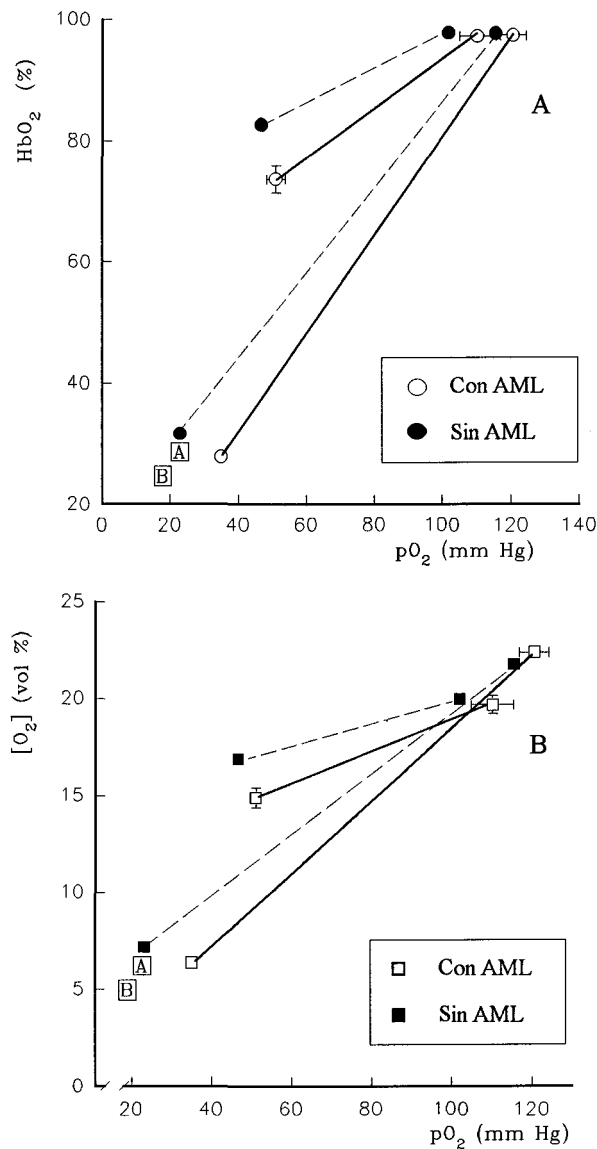
Para más detalle, en la figura 42, se representan los valores de  $O_2Hb_{sat}$  (medidos y calculados) frente a la  $p_vO_2$  para cada uno de los sujetos experimentales. Se observa un importante desplazamiento a la derecha de los valores de  $O_2Hb_{sat}/pO_2$  en todos los AS frente a la situación control. Por otro lado los valores calculados fueron diferentes a los medidos en los AS, siendo esta diferencia especialmente evidente en los picos o valores inferiores de la relación  $O_2Hb_{sat}/pO_2$ , es decir, a nivel venoso durante el ejercicio. A nivel arterial (ver figura 40 y 44) la  $O_2Hb_{sat}$  se mantuvo alrededor del 97% tanto en AS como en la situación control, a pesar de diversas oscilaciones de la  $p_aO_2$ .

El desplazamiento a la derecha de los puntos correspondientes a los AS, representados en la figura 43 no indica el comportamiento de la Hb en todo el rango de  $pO_2$  observados. Para ello en la figura 44 (A) se han unido los puntos arteriales con los



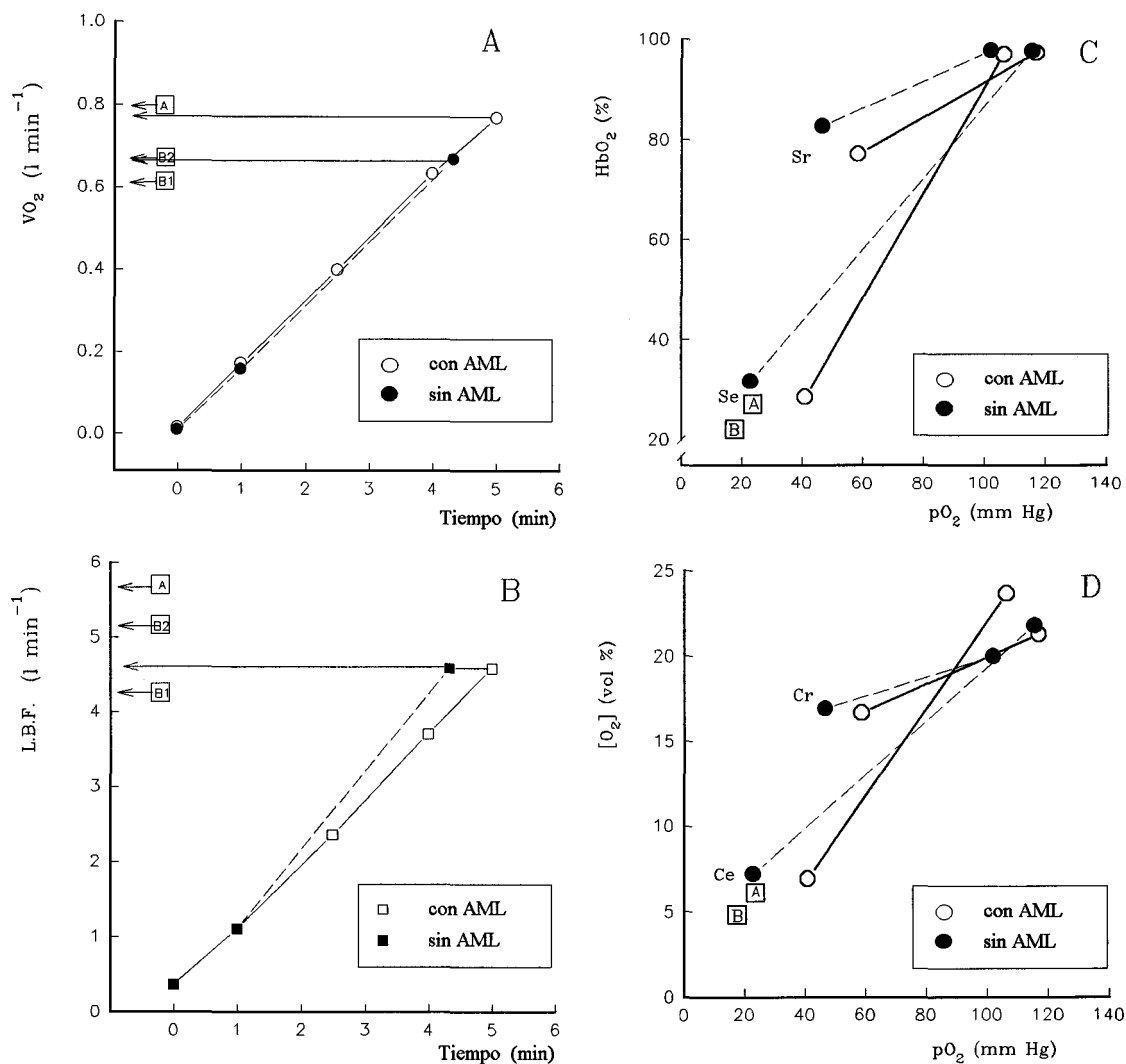
**Figura 43.-** Valores medidos y calculados de la saturación parcial de la Hb por el oxígeno enfrentados con el correspondiente valor de pO<sub>2</sub>. En A, se representan todos los valores venosos para la situación control y tras la ingesta de amiloride, tanto los medidos como los calculados (las flechas marcan la diferencia entre los datos medidos y calculados al final del ejercicio). En B, se muestran los valores promedio de los mismos datos en reposo y durante el ejercicio, con "E" se marca el punto de extenuación; además, se han añadido los datos medidos por Andersen y col. -1985- (A) y por Bagsbo y col. -1990- (B) en experimentos similares.

venosos, lo que determina la pendiente de la curva de  $O_2Hb_{sat}/pO_2$ . Vemos como los incrementos de las pendientes de dichas rectas se asociaron a incrementos similares en las pendientes de las rectas que unen los valores venosos y arteriales de la concentración de O<sub>2</sub> en sangre ([O<sub>2</sub>]), especialmente al final del ejercicio (ver figura 44, B), con lo que se pone de manifiesto un incremento de la capacitancia de la sangre para el O<sub>2</sub>.



**Figura 44.-** Los valores medidos de la saturación parcial de la Hb por el oxígeno así como la concentración de oxígeno en sangre ([O<sub>2</sub>]) se enfrentan con el correspondiente valor de pO<sub>2</sub>. Las líneas conectan los valores arteriales con los correspondientes valores venosos ( la  $m \pm E.E.M.$ ). En A, se representa un equivalente de la curva de saturación de Hb en las situaciones de reposo (Sr) y de extenuación (Se), añadiéndose los valores descritos por Andersen y col. -1985- (A) y por Bangsbo y col. -1990- (B). En B se hizo lo mismo para la concentración de oxígeno en sangre, tanto en reposo (Cr) como en la extenuación (Ce). La pendiente de las rectas representadas en B marcan la capacitancia de la sangre para el oxígeno. Ver el texto para mayor explicación.

En la figura 45, se muestra, a modo de resumen, como el cambio en la capacitancia de la sangre para el O<sub>2</sub> puede contribuir a igualar el aporte de O<sub>2</sub> a los tejidos en situaciones de flujo sanguíneo periférico comparativamente reducido. Se incidirá sobre este tema en la Discusión.



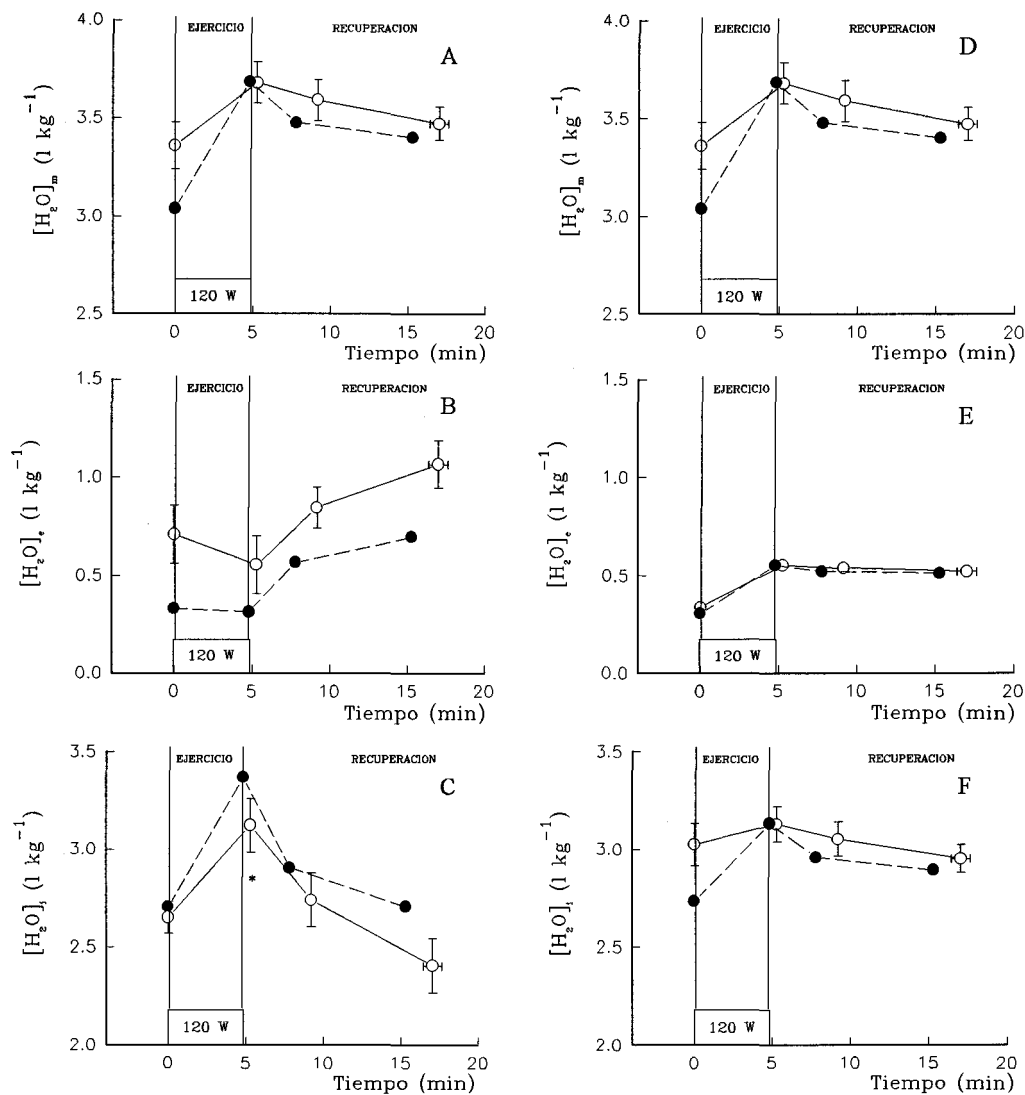
**Figura 45.-** Comparación de los datos obtenidos en la situación control (símbolos rellenos) y tras la ingesta de amiloride (símbolos huecos). En A, se muestra el VO<sub>2</sub> durante la prueba de esfuerzo, los valores pico se comparan con los descritos por Andersen y col. -1985- (A), por Bangsbo y col. -1990- (B1) y por Bangsbo y col. -1992- (B2). En B se hizo lo mismo para los valores de L.B.F.. En C y D, se muestran los cambios inducidos por el amiloride en la curva de O<sub>2</sub>Hbsat y en la [O<sub>2</sub>] en sangre; los valores al final del ejercicio (Se y Ce, respectivamente) se comparan con los descritos por Andersen y col. -1985- (A) y por Bangsbo y col. -1990- (B).

### 2.3.1.7.- Balance hidro-electrolítico en el compartimento muscular activo.

La masa muscular de cuádriceps femoral fue de  $3.3 \pm 0.49$  kg, obtenida según se indicó en Material y Métodos.

El análisis de las biopsias musculares permitió observar que con el uso de amiloride se produjeron cambios en el agua muscular total (figura 46, A y D), cuya distribución en los espacios intra- y extra-celular serían diferentes según se considere el "espacio de Cl<sup>-</sup>" (figura 46, B y C) o se asuma una distribución de agua intra-extracelular de 90%-10% en reposo y 85%-15% durante el ejercicio, distribución similar a la obtenida al determinar el "espacio de inulina" (figura 46, E y F). Incidiendo en la figura 46 se observa que, los valores

representados en las A y D son idénticos, pero a partir de estos se obtienen valores diferentes de agua extracelular (comparar B y E) y de agua intracelular (comparar C y F) según se extrapolen al espacio de  $\text{Cl}^-$  o al de inulina.



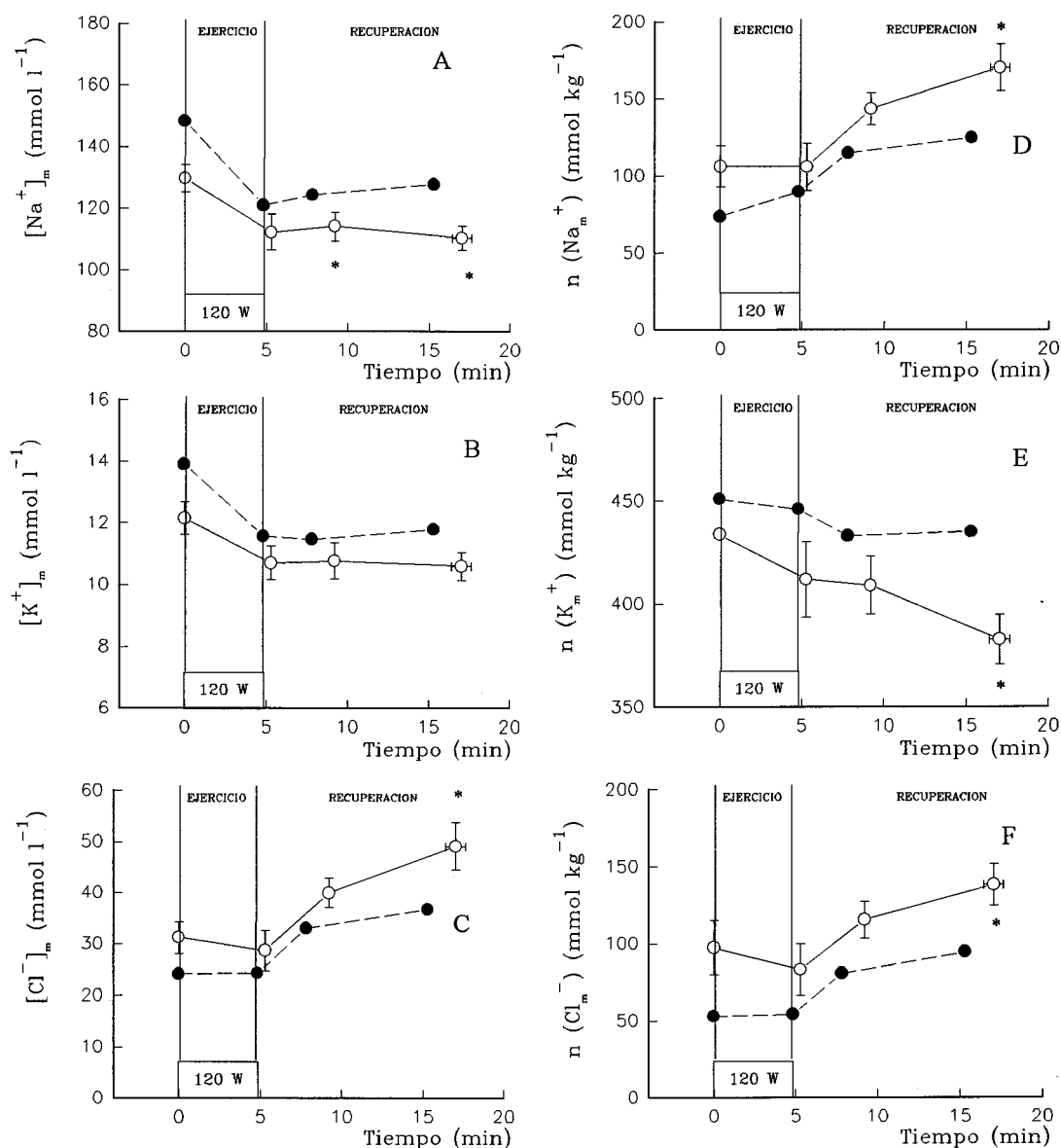
**Figura 46.-** Los valores del agua muscular total ( $\text{H}_2\text{O}_m$ ), obtenidos por los cambios en el peso de la muestra muscular húmeda y seca, se representan en las gráficas A y D. En las gráficas B y C se representan los valores de agua en el espacio extracelular ( $\text{H}_2\text{O}_e$ ) y en el espacio intracelular ( $\text{H}_2\text{O}_i$ ) calculados asumiendo que la distribución del agua se hace según el "espacio de  $\text{Cl}^-$ "; dichos datos se enfrentan con los valores de agua en el espacio extracelular ( $\text{H}_2\text{O}_e$ , en E) y en el espacio intracelular ( $\text{H}_2\text{O}_i$ , en F) calculados asumiendo una distribución de agua similar a la observada para el "espacio de inulina". Los círculos huecos (O) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control. \*, marca las diferencias significativas con respecto al valor de reposo ( $p < 0.05$ ).

Debido a la diferente distribución del agua muscular total en los espacios intra y extracelular del músculo, según se considere el "espacio de  $\text{Cl}^-$ " o el "espacio de inulina", las cantidades totales del soluto (expresadas en número de milimoles por kilogramo de masa muscular) y las concentraciones de los diferentes solutos van a cambiar ostensiblemente en



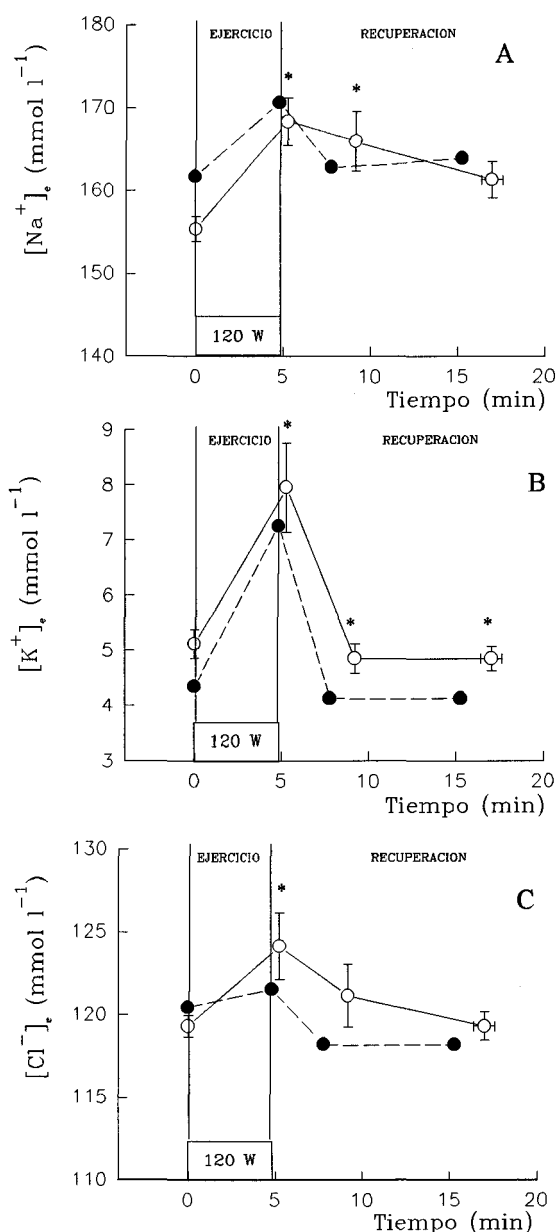
los espacios intra y extracelular; mientras que las cantidades y concentraciones de los distintos solutos en el músculo (considerado como un sólo compartimento) van a tomar un único valor ya que estas fueron las que se midieron directamente.

Como se puede ver en la figura 47, tanto la concentración como el número de moles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$ , se modificaron durante el ejercicio, siendo los cambios diferentes en los sujetos bajo amiloride al compararlo con el control.

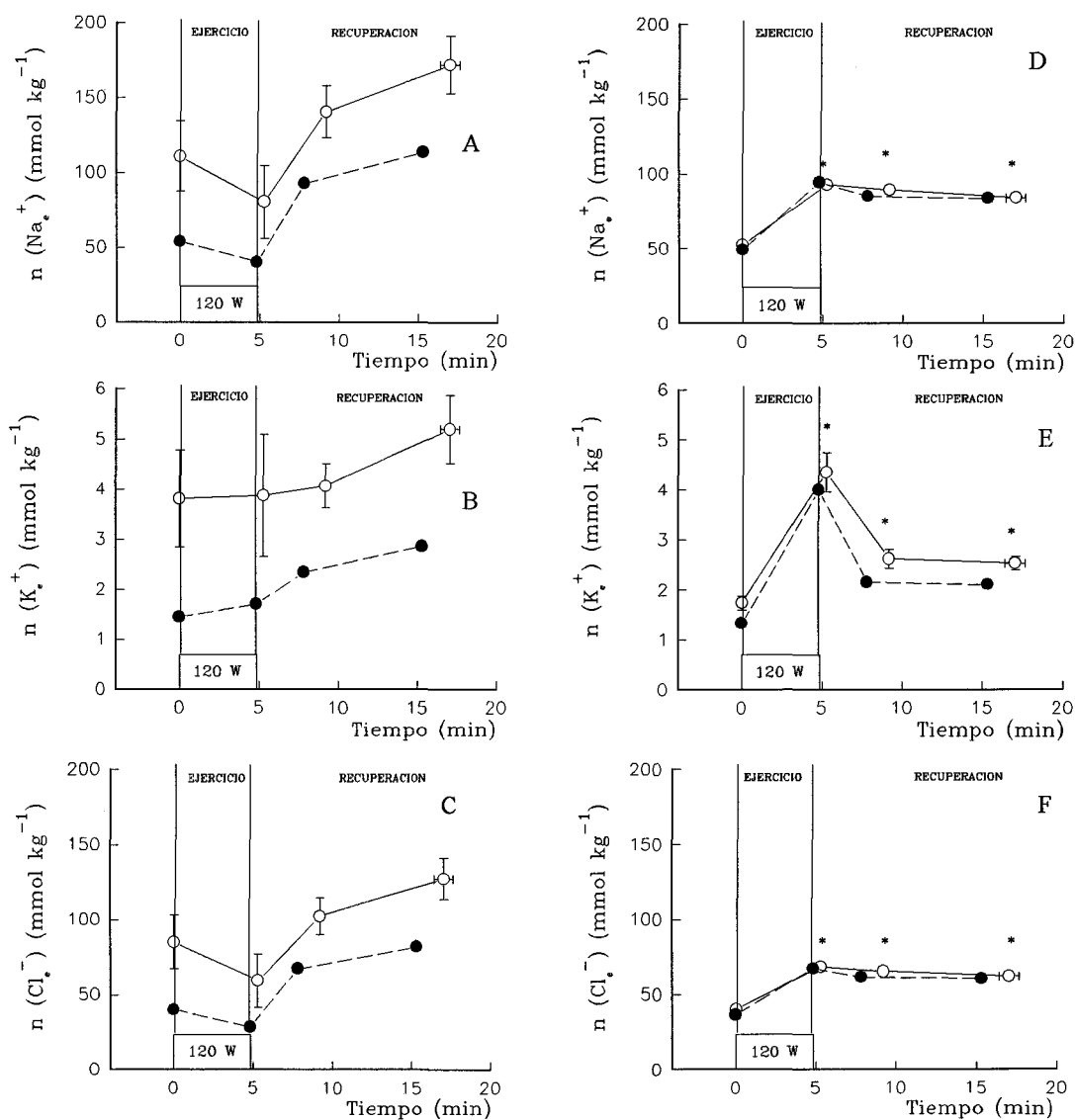


**Figura 47.-** Concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en las muestras musculares:  $[\text{Na}^+]_m$ ,  $[\text{K}^+]_m$ ,  $[\text{Cl}^-]_m$ , representadas en las gráficas A, B y C respectivamente. Se muestran también las cantidades totales o número de moles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el músculo:  $n(\text{Na}_m^+)$ ;  $n(\text{K}_m^+)$  y  $n(\text{Cl}_m^-)$ , representadas en las gráficas D, E y F respectivamente. Los círculos huecos (○) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.

Por otro lado, las concentraciones de los iones en el espacio extracelular se extrapolaron de las concentraciones plasmáticas de los mismos y se representan en la figura 48. No obstante, al calcular las cantidades totales de los distintos iones en el espacio extracelular (expresadas en  $\text{mmol}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), se observa que los valores obtenidos son claramente diferentes según se considere que la distribución de agua dentro del músculo depende del "espacio de  $\text{Cl}^-$ " (figura 49; A, B y C) o del "espacio de inulina" (figura 49; D, E y F).



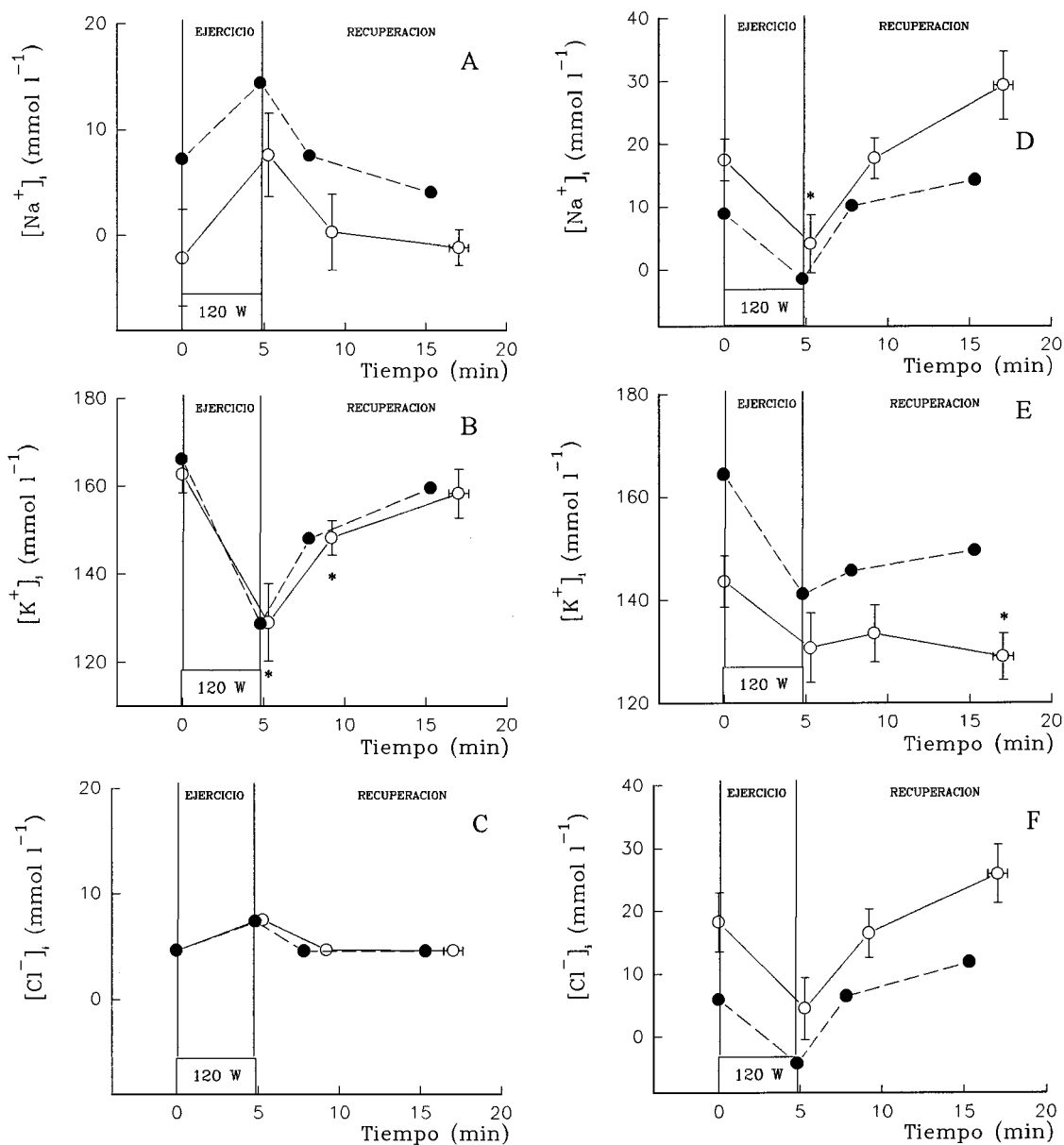
**Figura 48.-** Concentraciones de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el espacio extracelular ( $[\text{Na}^+]_e$ ;  $[\text{K}^+]_e$ ;  $[\text{Cl}^-]_e$ ), durante las pruebas de esfuerzo en los sujetos con y sin amiloride. Los círculos huecos (○) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.



**Figura 49.-** Número de moles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el espacio extracelular ( $n(\text{Na}_e^+)$ ;  $n(\text{K}_e^+)$  y  $n(\text{Cl}_e^-)$ ), representados en A, B y C), considerando la distribución de agua según el "espacio de  $\text{Cl}^-$ ". Dichos valores se enfrentan con los valores del número de moles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el espacio extracelular ( $n(\text{Na}_e^+)$ ;  $n(\text{K}_e^+)$  y  $n(\text{Cl}_e^-)$ ), representados en las gráficas D, E y F), considerando la distribución de agua en el músculo según el "espacio de inulina". Los círculos huecos (O) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.

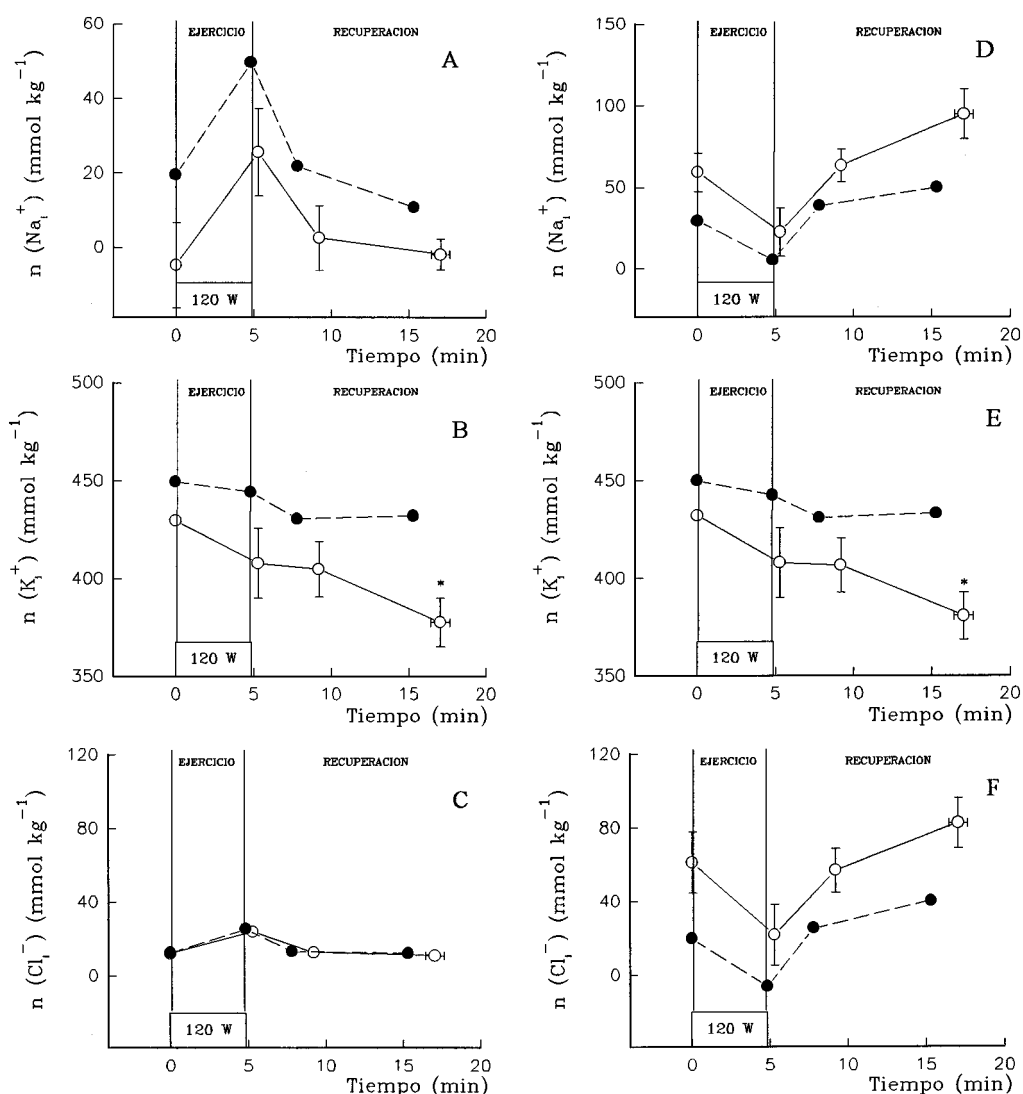
Por otro lado, los datos de las concentraciones y el número de moles calculados para el espacio intracelular por ambos procedimientos (espacios de  $\text{Cl}^-$  y de inulina) fueron también muy diferentes, tal como se puede observar en las figuras 50 y 51 en las que se representan y enfrentan dichos datos durante la prueba de esfuerzo tanto bajo los efectos del amiloride como en situación control. De todos estos datos ambos métodos dan resultados similares sólo en el  $\text{K}^+$ , mientras que para el  $\text{Cl}^-$  y el  $\text{Na}^+$ , los cambios son contrapuestos.

Estos resultados contradictorios se dan para las  $[Na^+]_i$  y  $[Cl^-]_i$  tanto en los cambios vistos en las concentraciones intracelulares (ver figura 50), como en los cambios en el número total de moles de ambos iones (ver figura 51).



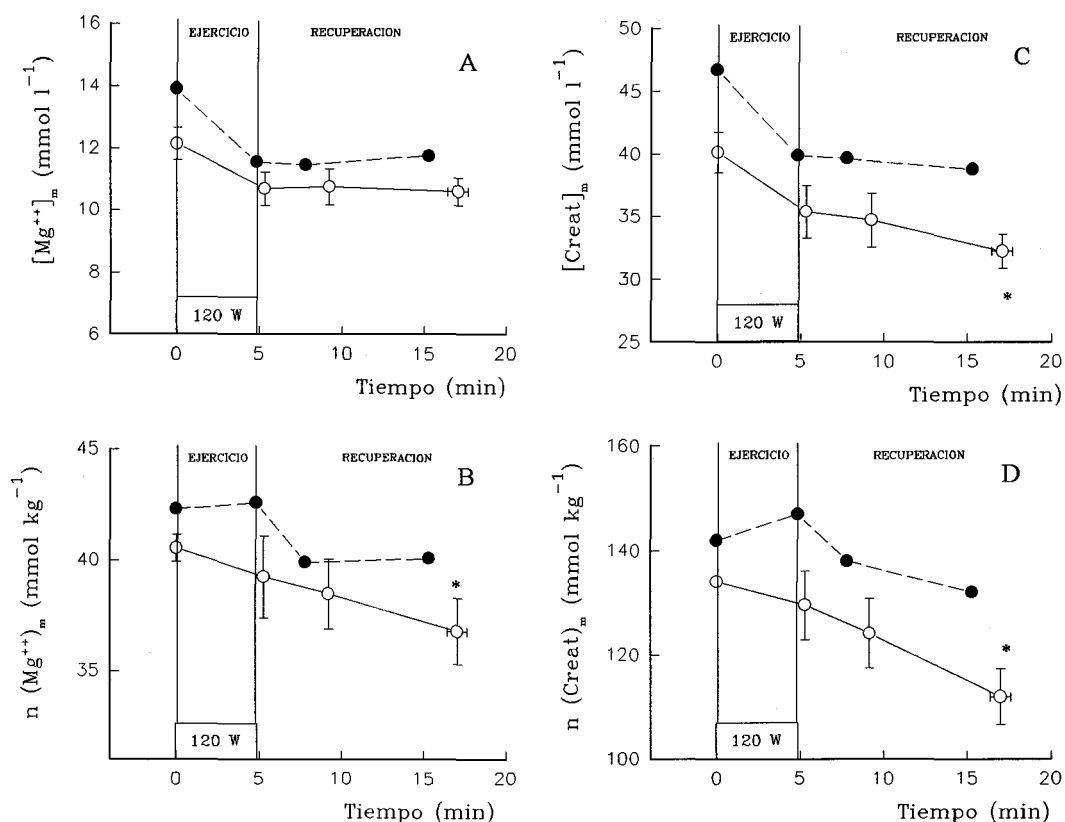
**Figura 50.-** Concentraciones de  $Na^+$ ,  $K^+$  y  $Cl^-$  en el espacio intracelular ( $[Na^+]_i$ ,  $[K^+]_i$ ,  $[Cl^-]_i$ , representadas en A, B y C), los cálculos se realizaron considerando la distribución del agua según "espacio de  $Cl^-$ ". Los valores resultantes al considerar la distribución de agua según el "espacio de inulina" se representan en las gráficas D, E y F. Los círculos huecos (○) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.

Es importante señalar que la pérdida media de  $K^+$  en el músculo fue de  $22 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$  en los AS, lo que significa una cantidad total de 72.6 mmoles eliminados de los cuádriceps femorales.



**Figura 51.-** Número de moles de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Cl}^-$  en el espacio intracelular considerando la distribución de agua regida por el "espacio de  $\text{Cl}^-$ " ( $n(\text{Na}_i^+)$ ;  $n(\text{K}_i^+)$  y  $n(\text{Cl}_i^-)$ ) representadas en las gráficas A, B y C). Idem, considerando la distribución de agua según "espacio de inulina" ( $n(\text{Na}_i^+)$ ;  $n(\text{K}_i^+)$  y  $n(\text{Cl}_i^-)$ ) representadas en las gráficas D, E y F). Los círculos huecos (O) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.

Finalmente, se vio que los descensos en las cantidades totales de magnesio y creatina muscular seguían una cinética similar a las descritas para el  $\text{K}^+$ . En la figura 52 se muestran los cambios en la cantidad total de magnesio muscular ( $n(\text{Mg}^{++})_m$ , en B); concentración de magnesio muscular ( $[\text{Mg}^{++}]_m$ , en A); la cantidad total de creatina muscular ( $n(\text{Creat})_m$ , en D) y la concentración de la misma ( $[\text{Creat}]_m$ , ver C). Estos cambios son similares a los cambios vistos en la figura 47 (B y E) para el  $\text{K}^+$ , por lo que las diferentes relaciones entre  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{++}$  y creatina medidas en las muestras musculares no cambiaron, de forma importante, a lo largo de las pruebas de esfuerzo.



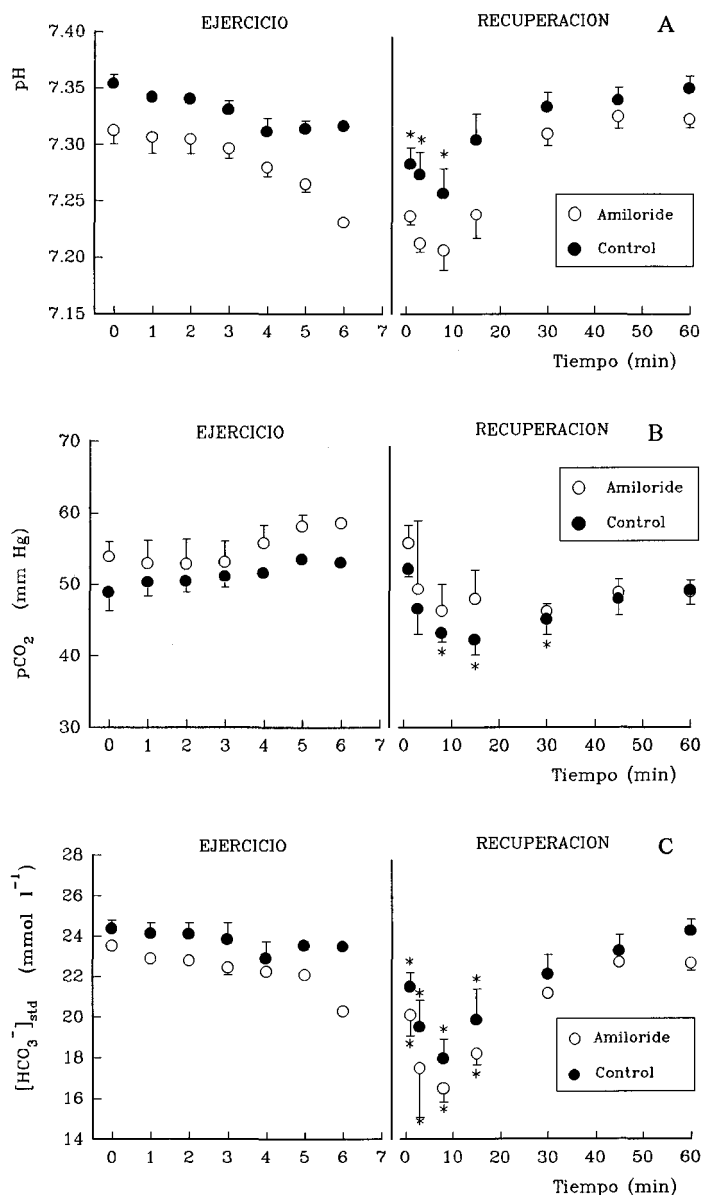
**Figura 52.-** Curso temporal de los cambios en la cantidad total de magnesio muscular ( $n(Mg^{++})_m$ , ver B; concentración de magnesio muscular ( $[Mg^{++}]_m$ , en A; la cantidad total de creatina muscular ( $n(Creat)_m$ , en D; y la concentración de la misma ( $[Creat]_m$ , ver C. Los círculos huecos (○) corresponden a los sujetos bajo el efecto de amiloride y los círculos rellenos (●) a la situación control.

### 2.3.2.- Efectos de la inhibición del antiportador $Na^+/H^+$ en el territorio muscular inactivo durante el ejercicio.

Recordemos que las muestras en estos experimentos realizados en el ergómetro de Andersen, fueron tomadas de una vena de los brazos inactivos tras la ingesta de 0.29 mg de AML/kg de peso. La potencia media desarrollada fue de 100 watt y el tiempo de duración de las pruebas tras la ingesta de AML ( $5.08 \pm 0.9$ ) fue superior al de las pruebas control ( $5.30 \pm 1.0$ ),  $p < 0.05$ .

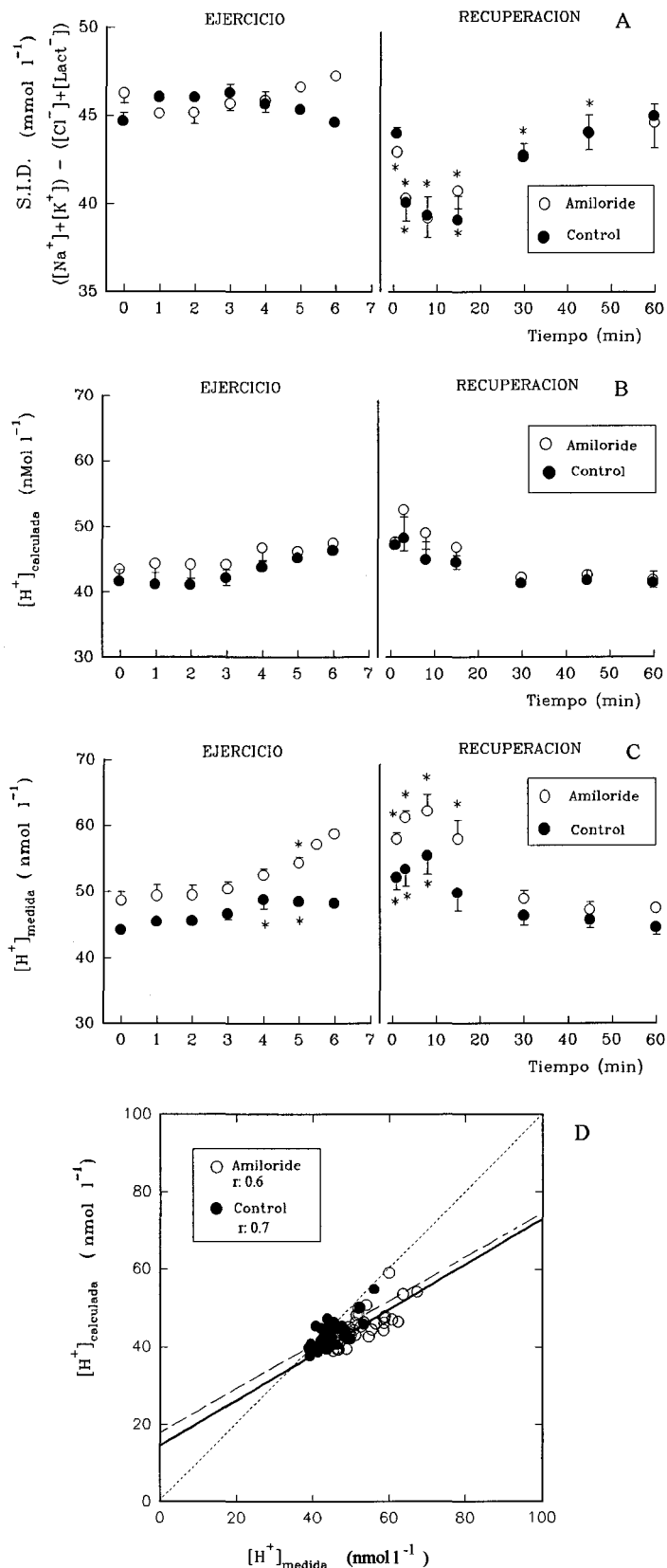
#### 2.3.2.1.- Modificaciones del equilibrio ácido-base.

En cuanto al equilibrio ácido-base, se puede observar en la figura 53 que el amiloride indujo un descenso notable en el pH (ver A) y en la  $[HCO_3^-]_{std}$  (ver C) tanto en reposo como durante la realización del ejercicio y la recuperación; que se asoció a su vez a un ligero incremento en la  $pCO_2$ .



**Figura 53.-** Curso temporal de los cambios inducidos por el ejercicio y el amiloride en el pH (en A), la pCO<sub>2</sub> (en B) y la [HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>]<sub>std</sub> (en C). \*, diferencia frente al valor basal (p < 0.05).

También se aplicó el análisis propuesto por Stewart (1981). Al calcular la diferencia de iones fuertes en plasma o SID (figura 54), se vio que ésta casi no se modificó durante el ejercicio, para caer tras finalizar el ejercicio y presentar una cinética de recuperación lenta, estos cambios están muy influenciados por los cambios en la [Lact<sup>-</sup>]. El uso de amiloride no produjo grandes cambios en dicha variable. Por otro lado, los valores de [H<sup>+</sup>] calculados, con la ecuación de Stewart, difieren ligeramente de los valores medidos, obteniéndose valores calculados inferiores a los medidos al final del ejercicio y al principio de la recuperación. La correlación de valores calculados frente a los medidos presentó un coeficiente de correlación de 0.7 en la situación control y una r: 0.6 tras la ingesta de amiloride. La desviación de la línea de identidad se observó en los niveles altos de [H<sup>+</sup>].

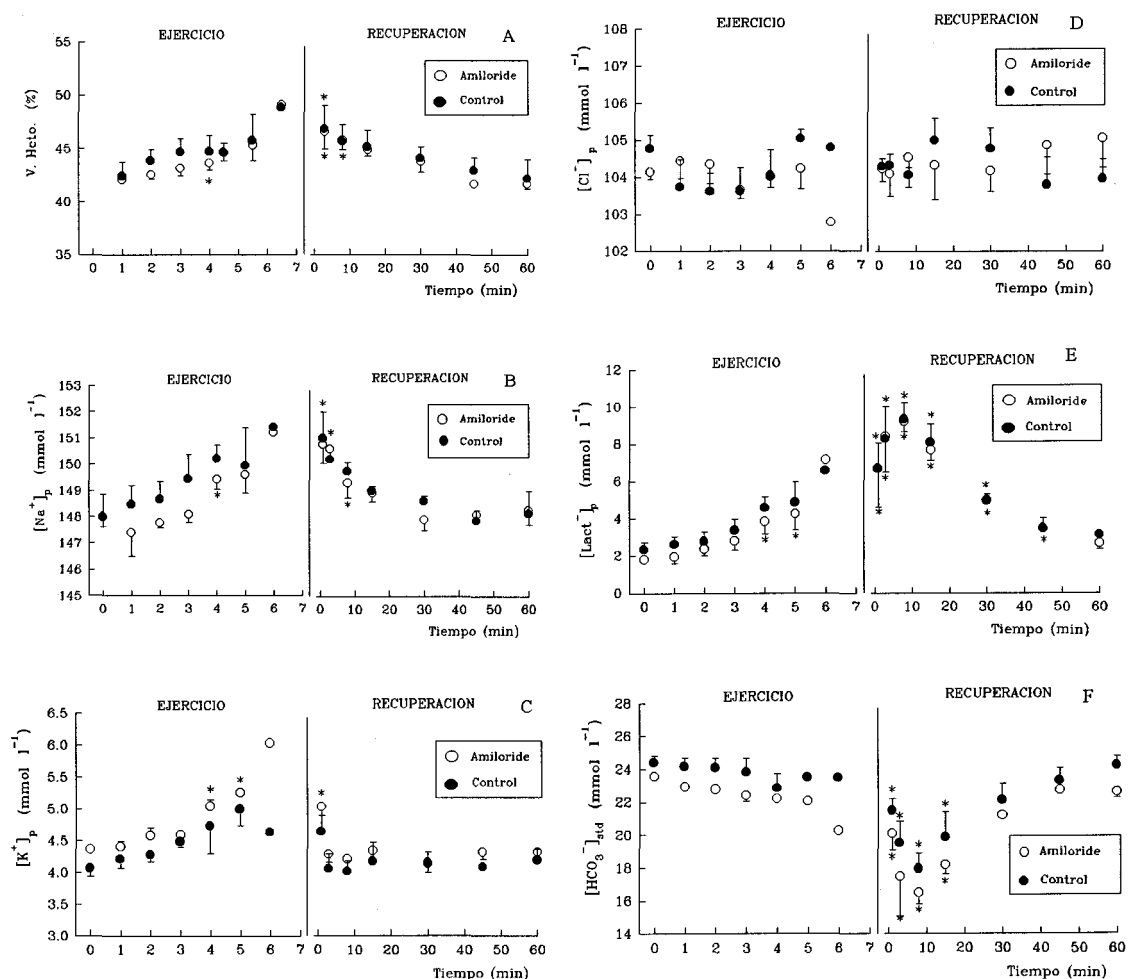


**Figura 54.-** Análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base. En A, se muestra el curso temporal de la SID; en B, la concentración de hidrogeniones calculada a partir del algoritmo de Stewart; en C, se presentan los valores de  $[H^+]$  medidos con el electrodo selectivo y finalmente, en D, se representa la relación de los valores calculados frente a los medidos con sus correspondientes rectas de regresión (línea continua: con AML, línea discontinua: sin AML).



### 2.3.2.2.- Balance hidro-electrolítico.

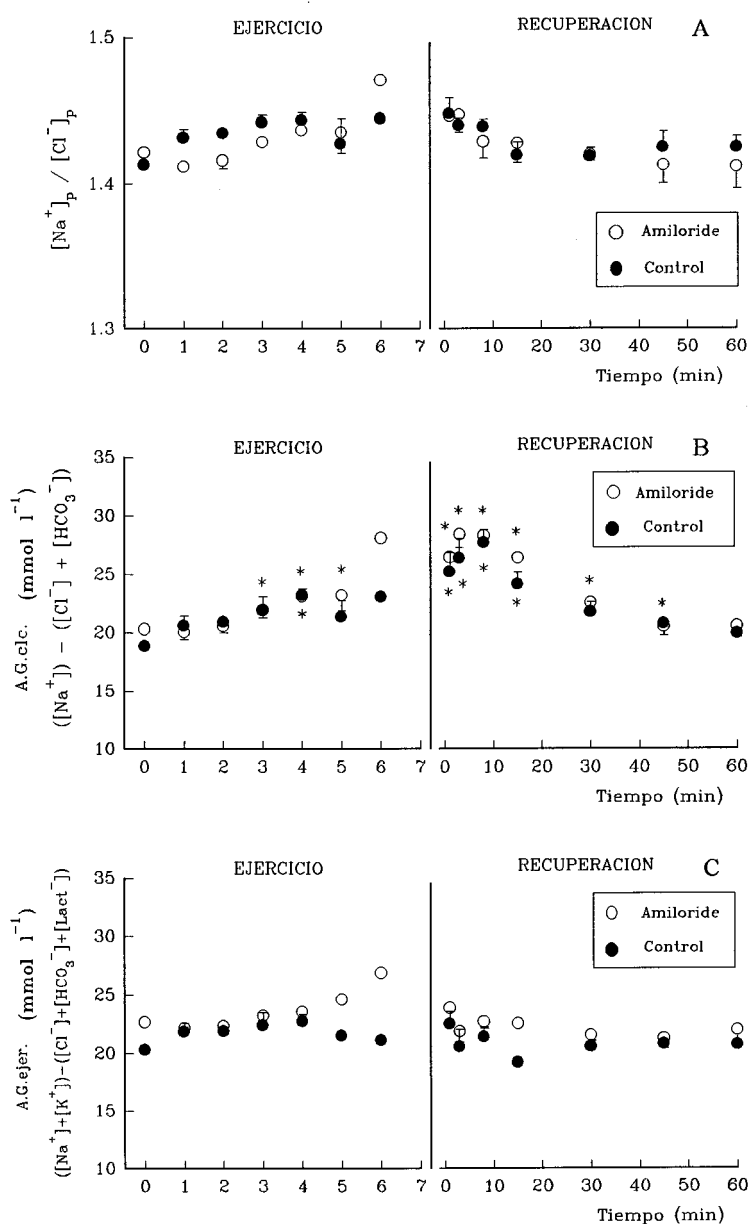
En la figura 55, se observa como los cambios en la  $[Na^+]$  (ver B) son proporcionales a los inducidos por la hemoconcentración secundaria al ejercicio (ver A). No obstante, el resto de iones presenta cambios no explicables por las modificaciones del volumen plasmático; así en la  $[K^+]$  y en la  $[Lact^-]$  se dan incrementos superiores a los simplemente inducidos por la hemoconcentración, mientras que por otro lado la  $[Cl^-]$  no presenta apenas cambios a lo largo de la prueba de esfuerzo y la  $[HCO_3^-]$  presentó un notable descenso. Así mismo, se observan los cambios inducidos por la administración de amiloride.



**Figura 55.-** Curso temporal de las concentraciones plasmáticas de los iones, así como del volumen plasmático. En A se muestran los cambios en el valor hematocrito durante la prueba de esfuerzo. En B se observa la evolución de la  $[Na^+]$  en el plasma de sangre venosa de la fosa antecubital; en C lo mismo para la  $[K^+]$ ; en D para la  $[Cl^-]$ , en E para la  $[Lact^-]$  y en F para la  $[HCO_3^-]$ .

El análisis de los cambios inducidos en el balance hidro-electrolítico se representa en la figura 56. La relación sodio-cloruro (ver A), nos indica que la pérdida de agua en el compartimento plasmático se asoció a una "salida" proporcionalmente mayor de  $Cl^-$  que de  $Na^+$ , por lo que se observa un ligero incremento de ésta relación a lo largo de la fase de

ejercicio para volver a los valores basales en la recuperación. Por otro lado, al aplicar la fórmula del A.G.clc. se observó un incremento importante en los valores obtenidos (ver B), debido al incremento en la  $[Na^+]$  y especialmente a la pérdida de  $HCO_3^-$ . Este "hueco" es producido, durante el ejercicio y principalmente en la primera fase de recuperación, por medio del anión  $lact^-$ ; así, cuando se usa la fórmula con cinco iones, es decir, cuando se calcula el A.G.ejer. (ver C) no se observan cambios importantes, manteniéndose en valores cercanos a 20 a  $25 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  durante toda la prueba de esfuerzo. En las tres variables presentadas el amiloride indujo tan sólo cambios discretos.



**Figura 56.-** Análisis cuantitativo del balance hidro-electrolítico. En A, se muestra la relación sodio-cloruro. En B, el curso temporal del "anion gap" obtenido a partir de los iones  $Na^+$ ,  $Cl^-$  y  $HCO_3^-$ . En C, se representa el "anion gap" calculado a partir de los cinco iones.

2.3.2.3.-  $pO_2$  y  $O_2Hb_{sat}$ 

Finalmente, los cambios inducidos por el AML en la  $pO_2$  y la  $O_2Hb_{sat}$  se presentan en la figura 57, cuyos cambios no fueron tan marcados como los vistos en el territorio muscular activo.

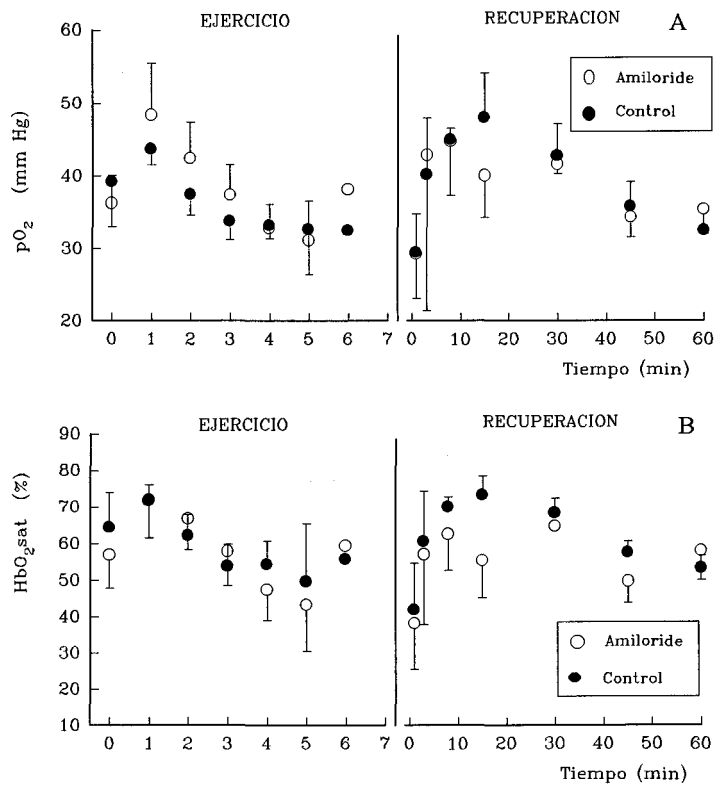


Figura 57.- Curso temporal de la  $pO_2$  (A) y la  $HbO_2$  (B) en sangre venosa del territorio inactivo.

## **DISCUSIÓN**

### **1.- Consideraciones sobre el proceder experimental.**

En el presente trabajo se han estudiado los cambios inducidos por la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , en la respuesta fisiológica al ejercicio físico de alta intensidad, prestándose especial atención a los aspectos relacionados con el equilibrio ácido-base y el balance hidro-electrolítico. Antes de comenzar la realización de los distintos experimentos que implicaban la realización de ejercicio físico, resultaba imprescindible aclarar diversos aspectos sobre la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  por medio del amiloride, siendo fundamental determinar qué dosis debía ser usada; así mismo, había que elegir el tipo de protocolo ergométrico que permitiese un abordaje adecuado de los objetivos planteados en la hipótesis inicial.

#### **1.1.- Determinación de la dosis de amiloride**

Para la elección de la dosis del fármaco se tuvieron en mente una serie de consideraciones previas, teóricas y prácticas, sobre el uso del mismo.

En referencia al **uso *in vitro* del amiloride**, podemos decir que ha sido y es empleado en diversos tipos de preparaciones ya que actúa como inhibidor de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles al amiloride, localizados preferentemente en las células epiteliales, a concentraciones cercanas a 1  $\mu\text{M}$  (este valor representa la constante del equilibrio

aparente de disociación para el amiloride:  $K_{ami}$ ; siendo ésta la concentración de fármaco requerida para inhibir en un 50% el transporte de  $Na^+$ ). Cuando se usan dosis más altas, sobre 1 a 10  $\mu M$  (Garty y Benos, 1988) ó 100-1000  $\mu M$  (Hoffman y Simonsen, 1989) actúa como inhibidor del antiportador  $Na^+/H^+$  ( la variabilidad de la  $K_{ami}$  depende de la sensibilidad del subtipo de antiportador en estudio). Finalmente, en el rango de los milimoles puede actuar como inhibidor del intercambio  $Na^+/Ca^{++}$  (Garty y Benos, 1988). Es importante incidir en que estos valores de  $K_{ami}$  fueron medidos a temperatura ambiente y no a 37° C, por lo que cabe esperar algún cambio en la  $K_{ami}$  a la temperatura corporal durante el ejercicio.

Se ha estudiado ampliamente la inhibición de los canales epiteliales de  $Na^+$  sensibles al AML, de especial significación en el epitelio renal, (para una revisión profunda de este tema ver Garty y Benos, 1988; Smith y Benos, 1991). Este tipo de canal ha sido recientemente clonado (en epitelio renal de rata) y expresado en oocitos (Canessa y col., 1993).

Como se describió en la Introducción, existe un gran número de experimentos *in vitro*, que demuestran la presencia del antiportador  $Na^+/H^+$  prácticamente en todos los tipos celulares estudiados y el efecto inhibidor del amiloride sobre el mismo. Actualmente, se acepta la existencia de dos subtipos de antiportador: uno sensible al amiloride y otro insensible al amiloride (Clark y Limbird, 1991), localizándose el antiportador  $Na^+/H^+$  sensible al amiloride en todo tipo de células (óseas, sanguíneas, musculares, etc.) y en la zona basolateral de la membrana de las células epiteliales tubulares y digestivas, presentando una  $K_{ami}$  de 5  $\mu M$  (como promedio de los distintos tipos celulares estudiados), mientras que el antiportador  $Na^+/H^+$  no sensible al amiloride se localizaría en la zona apical de la membrana de las células epiteliales tubulares y digestivas, presentando una  $K_{ami}$  de 100  $\mu M$  (como promedio de los distintos tipos celulares estudiados).

En preparaciones de tejido muscular esquelético estriado se ha evidenciado la presencia del antiportador  $Na^+/H^+$  y se ha estudiado su papel y comportamiento (en ratón: Aickin y col., 1977 a y b; en pollo: Vigne y col., 1985; en rana: Putnam y col., 1986; Estrada y Sánchez, 1991); no obstante, hasta la fecha no hay experimentos *in vitro* en humanos que demuestren la existencia del mismo así como sus propiedades en este tipo celular concreto. Por tanto, asumida la existencia del antiportador  $Na^+/H^+$  en fibras musculares de seres humanos y su activación con el descenso del  $pH_i$  durante la realización de ejercicio físico de alta intensidad, el uso de un inhibidor del mismo podría provocar modificaciones importantes en la regulación del equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico del compartimento muscular.

Por otra parte, la presencia contrastada del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en otras células del organismo, además de las renales y musculares, no debe ser olvidado. Así, las posibles modificaciones a nivel de las células del cuerpo carotídeo (Buckler y col., 1991 a, b) y en los glóbulos rojos (Escobales y Canessa, 1986) entre otras, deben ser consideradas si se pretende comprender la respuesta sistémica ante la inhibición del mismo.

En cuanto al **uso clínico -in vivo- del amiloride**, podemos decir que es ampliamente conocido por ser un diurético ahorrador de potasio de manejo habitual en la práctica médica, siendo el tratamiento de la hipertensión arterial una de sus principales indicaciones (Weiner, 1990). En cuanto a su potencia como diurético, se ha observado que el máximo efecto con dosis única se obtenía con 40 mg (Baba y col., 1968; Lant y col., 1969), pero al producirse hiperkaliemia y poseer similares efectos antihipertensivos que dosis inferiores, se ha venido aconsejando que a largo plazo - en tratamiento de enfermos crónicos - se usaran dosis de 5-10 mg (Kremer y col., 1977). No obstante, otros autores han usado pautas de 3 x 25mg/día durante 7 días y recomiendan una dosis máxima diaria de 80 mg (Millar y col., 1984), siempre que se controle la hiperkaliemia.

Consecuentemente, en nuestros experimentos se prestó especial atención al control de la hiperkaliemia ya que, si bien inicialmente las dosis elegidas, que oscilaron entre 0.29 y 0.86 mg/kg de peso, no superan las dosis máximas aconsejadas para el uso en humanos (Baba y col., 1968; Lant y col., 1969; Miller y col., 1984), se ha descrito detalladamente la aparición de hiperkaliemia secundaria a la realización de ejercicio físico intenso (Band y col., 1982; Sjøgaard, 1983; Vysocil y col., 1993; Sjøgaard y col., 1985; Harris, 1986; Sejersted y col., 1986; Conway, 1988; Juel y col., 1990; Medbø y Sejersted, 1990; Marcos, 1992; Marcos y col., 1992; Vøllestad y col., 1994); por lo que, la realización de ejercicios de estas características tras la ingesta de AML, a las dosis referidas, requiere un control preciso de los cambios en la concentración de potasio en sangre y adicionalmente del trazado electrocardiográfico.

Por lo expuesto hasta ahora queda claro la necesidad del uso del clorhidrato de amiloride para inducir la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; toda vez que es el único fármaco con capacidad de realizar dicha inhibición usado en humanos. No obstante, es importante hacer un ligero inciso sobre la farmacocinética del mismo, para intentar entender la elección de las dosis empleadas. Estas fueron de 20 a 60 mg vía oral para sujetos de 70 Kg, lo que supone una dosis de 0.29 a 0.86mg/kg de peso, que como

dijimos antes, no fueron en ningún caso superiores a las máximas dosis (1 mg/kg) usadas en otros experimentos (Baba y col., 1968). Con las dosis empleadas, asumiendo una biodisponibilidad del 50% (entre 30-90%, Weiss y col., 1969), un volumen de distribución similar al agua corporal total (60% del peso corporal: 42 l para un sujeto arquetipo), una distribución homogénea del fármaco y puesto que el peso molecular del amiloride es de 266.11 g, se alcanzarían concentraciones de 0.9 a 2.7  $\mu\text{mol l}^{-1}$ , que son valores que podrían producir una inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , al menos en el subtipo sensible al amiloride.

Estos valores no quedan lejos, pero son superiores al pico de concentración plasmática de 0.13 a 0.19  $\mu\text{mol l}^{-1}$  medidos en plasma, a las 3 - 4 h de la ingesta de 20 mg de amiloride (Weiss y col., 1969; Smith y Smith, 1973). No obstante, la diferencia entre dichos valores de concentración se reduciría si existiera un volumen de distribución entre 4.7 y 6.9 veces superior al valor del agua corporal total; es decir, un volumen de 199 y 290 l reduciría los valores de concentración estimados (0.9-2.7  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) hasta los valores medidos a nivel plasmáticos (0.13-0.19  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ), lo que curiosamente concuerda con los datos existentes en la literatura, que muestran valores del volumen de distribución aparente para el amiloride superiores al agua corporal total (Smith y Smith, 1973; Weiss y col., 1969). Por otro lado, el que exista un volumen de distribución superior al agua corporal total puede indicar que el AML se está acumulando en algún territorio periférico, tal y como proponen Smith y Smith (1973). No obstante, hay que considerar que cuando estos autores midieron la concentración de AML en plasma, dentro de este valor no se incluyó la cantidad de dicha sustancia fijada a las proteínas de las membranas plasmáticas de las células existentes en el compartimento vascular. Es decir, si el amiloride se uniese fuertemente; por ejemplo, al antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  de los eritrocitos, la cantidad total de amiloride en el compartimento vascular habría sido obviamente infraestimada en las mediciones realizadas a partir del plasma. Por tanto, teniendo en cuenta que la absorción del fármaco en ayunas se puede elevar al 90% y asumiendo que el valor de  $K_{\text{ami}}$  no se modificó a temperaturas próximas a 37 °C, podemos considerar que a las dosis empleadas, las concentraciones alcanzadas a nivel plasmático podrían considerarse como suficientes para producir la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en diversos compartimentos orgánicos, entre ellos el renal, el vascular y el muscular.

Por tanto, cabe esperar que con el uso *in vivo* de altas dosis de Amiloride en humanos, además de los efectos renales y sistémicos por el bloqueo de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a AML, se diesen efectos secundarios a la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , no sólo a nivel de las células tubulares renales, sino también a nivel muscular, en los glóbulos rojos y en otros tipos celulares. Si dichos efectos no fueran claros en el sujeto en

reposo, era de esperar que la realización de ejercicio de alta intensidad los pusiera de manifiesto. La realización de dichos experimentos no está exenta de posibles riesgos a nivel teórico, pero podrían permitir ahondar en el conocimiento de éste mecanismo básico de regulación ácido-base e hidro-electrolítico.

### **1.2.- Elección del protocolo ergométrico:**

El tipo de ejercicio a realizar por los sujetos experimentales debía presentar una característica fundamental: inducir una acidosis metabólica importante, para activar la puesta en funcionamiento de los distintos mecanismos de compensación y regulación de ésta en el organismo. Dentro de los protocolos que pueden generar este tipo de situación, estarían incluidos todos los que requiriesen el desarrollo de potencias máximas o cercanas a ellas. Entre ellos se encuentran las pruebas máximas progresivas (Hultman y Sahlin, 1981; Brooks y Fahey, 1984; Astrand y Rodhal, 1986; Gaebelain y Ladd, 1986) y los brotes de ejercicio de alta intensidad (Brooks y Fahey, 1984; Hermansen y col., 1984; Medbø y Sejerted, 1985; Astrand y Rodhal, 1986).

Las pruebas máximas progresivas inducen un cambio gradual de la respuesta fisiológica al ejercicio, desde intensidades pequeñas hasta intensidades máximas (ver figuras 1 y 2), por lo que se pueden considerar como el abordaje inicial aconsejable para el tipo de experimentos planteados, debido a la lógica cautelada con la que se debían abordar los experimentos que asociaban AML y ejercicio; además el uso del cicloergómetro se caracteriza por la fácil adaptación del sujeto experimental al ejercicio a realizar y por permitir una aceptable captación de señales y toma de muestras biológicas, destacando la posibilidad de realizar una buena monitorización electrocardiográfica. Por contra, durante las pruebas máximas progresivas se alcanza la zona de bajo pH prácticamente al final del ejercicio, siendo poco habitual que el sujeto experimental continúe realizando el ejercicio en esa situación por un tiempo prolongado.

Con la realización de las pruebas de alta intensidad a potencia constante (ver figura 1 y 2) se alcanza de forma rápida la condición experimental básica: el descenso importante de pH plasmático. Este se ha descrito en diversos tipos de ejercicio, entre ellos el realizado en cicloergómetro (Sahlin y col., 1978; Allsop y col., 1988 y 1989) o en el ergómetro de Andersen (Sjøgaard y col., 1985; Juel y col., 1990). El tiempo elegido (de 3 a 5 minutos) permitía además la toma de varias muestras sanguíneas o maniobras de determinación de LBF, etc., a lo largo de la fase de ejercicio, tal como se describió en Material y Métodos. Por lo que este tipo de protocolo fue usado en segundo término, tras la realización de las pruebas máximas progresivas de forma controlada.



En todo momento se asume que el uso de mascarillas y boquillas no produjo alteraciones significativas de la respuesta ventilatoria (Askanazy y col., 1980; Hirsch y Bishop, 1982; Ward, 1986)

## **2.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ en situación de reposo.**

Antes de someter a los distintos sujetos experimentales a la realización de ejercicio en situación de inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (bajo los efectos del amiloride), por motivos éticos obvios, se realizaron una serie de experimentos en reposo, a fin de obtener información inicial sobre los efectos del amiloride a altas dosis y su posible uso durante la realización de ejercicios de alta intensidad.

En el experimento inicial (dosis única de 0.29 mg/kg de peso, sin restricción en la dieta), se realizó un primer acercamiento al uso del AML, con la intención de conocer sus efectos globales en el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico a nivel renal y si éstos podían llegar a producir alteraciones importantes en el medio interno. Los datos de este primer experimento mostraban que los efectos renales eran claros y coincidían en todo caso con lo referido en la literatura (Weiner, 1990), mostrando al AML como un diurético de potencia media, ahorrador de  $\text{K}^+$ , que induce pérdidas de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{HCO}_3^-$ , generando una alcalinización de la orina, como se muestra en la figura 4; no obstante, estos efectos renales no se acompañaron de cambios notables en el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico a nivel sanguíneo (ver figura 6 y tabla II).

Por lo visto en este experimento, cabría pensar que la dosis fue insuficiente (por ser única y no repetirse a lo largo del tiempo) o que se activaron mecanismos compensatorios que contrarrestaron la incidencia de los cambios renales a nivel sanguíneo, o ambas cosas. Por otro lado, ya que los sujetos hacían vida habitual sin restricción dietética, no se deben olvidar los posibles efectos de la dieta, tanto en la disminución de la absorción del fármaco, como sus posibles efectos en el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico (Greenhaff y col., 1987 a y b; Greenhaff y col., 1988 a y b; Charney y Feldman, 1989; Weiner, 1990). Para intentar aclarar si la dosis fue baja para producir efectos sistémicos, se planteó el experimento en el que administraron 20 mg de AML -para 70 kg de peso- cada 6 h, hasta completar un total de tres dosis (0.86 mg/kg de peso, en total).

Los datos del experimento con dosis múltiple de amiloride, indican que los efectos del fármaco a nivel renal se mantienen a lo largo del tiempo tanto para el ahorro de  $\text{K}^+$  como para el incremento de pH, mientras que algunas variables presentan una ligera

disminución en las horas finales ( $[\text{HCO}_3^-]_{\text{or}}$ ), y otras presentan francas caídas a lo largo del tiempo ( $\text{pCO}_2$ ), ver figuras 4 y 5. Por otro lado, a nivel sanguíneo se vio un descenso de la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{pv}}$ , sin que esto se acompañara de cambios claros en el pH plasmático, lo que se explica en algunos casos por la caída simultánea de la  $\text{pCO}_2$  (figura 6). En cuanto a la concentración de los iones en plasma, existe un cambio en el comportamiento de la cinética de la  $[\text{K}^+]_{\text{pv}}$ , ya que se pasa de una caída en el experimento con dosis única, a una ligera tendencia a la subida en el experimento con dosis múltiple (ver figura 6 y tabla II).

Analizando los datos obtenidos con ambos experimentos de forma conjunta (dosis única y múltiple, no ayunas), se observa que todas las variables controladas en orina presentan cambios importantes (ver figuras 4) y que en el caso de los iones en orina, dichos cambios conllevaron modificaciones notables en la excreción final de los mismos (ver figura 5 y tabla I), a pesar de que el incremento de la diuresis fue discreto y transitorio (figura 4 F). No obstante, se puede decir que estos cambios a nivel renal no se asociaron a cambios paralelos en plasma (ver figura 6 y tabla II). Esto es importante, ya que por un lado se observa que la administración de altas dosis de AML de forma única o a corto plazo, en personas sanas que realizan su vida habitual, no conlleva la presencia de hiperkalemia ni de acidosis metabólica, que son los principales efectos secundarios descritos con la administración continua o en tratamientos de tipo crónico (Weiner, 1990; Millar y col., 1984); lo cual nos permitía el uso de dicha sustancia en asociación al ejercicio físico intenso con menor grado de reserva. Pero por otro lado, indica la presencia de mecanismos compensadores a nivel orgánico, que contrarrestan los cambios inducidos a nivel renal en las condiciones experimentales descritas (ver figura 8), lo que concuerda con lo observado en experimentos con dosis similares a largo plazo (Millar y col., 1984).

Es necesario un análisis en profundidad de los resultados obtenidos para entender la importancia de los cambios observados, para lo cual se deben considerar de forma conjunta cuáles fueron las cantidades totales (de agua e iones) eliminadas o ahorradas a nivel renal (figura 5 y tabla I), cuáles fueron las pérdidas o ganancias a nivel plasmático (ver figura 6 y tabla II), qué pérdidas o ganancias proporcionales suponen los cambios renales frente a los del medio interno (en cierta forma reflejado en la figura 7) y la existencia de mecanismos capaces de compensar dichos cambios (figura 8 y tabla III).

El incremento discreto y transitorio observado en la **diuresis**, concuerda con la consideración del AML como diurético de tipo medio, en cuanto a su potencia (Weiner, 1990). No es fácil valorar en nuestros experimentos, si realmente el incremento de la diuresis que induce el AML es transitorio y si dicho efecto cambia o no a largo plazo, ya

que para ello hubiera sido necesario controlar la evolución de los cambios inducidos por el AML en el volumen total de la orina, recogida en 24 h y en un periodo más prolongado de tiempo. Esto ha sido estudiado en situaciones experimentales similares, en las que con administración a largo plazo (7 días) de dosis de 75 mg/día de AML, se vio un incremento mantenido de la diuresis (Millar y col., 1984). En todo caso, en nuestros experimentos la pérdida de agua a nivel renal parece ser contrarrestada a nivel sistémico, ya que no se observaron signos de hemodilución o hemoconcentración tras la administración de amiloride (ver figura 8). Si el agua procede de la ingerida con la dieta o de algún territorio sistémico no puede ser contestado con nuestros datos; no obstante, resulta interesante observar que en las muestras de tejido muscular no parece darse una pérdida importante de agua en dicho territorio en condiciones de reposo (ver figura 46, A y D).

Entre la 3<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> hora se dio un incremento del volumen total de orina que no se acompañó de cambios proporcionales en los iones, esto explica en parte las caídas de la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{OR}}$ , de la  $[\text{Na}^+]_{\text{OR}}$  y de la  $\text{pCO}_2$  en ese periodo de tiempo. Es difícil conocer cual fue el mecanismo que indujo tal comportamiento, pero lo que queda claro es que coincidiendo con esta "dilución" se cambia la cinética ascendente de la cantidad de iones de  $\text{Na}^+$  y  $\text{HCO}_3^-$  eliminados por la orina, que en nuestros experimentos no demuestran cambios evidentes con la posterior administración de nuevas dosis de AML (comparar figuras 4 y 5). Se ha visto que cuando se administran las mismas dosis de AML, a largo plazo (Millar y col., 1984), se activa la cascada renina-angiotensina-aldosterona, lo cual podría ocurrir a corto plazo (horas) y explicaría en parte la caída del volumen total de orina (además de inducir la eliminación de potasio a nivel renal). No obstante para el incremento visto en el volumen total de orina entre la 3<sup>a</sup> y 7<sup>a</sup> hora habría que buscar otros mecanismos.

El  $\text{Na}^+$  presentó una pérdida cuantitativamente importante a nivel renal (figuras 4 y 5), superando la suma de las pérdidas en el resto de los iones medidos y excretados a nivel renal (tabla I). No obstante, los cambios observados a nivel plasmático fueron del 2% de la concentración plasmática inicial (tabla III). Por tanto hay un mecanismo compensador que repuso dichas pérdidas (tabla III y figura 8). Aún más, frente al  $\text{Na}^+$  orgánico intercambiable (4060 mmoles, -Ganong, 1992-), el hecho de reponer de 45.5 a 78.7 mmoles supondría un desplazamiento del 1.1 al 1.9% hacia el compartimento plasmático, a lo que habría que restar el  $\text{Na}^+$  aportado previsiblemente por la dieta, ya que estos experimentos no se realizaron en ayunas. No parece ser que el  $\text{Na}^+$  provenga del territorio muscular ya que se observó un incremento en el número total de moles de dicho ion en este territorio. (ver figura 47).

Los cambios en los niveles de  $\text{HCO}_3^-$  presentaron una evolución similar a la descrita para el  $\text{Na}^+$  (figuras 4 y 5), resultando ser la cantidad excretada de  $\text{HCO}_3^-$  a nivel renal, un 20% de la cantidad excretada de  $\text{Na}^+$  en cualquier momento (tabla I). A pesar de la notable pérdida a nivel renal (ver figura 5 y tabla I), la pérdida inducida a nivel plasmático osciló entre 0.5 y 8% de la concentración plasmática inicial, estimándose una reposición equivalente al 11-12% de dicha concentración (tabla III). No obstante, en este caso la reposición rápida del  $\text{HCO}_3^-$  se hará por medio del sistema de reciclado intraeritrocitario del mismo o ciclo de Jacobs-Stewart. (Foster, 1988; Klocke, 1988; Bidani y Crandall, 1988; Alberts, 1989; Alper, 1991; Gros, 1991). Aunque, en el rango de tiempo en el que se desarrollaron estos experimentos, tampoco se puede descartar la puesta en escena de otros mecanismos compensadores, a nivel del tubo digestivo (Charney y Feldman, 1989) u óseo (Bushinsky, 1989), si bien se debe esperar que sean de escasa importancia frente al mecanismo anterior.

Los  $\text{H}^+$  que fueron ahorrados a nivel renal (figura 4 y 5), son retirados o tamponados en el plasma de forma total (tabla II, ver pH), a pesar de que el ahorro de los mismos fue el de mayor importancia proporcional o relativa de las variables controladas (figura 7 y tabla III). Esto indica la precisión, capacidad y potencia de los sistemas de regulación del pH a nivel sistémico en general, y a nivel sanguíneo en particular. En estos experimentos, es de esperar que el papel fundamental, a nivel sistémico, lo desarrolle el par tamponador carbónico/bicarbonato, influyendo en el pH final tanto los niveles de  $\text{HCO}_3^-$  como los de  $\text{pCO}_2$  (Boron W, 1989 a y b; Gunn R. B., 1989). Es importante remarcar la importante reducción del transporte tubular neto de  $\text{H}^+$  (" $\alpha$ ") que se tiene que dar para que se eleve el pH de forma importante en orina (figura 7). Según nuestros cálculos dicho transporte quedó prácticamente anulado, por lo que previsiblemente se hayan afectado los dos mecanismos que controlan de forma prioritaria la secreción de  $\text{H}^+$ : el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el túbulo proximal y la bomba de  $\text{H}^+$  en el túbulo contorneado distal y conducto colector. El primero por la acción directa del AML sobre el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Garty y Benos, 1988), el segundo por la reducción de la diferencia de potencial transepitelial o transtubular secundaria a la inhibición de la reabsorción de  $\text{Na}^+$ , ya que como describen Koeppen y Giebish (1989), al no retirarse sodio el interior del túbulo sería menos negativo, lo que reduce la salida de  $\text{H}^+$  desde la célula; si bien la presencia de  $\text{HCO}_3^-$  tendría el efecto contrario en este mecanismo. Así mismo, hay que recordar que para un conocimiento más detallado de los cambios en el equilibrio ácido-base a nivel renal hubiera sido conveniente controlar los cambios en la excreción neta de ácidos, en la excreción de amonio y en la acidez titulable; además existen mecanismos complejos de regulación de la excreción de los distintos iones a nivel renal, difíciles de abordar desde los experimentos realizados (Koeppen y Giebish, 1989; Sabatini y Kurtzman, 1989).

El  $K^+$ , que fue ahorrado de forma importante a nivel renal (figuras 4 y 5, tabla I) previsiblemente por medio del mismo mecanismo descrito para el  $H^+$  en el túbulo contorneado distal y conducto colector (Koeppen y Giebish, 1989). Dicho ahorro supuso una cantidad adicional considerable cuando se refiere al compartimento plasmático (figura 7) pero fue retirado casi totalmente del mismo (tabla III), si bien, la cantidad compensada no supondría un incremento adicional importante (0.5-1.2%) en la cantidad total de  $K^+$  orgánico que viene a ser unos 3.150 mmoles (Ganong, 1992); no obstante, no parece que éste se acumule en el compartimento muscular (figura 47, E). En el experimento con dosis única no se observa la relación inversa clásica entre la reabsorción de  $HCO_3^-$  a nivel renal y la  $[K^+]$  en plasma (Pitts, 1969, Brenner y Berliner, 1973), pero dicha situación se invierte en el experimento con tres dosis, cumpliéndose por tanto dicha relación.

Estos datos vuelven a indicar, al igual que ocurría tras administrar una dosis de 0.29 mg/kg, que para que se den cambios evidentes a nivel orgánico con el uso de AML, se requiere la administración prolongada del mismo. Por otro lado, cuando los sujetos guardan ayuno, tal como se detalla en los experimentos previos a la realización de la prueba de esfuerzo en el ergómetro de Andersen, parece que se observan cambios más evidentes a nivel del equilibrio ácido-base en sangre (ver figura 6 y tabla II), lo cual puede ser debido a una mayor absorción del fármaco (Grayson y col., 1971; Smith y col., 1973; Weiner, 1990) y a que desaparecen los cambios que la dieta pudiera inducir en el equilibrio ácido-base e hidro-electrolítico a nivel sanguíneo (Greenhaff y col., 1987 a y b; Greenhaff y col., 1988 a y b; Charney y Feldman, 1989).

Los cambios producidos a nivel renal por el AML, nos dan una información inicial de las modificaciones globales en el intercambio hidro-electrolítico y en el equilibrio ácido-base a nivel renal y sistémico, que previsiblemente son secundarias a las acciones concretas del fármaco sobre las proteínas de membrana, canales o transportadores iónicos, sensibles a él. Tras analizar los datos de los experimentos con dosis única y múltiple con control de orina se puso en evidencia que con el uso de AML:

1.- Aumentó la  $[Na^+]_{OR}$ , la  $[HCO_3^-]_{OR}$  y el  $pH_{OR}$ , lo que está en concordancia con una disminución de la reabsorción de  $Na^+$  y con la reducción del intercambio  $Na^+/H^+$ , previsiblemente secundarias a la inhibición de los canales de  $Na^+$  y del antiportador  $Na^+/H^+$ , ambos sensibles al amiloride. Este efecto se produciría de forma preferente en el túbulo contorneado proximal (Garty y Benos, 1988; Sabatini y Kurtzman, 1989). A lo que posiblemente esté asociado, la reducción de la secreción activa de  $H^+$  en el conducto colector, por el mecanismo antes citado (Koeppen y Giebish, 1989).

2.- Por otro lado, la  $[K^+]_{OR}$  cayó prácticamente a cero, en concordancia con una

reducción del intercambio  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , previsiblemente secundarias a la inhibición de los canales de  $\text{Na}^+$  en las células del túbulo distal y colector, por la reducción en la diferencia de potencial transepitelial que esto conlleva, tal como se vio antes para el  $\text{H}^+$  (Canessa y col., 1993; Garty y Benos, 1988; Sabatini y Kurtzman, 1989).

Si el AML se distribuye tal como se explica en sección previa de la Discusión (ver 1.1), cabe esperar que los mecanismos de transporte afectados a nivel renal se afecten en otros compartimentos del organismo (vascular, muscular, etc.), y que esto sea puesto de manifiesto de manera especial durante el ejercicio físico intenso. Por tanto, la situación experimental que se prevé con el uso de altas dosis de AML y la realización de ejercicio de alta intensidad, es la de sujetos en condiciones basales de normalidad o ligeros desbalances compensados (en lo referente al equilibrio ácido-base y balance hidroelectrolítico), pero con supuesta inhibición de los canales de  $\text{Na}^+$  sensibles a AML y del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  a nivel sistémico. Lo cual queda lejos del uso del AML para tratamientos crónicos de hipertensión arterial.

### **3.- Efectos de la inhibición del antiportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ durante el ejercicio físico.**

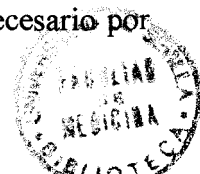
El estudio de los efectos del AML durante la realización de ejercicio físico, a las dosis empleadas, se abordó de forma gradual. En primer lugar y además de los experimentos realizados en reposo, se hicieron una serie de experimentos preliminares con ejercicio de tipo submáximo y con dosis progresivamente crecientes (datos no presentados), en los cuales se comprobó que en ningún caso existieron anomalías, ni efectos secundarios durante el desarrollo de las pruebas de esfuerzo. Una vez comprobada dicha circunstancia se procedió a la realización de los experimentos finales, cuyos resultados han sido presentados.

En primer lugar se observó que en los **experimentos realizados en cicloergómetro**, ya fuesen pruebas máximas progresivas o a potencia constante, los cambios inducidos por el amiloride fueron de escasa importancia, no observándose cambios en la respuesta cardio-respiratoria y metabólica, controlada con el ergoespirómetro computarizado (CPX).

El concepto de acidosis láctica durante el ejercicio fue establecido hace bastante tiempo (Hill, 1932), desde entonces se han publicado un gran número de trabajos, que han puesto de manifiesto la correlación entre los cambios observados en la respuesta cardio-respiratoria y los cambios en las distintas variables en relación con el equilibrio ácido-base, medidas a nivel sanguíneo; siendo éste uno de los aspectos más discutidos y

desarrollados dentro de la Fisiología del ejercicio (Jones y col., 1977; Karlsson y Jacobs, 1982; Hughson y Green, 1982; Brooks y Fahey, 1984; Lind, 1984; Powers y col., 1984; Wasserman, 1984 a y b; Brooks, 1985; McLellan, 1985; Beaver y col., 1986 a y b; Davis, 1985; Wasserman y col., 1986 a y b; Walsh y Banister., 1988 Yoshida y col., 1989; Koike y col., 1990 Brooks, 1991); sin que se pueda afirmar en la actualidad que exista un claro consenso en diversos puntos: terminología, mecanismos fisiológicos implicados, etc.. Con respecto a este punto, en nuestros experimentos, se observó que el amiloride tampoco indujo cambios importantes en las distintas variables sanguíneas controladas, implicadas en el equilibrio ácido-base (ver figuras 14 y 15). Esto estaría en concordancia con la establecida correlación entre cambios en el equilibrio ácido-base y en la respuesta cardio-respiratoria. Es decir, ya que no se dieron cambios en el equilibrio ácido-base, no se deben esperar cambios en la respuesta cardio-respiratoria. No obstante, es interesante en este momento, remarcar la presencia de un incremento en la  $[K^+]_{pv}$ , que parece ser un elemento común presente en todos los sujetos que realizaron ejercicio tras la ingesta de AML (figura 15).

Considerando que el antiportador  $Na^+/H^+$  parece jugar un papel en el control del pH intracelular en las células tipo I del cuerpo carotídeo y la relación  $pH_e/pH_i$  en éstas células tiene un papel preponderante en la respuesta ventilatoria ante los cambios de pH plasmático (Buckler y col., 1991, a y b), y puesto que se conoce la importancia de los cuerpos carotídeos en la respuesta ventilatoria en seres humanos durante el ejercicio (Wasserman y col., 1975 y 1986; Rausch y col., 1991) era de esperar cambios importantes en la respuesta ventilatoria durante el ejercicio físico tras la ingesta de amiloride. Más aún, existe un gran número de trabajos que han estudiado la elevación de  $K^+$  en el plasma y que sugieren el papel del potasio como posible inductor de cambios en la respuesta ventilatoria durante el ejercicio (Band y col., 1982; Conway y col., 1988; Linton y Band, 1985; Burger y col., 1988; Newstead, 1988; Bascom y col., 1989; Donaldson y col., 1989; Newstead y col., 1990; Yoshida y col., 1990; Busse y col., 1991); siendo mediadas dichas modificaciones en la respuesta ventilatoria por cambios en la sensibilidad de los quimiorreceptores periféricos y centrales, aunque también pueden ser generadas a partir de la estimulación de las terminales nerviosas sensoriales (fibras tipo III y IV) en el medio extracelular del territorio muscular activo (McCloskey y Mitchell, 1972; Sjøgaard y col., 1985; Ward y col., 1987). No obstante, a pesar de la presencia de  $[K^+]$  plasmático más elevadas en los sujetos que ingirieron AML (figura 15), sólo se observaron cambios moderados en la respuesta ventilatoria durante el ejercicio físico tras la ingesta de amiloride comparada con la situación control (figuras 9, 10, 20 y 21). Como antes se propuso, es posible que el hecho de no realizar las pruebas en ayunas haya sido un factor determinante de estos resultados (Greenhaff y col., 1987 a y b; Greenhaff y col., 1988 a y b; Charney y Feldman, 1989). Para un abordaje correcto de este tema sería necesario por



tanto, la realización de nuevos experimentos destinados a estudiar este punto en concreto.

Los efectos más destacados de la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se observaron en los sujetos que realizaron la prueba de esfuerzo de alta intensidad, en el **ergómetro de Andersen**, sobresaliendo la presencia de valores altos de  $p_{\text{v}}\text{O}_2$ , principalmente al final del ejercicio, la acumulación de lactato en el interior de los eritrocitos y los mayores tiempos de duración de las pruebas. Además, en los **AS** el  $\text{pH}_a$  presentó valores inferiores que los de **CS**, en cualquier punto del experimento, y durante la recuperación, el  $\text{pH}_v$  de los **AS** mostró una cinética más lenta en su vuelta hacia los valores basales.

De hecho, el mayor tiempo de duración de las pruebas fue un resultado inesperado, puesto que los efectos del AML a nivel renal tienden a incrementar la  $[\text{K}^+]$  y a reducir los niveles de  $\text{pH}$  y  $[\text{HCO}_3^-]$  plasmáticos en reposo, tal y como demuestran nuestros datos y en concordancia con otros autores (Mahnesmith y Aronson, 1985; Garty y Benos, 1988). Pero además, al realizarse el ejercicio bajo la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , cabría esperar el consiguiente acúmulo de  $\text{H}^+$  en el interior de las células, al menos en las fibras musculares activas (Aronson, 1985; Aickin, 1986; Hoffmann y Simonsen, 1989). Es curioso observar que los **AS** mostraron niveles superiores de  $p\text{O}_2$  que los **CS** en los niveles inferiores de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  (ver figura 43, en concreto los valores en sangre venosa durante el ejercicio). El efecto de una  $p\text{O}_2$  elevada sobre la mayor capacidad de realizar ejercicio es un hecho contrastado (Hugh, 1982), aunque los mecanismos por los que se produce tal efecto no están totalmente aclarados; pudiendo ser éste uno de los factores que determine el incremento del tiempo de duración de las pruebas. Además, es interesante resaltar, en relación con este desplazamiento del tiempo de aparición de la fatiga, que nuestros datos mostraron valores de  $\text{VO}_2$  al final del test más elevados en **AS** que en **CS** (figuras 40 y 45).

Los cambios en la  $p_{\text{v}}\text{O}_2$  durante el ejercicio mostrados en todos los sujetos (figura 44), son consistentes con un desplazamiento a la derecha de la curva de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  durante el ejercicio. No obstante, los **AS** mostraron una mayor desviación a la derecha de la curva de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$ , probablemente debido a un incremento de  $[\text{H}^+]$  y de  $[\text{Lact}^-]$  en el interior del eritrocito, inducido por la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . De hecho, en la figura 43 que enfrenta  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  y  $p\text{O}_2$  en sangre venosa, se observan valores (medidos en hemoxímetro) de 25% de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  para  $p_{\text{v}}\text{O}_2$  de 35 mm Hg en los **AS**, mientras que en el **CS** se observaron valores del 25% de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  para una  $p_{\text{v}}\text{O}_2$  de 25 mm Hg, concordando estos últimos con los descritos habitualmente en la literatura (Andersen y Saltin, 1985; Bangsbo y col., 1990), ver puntos A y B en figura 43. Por otro lado en la figura 42 se observa que cuando los valores de  $\text{O}_2\text{Hb}_{\text{sat}}$  fueron calculados por medio de la ecuación de Kelman y Thomas (Kelman, 1966; Thomas, 1972), que hace uso de los



valores de  $pO_2$ ,  $pH_e$  (plasmático) y del exceso de base, no se observaron diferencias importantes en la situación control entre dichos valores calculados y los obtenidos por medición en el hemoxímetro. Mientras que, los valores de  $O_2Hb_{sat}$  calculados para los AS fueron mayores que los obtenidos por medición con el hemoxímetro, especialmente al final del ejercicio. Puesto que en ambos casos, tanto para los valores medidos como para sus correspondientes calculados, las condiciones experimentales (es decir  $pH_e$ , B.E. y  $pO_2$ ) eran idénticas, y puesto que en la ecuación de Kelman y Thomas no se incluye el  $pH_i$  (intra-eritrocitario), los cambios en el comportamiento de la Hb, y por ende, la diferencia entre los valores de  $O_2Hb_{sat}$  medidos y calculados están indicando una alteración de la relación  $pH_e - pH_i$  en el eritrocito, que habitualmente se considera de 1:1 (ver figura 43). Esto concordaría con los datos de la literatura, ya que se ha demostrado, en seres humanos, que el AML al actuar como bloqueador del antiportador  $Na^+/H^+$  induce una disminución del  $pH_i$  de los eritrocitos (Grinstein y Rothstein, 1986; Escobales y Canessa, 1986; Semplicini y col., 1989). Además, en nuestros experimentos se produce una acumulación de lactato en el interior de los eritrocitos de los AS (con sus hidrogeniones asociados), que podría incrementar la carga ácida de dichas células. Por tanto, un primer efecto evidente del AML en la curva de  $O_2Hb_{sat}$  fue una potenciación del efecto Bohr en los eritrocitos, a su paso por el territorio muscular activo en las condiciones de ejercicio de alta intensidad, previamente descritas.

Por extrapolación y considerando inicialmente que  $pH_e = pH_i$ ; se ha calculado el cambio de  $pH_e$  que sería necesario para igualar los datos de  $O_2Hb_{sat}$  calculada con los medidos en los AS, al final del ejercicio en sangre venosa. Para que se diese un valor de  $O_2Hb_{sat}$  calculada del 25% (que fue el valor medido) en las condiciones existentes en el territorio venoso al final del ejercicio, el  $pH_e$  debería ser reducido en 0.3 unidades, es decir debería pasar de 7.1 a 6.8 (asumiendo que no se modificaron la  $pO_2$  y la B.E). Si bien, lo que parece más razonable pensar es que se produjo una caída del pH intraeritrocitario en 0.3 unidades, debido a la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$  con el uso de amiloride, tal como antes se propuso. Por tanto, en la figura 43, los puntos calculados para los AS descenderían hasta los puntos medidos para esos mismos sujetos, si se preservaran el resto de variables y el pH intraritrocitario, tras el paso de la sangre por el territorio activo, descendiera a 6.8.

Nuestros resultados sugieren que el AML produjo un incremento de la  $p_vO_2$ , manteniéndose el flujo de  $O_2$  hacia los tejidos al mismo nivel que en CS e incluso superior a medida que el ejercicio se prolongó en el tiempo (figuras 40 y 45). Aunque el flujo de  $O_2$  a los tejidos (desde el espacio vascular hacia el tejido periférico), no está limitado por el nivel de  $pO_2$  hasta valores muy bajos (Wittenberg y Wittenberg, 1989), el mantener una alta  $pO_2$  en vena puede conllevar efectos metabólicos beneficiosos (Wilson,

1990; Connet y col., 1990; Honig y col., 1992). Mayores  $p_vO_2$  proporcionan un mayor gradiente para la difusión del  $O_2$  y si no se dieron cambios en la capacidad de difusión del  $O_2$  desde el espacio vascular hacia el músculo ( $DO_2$ ), cabría esperar la presencia de consumos de oxígeno ( $VO_2$ ) relativamente mayores, tal como establece la ley de difusión de Fick:

$$VO_2 = DO_2 \times K \times p_vO_2 \quad (\text{Wagner, 1992}).$$

Muy al contrario, esta alta  $p_vO_2$ , podría reflejar un déficit del metabolismo oxidativo tras la ingesta de AML, pero esto no parece ser cierto en nuestros experimentos, ya que el  $VO_2$  (calculado como  $VO_2 = Q_0 \times [C_aO_2 - C_vO_2]$ , siendo  $Q_0$  el gasto cardíaco o LBF, y  $[C_aO_2 - C_vO_2]$  la diferencia arteriovenosa de la concentración de oxígeno), presentó valores similares e incluso algo superiores tras la ingesta de AML que en la situación control.

Varios factores podrían intervenir en éste cambio de la  $pO_2$ , ya que ésta depende de la interacción de varios mecanismos (Jensen, 1991). De cualquier forma, si consideramos la ecuación para el flujo de  $O_2$ , que establece que:

$$VO_2 = Q_0 \times \beta O_2 \times (p_{a-v}O_2),$$

donde,  $p_{a-v}O_2$  es la diferencia arteriovenosa de las  $pO_2$  y  $\beta O_2$  es el coeficiente de capacitancia de la sangre para el  $O_2$ , definido este último por la pendiente de la curva resultante de enfrentar  $pO_2$  a  $CO_2$  (figuras 44 y 45), es decir la línea resultante de unir los puntos arteriales y venosos de dichas gráficas (Jensen, 1991). Una desviación a la derecha o incremento de la  $p_vO_2$  que es el punto inferior en la curva, podría incrementar la  $\beta O_2$  (al incrementar la pendiente). Esto podría asociarse a un incremento del flujo de  $O_2$  en una situación en la cual no se den cambios en las demás variables reseñadas en la fórmula previa, o incluso compensar una caída o valores menores de las otras variables ( $Q_0$ ,  $p_{a-v}O_2$ ). Nuestros datos muestran en AS un  $VO_2$  similar al de los controles en los momentos iniciales de la prueba, aunque se observaba un menor  $Q_0$  y menor  $p_{a-v}O_2$  en los AS que en CS. Por otro lado, se vieron mayores valores picos de  $VO_2$  (al final del ejercicio) en los AS, coincidiendo con valores similares de  $Q_0$  y menores de  $p_{a-v}O_2$  en AS que en CS. Estos datos concuerdan con el incremento de los valores de  $\beta O_2$  en los AS (ver figuras 40, 44 y 45). En nuestros datos se observa un valor pico  $VO_2$  de  $742 (\pm 30 \text{ D.E.}) \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  cuando los  $LBF_{\text{pico}}$  eran de  $4.77 (\pm 0.3 \text{ D.E.}) \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , mientras que valores picos de  $VO_2$  de  $800 (\pm 60 \text{ D.E.})$ ,  $616 (\pm 38 \text{ D.E.})$  y  $671 (\pm 87 \text{ D.E.}) \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$  correlacionados con valores de  $LBF_{\text{pico}}$  de  $5.70 (\pm 0.47 \text{ D.E.})$ ,  $4.26 (\pm 0.26 \text{ D.E.})$  y  $5.16 (\pm 0.62 \text{ D.E.}) \text{ ml}\cdot\text{min}^{-1}$ , fueron descritos en experimentos similares pero sin AML

(Andersen y col., 1985; Bangsbo y col., 1990 y 1992; respectivamente); los cuales muestran de nuevo los mayores valores de  $\beta O_2$  en los AS (ver figuras 40, 44 y 45; puntos A, B1 y B2).

Los mecanismos que actúan sobre la  $\beta O_2$  y por tanto la capacidad de transporte de  $O_2$ , son de dos tipos: aquellos implicados en la modulación de la afinidad de la Hb por el  $O_2$  y aquellos que conllevan cambios en la cantidad de Hb en la sangre. Las adaptaciones intraespecíficas de la función de la Hb incluyen tres mecanismos principales interrelacionados entre sí: mecanismos de ajuste del contenido de fosfatos orgánicos en el eritrocito, los de ajuste del pH intraeritrocitario y los de control de cambios de volumen eritrocitario (Jensen, 1991). Curiosamente, se conoce que el AML actúa directamente en los dos últimos (Hoffmann y Simonsen, 1989), si bien como describimos en los resultados (ver figura 37), no se observaron cambios importantes en el volumen intraeritrocitario tras la ingesta de amiloride, lo que indica que el mecanismo principal por el que el amiloride indujo cambios en la afinidad de la Hb por el  $O_2$  sea primordialmente por mecanismos de ajuste de pH intraeritrocitario debido a la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$ .

Finalmente, respuestas similares a las descritas arriba (LBF relativamente menores combinadas con mayores  $\beta O_2$  y retraso en la aparición de la fatiga) se han descrito en situaciones de hiperoxia normobárica (Hugh, 1982), también se han descrito valores menores de LBF ( $Q_0$ ) en sujetos con valores superiores de [Hb] en sangre (Ferreti y col., 1992); lo cual demuestra que las diferentes variables integradas en el sistema cardio-respiratorio fueron reajustadas para proveer el  $VO_2$  apropiado a la situación metabólica creada en cada nivel de trabajo, incluso bajo el efecto de AML.

Conviene tener en mente que existen diversos factores capaces de modificar el punto o umbral de activación del antiportador  $Na^+/H^+$ . Entre ellos, la disminución del volumen celular por cambios osmóticos, la deplección de  $K^+$ , las catecolaminas y la cafeína, presentan la capacidad de desplazar hacia arriba (hacia valores más altos de pH) el umbral de activación del antiportador (Grinstein y Rothstein, 1986). Bajo estas condiciones el antiportador puede inducir una alcalinización relativa del interior celular. Si este fue el papel del antiportador durante el ejercicio, AML podría bloquear dicho proceso, lo cual podría producir una carga ácida adicional en el eritrocito y en la célula muscular. El efecto de la sobrecarga ácida podría afectar a un gran número de vías metabólicas, enzimas reguladoras de éstas, estructura espacial de las proteínas, etc. con múltiples consecuencias funcionales que han sido descritas ampliamente (Sahlin, 1983). En el eritrocito, las catecolaminas pueden cambiar (incrementar) indirectamente la afinidad de la Hb por el  $O_2$ , compensando el posible efecto del AML sobre en

antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (Nakinmaa, 1983). Es interesante ver que la respuesta  $\beta$ -adrenérgica de células deoxigenadas es superior a la de las células oxigenadas, lo cual sugiere una interacción de la Hb con proteínas de membrana y con el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  que en todo caso sería dependiente del estado de saturación de la Hb (Motais y col., 1987).

Aunque el efecto ahorrador de  $\text{K}^+$  del AML a nivel renal es bien conocido (Grinstein y Rothstein, 1986; Garty y Benos, 1988), las características de nuestros experimentos (el sujeto ingirió el AML 4 horas antes de la prueba) hacen que los efectos renales a nivel sistémico sean prácticamente nulos o estén compensados, tal y como se describió con anterioridad, por lo que no se observaron grandes incrementos en las  $[\text{K}^+]_p$  en reposo. No obstante, durante el ejercicio las  $[\text{K}^+]_p$  en sangre arterial fueron más altas en AS que en CS; además, las  $[\text{K}^+]_p$  en sangre venosa fueron también claramente superiores en los AS al final del ejercicio. Por otro lado, durante el ejercicio los valores de  $[\text{K}^+]_v$  fueron siempre superiores a los de  $[\text{K}^+]_a$ , situación que se invirtió durante la fase de recuperación (figura 38). Estos cambios han sido previamente descritos y considerados como la existencia de eliminación de  $\text{K}^+$  durante el ejercicio procedente de la musculatura activa y la recaptación del mismo durante la fase de recuperación (Sjøgaard, 1983, 1986, 1988 y 1990; Medbø y Sejersted, 1985 y 1990; Sjøgaard y col., 1985; Clausen, 1986; Juel y col., 1990).

El estudio de los cambios en las concentraciones de  $\text{K}^+$  en distintos compartimentos orgánicos, permitió poner en evidencia la magnitud de los cambios en las concentraciones y en los flujos de éste ion durante el ejercicio. Con los análisis realizados en las biopsias musculares, se muestra que cualquiera de los dos métodos descritos indican la pérdida de  $\text{K}^+$  desde el interior del compartimento muscular en general y desde el interior de las células musculares en particular. Es importante incidir en que durante el ejercicio, se observó una caída en la concentración intracelular de  $\text{K}^+$ , mientras que la recuperación de la misma fue lenta tras el cese del ejercicio, especialmente en los AS. La caída en las concentraciones intracelulares de  $\text{K}^+$  durante el ejercicio es un dato habitual en la literatura, pero una recuperación lenta ha sido descrita por algunos autores (Costill y Saltin, 1975; Kowalchuck y col., 1988a; Lidinger y col., 1990a), en contraste con la existencia de una recuperación rápida de dicha concentración, descrita por otros autores (Sjøgaard, 1983, 1986, 1988 y 1990; Sjøgaard y col., 1985; Clausen, 1986; Juel y col., 1990). Por otro lado, se vio que los movimientos de agua entre los compartimentos extra e intracelular son de extraordinaria importancia a la hora de determinar las concentraciones iónicas de los mismos (ver figuras 46 a 51).

Es interesante contrastar los cambios producidos a nivel muscular con los cambios observados a nivel plasmático; si bien conviene tener en mente, que los valores aportados

a nivel muscular son valores promedios para el músculo, sin que en ningún caso se pueda determinar los cambios propios de cada fibra o zona muscular; es decir, se asume que no existe heterogeneidad en el comportamiento o compromiso de las diversas fibras musculares durante la realización de ejercicio físico. Además, la determinación del gasto cardíaco total y de los cantidades recaptadas de  $K^+$  por los territorios inactivos son piezas claves para abordar de forma definitiva los movimientos de éste ion a nivel orgánico durante el ejercicio.

La pérdida neta de potasio del compartimento muscular fue de unos  $22 \text{ mmol kg}^{-1}$  de peso seco, puesto que la masa muscular fue de  $3.3 \text{ kg}$  por cada cuádriceps (es decir  $0.7 \text{ kg}$  de peso seco - 21% del peso total - por cada cuádriceps), la cantidad neta de  $K^+$  eliminada desde cada cuádriceps femoral en los AS fue de  $15.4 \text{ mmoles}$  ( $30.8 \text{ mmoles}$  para ambas piernas). Estos valores coinciden con los datos existentes en la literatura (Sjøgaard y col., 1985), para experimentos similares sin uso de amiloride, siendo algo menores los valores encontrados en nuestra situación control, ver figuras 47, 50 y 51. La notable pérdida de potasio medida en las biopsias musculares contrasta con la disminución del flujo neto de  $K^+$  descrita en nuestros experimentos (ver figuras 38 y 39). Teniendo en cuenta los incrementos en la  $[K^+]_a$ , en la  $[K^+]_v$  y en el LBF durante el ejercicio físico, el valor total del flujo neto de  $K^+$  desde el músculo hacia el compartimento vascular fue de  $5.88 \text{ mmoles}$  en los AS, similar a los  $5.65 \text{ mmoles}$  en CS (si bien éste se obtuvo en menos tiempo), pero inferior a los  $7.6 \text{ mmoles}$  de Juel y col. (1990) y mucho menor que los  $20 \text{ mmoles}$  vistos por Sjøgaard y col. (1985). Por tanto, en los AS el flujo neto de  $K^+$  fue inferior a lo esperado si tenemos en cuenta las pérdidas musculares observadas. Esta reducción del flujo neto fue motivada principalmente por el incremento de las  $[K^+]_a$  (ver figura 36), que conllevó a un importante incremento del contenido total de  $K^+$  a nivel arterial. Así, asumiendo un volumen sanguíneo de  $6 \text{ l}$  y un valor hematócrito de 45%, el incremento estimado del contenido de potasio plasmático fue de  $9.68 \text{ mmoles}$  a nivel arterial en los AS, muy superiores a los valores de  $5.8 \text{ mmoles}$  vistos en la situación control. Más aún, como las concentraciones venosas alcanzadas en los AS y los CS tienden a ser similares, se constata que lo que determinó la reducción del flujo neto de  $K^+$  desde el músculo fue la presencia de valores altos en la  $[K^+]_a$ .

Antes de analizar los posibles factores que indujeron el incremento de la  $[K^+]_a$ , conviene incidir en la distribución en el organismo, del  $K^+$  perdido a nivel muscular. Puesto que la cantidad total perdida de la musculatura fue de  $30.8 \text{ mmoles}$  de  $K^+$  y asumiendo que las  $[K^+]$  en los compartimentos plasmático (a nivel venoso) e intersticial (en el músculo activo) están igualados, debe existir algún compartimento hacia donde haya sido desviada la cantidad "restante" de  $K^+$  (siendo ésta la resultante de restar a la cantidad perdida por los músculos, la cantidad eliminada hacia el compartimento

vascular), que fueron 9.36 mmoles. Una posible explicación podría ser que una cierta cantidad de  $K^+$  se acumulase en el interior de los eritrocitos, que actuarían como espacio "secuestrador o titulador" de  $K^+$ . En experimentos similares sin AML (Juel y col., 1990), se ha visto que el  $K^+$  no se acumuló en el interior del eritrocito, si bien otros autores no han podido excluir esta posibilidad (Vøllestad y col., 1994), de todas formas dicha situación no se ha comprobado en los AS. Por otro lado, ya que se conoce cierta heterogeneidad en la activación de las distintas unidades motoras y en la distribución del flujo sanguíneo muscular durante el ejercicio físico, es posible que exista también cierta heterogeneidad en la distribución de  $K^+$ , de tal forma que lo eliminado en cierta parte del músculo puede ser recaptado por otra, lo que podría explicar la existencia de los 9.36 mmoles "restantes". Por tanto, de los 30.8 mmoles perdidos a nivel muscular el 70% pasó al compartimento plasmático (21.44 mmoles), de los cuales los tejidos periféricos retiran un 30% y el 40% restante queda recirculando en el plasma. Existe un 30% (9.36 mmoles) que queda secuestrado en algún espacio, bien en los eritrocitos o bien a nivel muscular.

Es evidente que para abordar con precisión la dinámica de los movimientos del  $K^+$  entre los compartimentos plasmático-extracelular-intracelular se requiere un control simultáneo y preciso de los movimientos de agua durante el ejercicio, lo cual en humanos requiere un montaje experimental de gran complejidad (Sjøgaard y Saltin, 1982). En nuestros experimentos, se asumió una distribución de agua idéntica a la observada por Sjøgaard y col. (1985) en un experimento similar sin uso de AML (ver figura 46 D, E y F). Estos autores observaron cambios en el potasio intracelular, a nivel muscular, similares a los vistos en nuestra situación control pero con una recuperación más rápida de la cantidad total de potasio muscular y de las concentraciones del mismo, siendo la recuperación de los niveles basales de éste ion mucho más lenta en los AS; no obstante, no podemos descartar que el AML haya alterado el equilibrio hídrico en el territorio muscular. Por otro lado, la pérdida neta media por contracción durante el ejercicio fue de  $53 \mu\text{mol Kg}^{-1}$  en los AS, similar a las  $61 \mu\text{mol Kg}^{-1}$  por contracción calculado de los datos de Sjøgaard y col. (1985), mientras que en situación control fue algo menor. En todo caso, estos valores en los AS fueron superiores a los estimados por Juel y col. (1990), a partir de los cambios del flujo neto en el compartimento plasmático. Por tanto el uso de AML, no parece haber inducido un incremento en la pérdida neta de  $K^+$  de los músculos, sino que previsiblemente redujo la recaptación del mismo al menos en la musculatura activa, que de forma primordial se debería a una acción directa o indirecta del AML sobre la actividad de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+-\text{ATP}_{\text{asa}}$ .

Los incrementos observados en la  $[\text{K}^+]_a$  en los AS, que conllevaron a la reducción del flujo neto de  $K^+$ , parecen estar relacionados de forma preferente con una limitación de los mecanismos que redistribuyen fuera del territorio muscular activo, las cantidades

perdidas de  $K^+$  desde el músculo. En línea con los resultados precedentes, existen indicios que parecen indicar la disminución del volumen de redistribución y en la recaptación de  $K^+$  por parte de los territorios inactivos:

1.- Recientemente se ha visto que durante la realización de ejercicios de baja y moderada intensidad, en los que se compromete un alto porcentaje de la masa muscular corporal total, el  $K^+$  eliminado desde la musculatura activa, se redistribuye en un volumen extracelular variable, además de ser recaptado en territorios no activos. Aparece así el concepto de "volumen de distribución efectivo" para el  $K^+$ , que en todo caso debe ser considerado como un volumen virtual ya que albergaría el efecto global observado (retirada de  $K^+$ ), como consecuencia de la acción de los dos mecanismos citados (redistribución y recaptación). La pérdida transitoria de  $K^+$  desde la musculatura activa, incrementa linealmente a medida que aumenta la intensidad del ejercicio realizado, por contra, el volumen de distribución efectivo para el  $K^+$  disminuye. Esta situación, que puede ser debida principalmente a la desviación del flujo sanguíneo hacia el territorio activo y a la consiguiente reducción de éste en los territorios inactivos, conllevaría entre otros cambios, a un incremento en la  $[K^+]$  a nivel arterial (Vøllestad y col., 1994). En nuestros experimentos, una situación de este tipo ayudaría a explicar los mayores incrementos observados en las  $[K^+]_a$  de los AS frente a los CS, si bien es difícil determinar si la previsible reducción del volumen efectivo de distribución para el  $K^+$  sería consecuencia de cambios en la redistribución del flujo sanguíneo inducidos por el AML o por la reducción de la recaptación de este ion en los territorios inactivos.

2.- Comparando las figuras 38 y 55 C, se puede observar que en los territorios musculares inactivos, al ser las  $[K^+]_{venosas}$  en territorio inactivo menor que las  $[K^+]_{arteriales}$ , se captaría  $K^+$  procedente compartimento vascular en todo momento, tanto en situación control como tras la ingesta de AML. No obstante, la captación de éste ión parece disminuida en los sujetos que ingirieron AML (ya que se dieron valores superiores de  $[K^+]_v$  que en los controles), lo que explicaría en parte el incremento de las  $[K^+]_a$  a nivel arterial de los AS frente a los CS.

3.- Por otro lado, durante la recuperación la presencia de  $[K^+]_{arteriales}$  superiores a las  $[K^+]_{venosas}$  en el territorio muscular activo, se ha considerado como indicativo de la recaptación de  $K^+$  por la musculatura, dándose tal circunstancia desde el inicio de la recuperación (figura 38). Al decrecer de forma brusca y simultánea el flujo sanguíneo (ver figura 40) es lógico esperar que la recaptación de  $K^+$  (ver figura 39) sea de escasa cuantía. Por tanto, cabe esperar que la reposición del potasio perdido en el músculo sea lenta. De hecho, tal como antes se dijo, dicha reposición no fue evidente en todos nuestros experimentos, al menos cuando en las biopsias musculares se midió el número de mmoles

totales expresados en  $\text{mmoles}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso seco (figuras 47 E y 51 B y E). Aunque las concentraciones del mismo (ver figuras 47 B y 50 B y E), que evidentemente están muy influenciadas por los movimientos de agua entre los distintos compartimentos (figura 46), si parecen recuperarse más deprisa. Como dicha recaptación en el territorio muscular activo está disminuida, especialmente en los AS tras la finalización del ejercicio, es posible pensar que la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  haya interferido (de forma directa o indirecta) en la recaptación de  $\text{K}^+$  en la musculatura inactiva durante toda la prueba. Por tanto, los incrementos de las  $[\text{K}^+]$  a nivel arterial pueden deberse a la inhibición de la recaptación en el territorio activo. En consecuencia, se puede decir que la importante pérdida de  $\text{K}^+$  en la musculatura activa no se acompañó de una potenciación paralela de los mecanismos de redistribución hacia territorios inactivos y de recaptación del mismo en los territorios activos e inactivos, con lo que se produjo una acumulación de  $\text{K}^+$  nivel vascular.

Estas altas  $[\text{K}^+]_p$  podrían contribuir para incrementar relativamente el flujo sanguíneo hacia la musculatura activa, ya que se conoce que el  $\text{K}^+$  es un inductor de vasodilatación, lo que podría contrarrestar la posible tendencia a la reducción de los niveles de LBF asociada previsiblemente a valores altos de  $\beta\text{O}_2$  y de  $p_v\text{O}_2$ , descritas arriba. En este aspecto, es interesante remarcar que ni LBF ni las  $[\text{K}^+]_p$  presentaron una fase de estado estable al final del ejercicio. Una posible explicación para los mayores tiempos de duración del ejercicio vistos con AML, podría ser debido al incremento relativo del LBF, secundario a la hiperkaliemia, que fue observado en los AS, especialmente al final de ejercicio y cuando se comparan con los CS; lo cual cabe esperar sea resultado de la interacción de diversas variables:  $[\text{K}^+]_p$ ,  $p\text{O}_2$ , pH, la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , etc. (Mahnensmith y Aronson, 1985).

Por contra, las altas  $[\text{K}^+]$  en el espacio extracelular parecen jugar un papel importante en la aparición de la fatiga muscular (Sjøgaard, 1983, 1986, 1988 y 1990; Sjøgaard y col., 1985; Clausen, 1986; Juel y col., 1990). Puesto que las contracciones musculares dependen de la activación eléctrica de los tubulos-T, un cambio del potencial de membrana, tendente a la despolarización, puede afectar la fuerza de contracción muscular. Mas aún, la repolarización es necesaria para pasar los canales de  $\text{Na}^+$ -voltaje dependientes desde su estado inactivo a su estado de cerrado, lo cual es esencial para la futura apertura de dichos canales. Un incremento de la  $[\text{K}^+]_e$  provocaría un desplazamiento del potencial de membrana hacia la despolarización y por tanto un mayor número de canales de  $\text{Na}^+$ -voltaje dependientes en estado inactivado tal como describieron Huxley y Tailor (1958). En nuestros experimentos se pudo estimar el potencial de equilibrio para el  $\text{K}^+$  ( $E_K$ ), usando los datos obtenidos a partir de la aplicación del "método de inulina" (ver figuras 48 y 50) y aplicando la ecuación de



Nernst:

$$E_k = 2.3 \frac{RT}{F} \times \log \frac{[K_o]}{[K_i]}$$

considerando las distintas constantes a 37°C; es decir, siendo  $2.3 \frac{RT}{F} = 61.5 \text{ mV}$ , el  $E_k$  pasaría de -89 mV calculados en reposo a -75 mV observados al final del ejercicio, para volver a -89 mV a los 3 minutos de recuperación, persistiendo a -88 mV a los 10 minutos de recuperación, éstos valores de despolarización (14 mV) coinciden con los existentes en trabajos similares sin amiloride (Sjøgaard y col., 1985) y sería un factor importante en la aparición de la fatiga muscular. En la situación control se vio la misma evolución con un nivel de despolarización de 17 mV al final del ejercicio y vuelta al nivel basal durante la recuperación, si bien el  $E_k$  inicial fue algo más negativo (-97 mV). La existencia de una recaptación incompleta de  $K^+$  por parte de la bomba  $Na^+/K^+-ATP_{asa}$  en la fase de repolarización posterior a cada potencial de acción, puede justificar el incremento de  $[K^+]_e$  (Clausen, 1986), si bien se sabe que el flujo de  $K^+$  hacia el interior del músculo puede ser facilitado por la presencia de catecolaminas y otros moduladores (Martin y Morad, 1982; Clausen, 1986, Juel, 1988). La salida de  $K^+$  durante la contracción muscular se produce principalmente por medio de los canales de  $K^+$  del tipo rectificador tardío -"delayed rectifier"- (Standfield, 1983), pero otros canales de  $K^+$  como los sensibles a ATP podrían jugar un papel importante durante el ejercicio de alta intensidad, ya que se ha visto que una reducción del  $pH_i$  en presencia de ATP produce un incremento en la conductancia de este tipo de canales (Davies, 1990). En la misma línea parece que podrían actuar los canales de  $K^+$  sensibles a  $Ca^{++}$  (Fink y col., 1983), aunque su papel es más discutido, ya que para el incremento de la conductancia de éstos se requiere un gran descenso del ATP intracelular, tal vez fuera del rango habitual de caída de éste durante el ejercicio (Fitts, 1992).

Por tanto, queda claro que la  $[K^+]_e$  resulta de la interacción de los diversos mecanismos que regulan la entrada y salida de  $K^+$  en el músculo, sin olvidar los mecanismos de aclaramiento desde el músculo y de redistribución hacia otros compartimentos. En nuestros AS, a pesar de los altos valores de  $[K^+]_p$  tanto a nivel venoso como arterial y de la escasa diferencia arteriovenosa en las  $[K^+]_p$ , el flujo neto de  $K^+$  procedente de la musculatura activa parece estar preservado (figura 38 y 39), incluso a pesar de la clara acumulación de  $K^+$  a nivel arterial, que parece indicar una recaptación reducida de  $K^+$  en los territorios no activos y posiblemente los activos. Dadas las superiores concentraciones de potasio en el espacio plasmático en los AS, éstos serían candidatos para fatigarse antes que CS, que fue precisamente lo que no ocurrió en

nuestros experimentos. Por tanto, otro aspecto que debe ser estudiado en detalle, serían los efectos directos del AML sobre el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y los efectos indirectos sobre los movimientos de  $\text{K}^+$ , así como los cambios en el equilibrio hídrico o las modificaciones inducidas a través de los cambios en la  $\text{pO}_2$ , que explicaran qué cambios pudo inducir el AML para compensar entre otros, los cambios calculados en el potencial de membrana, para facilitar el retraso de la aparición de la fatiga muscular.

El flujo neto de lactato desde el cuádriceps en AS se acercó a  $5 \text{ mmol}\cdot\text{min}^{-1}$  (figura 25), valor casi tres veces menor que los observados en CS; no obstante, los valores en los AS se acercan a los medidos por Jorfeldt y col. (1978). Se ha comprobado que el lactato puede atravesar el sarcolema tanto hacia dentro como hacia fuera, ya sea por difusión simple o por difusión facilitada, mediada por el cotransportador lactato- $\text{H}^+$  (Juel y Wibrand, 1989; Roth y Brooks, 1990; Juel, 1991 a y b; Brooks, 1991; Roth, 1991). Estos trabajos muestran que el segundo mecanismo parece ser más importante en las condiciones fisiológicas que se presentan durante el ejercicio. Los menores flujos observados en nuestros resultados son básicamente debidos a una reducción de la diferencia arteriovenosa de la  $[\text{Lact}^-]$ , lo que podría reflejar una menor producción de lactato por la musculatura activa o una disminución de la recaptación del mismo por otros tejidos o ambos.

De acuerdo con esto, una menor producción de lactato concordaría con una inhibición de la fosfofructokinasa (PFK) secundaria a un posible descenso del  $\text{pH}_i$  (tamponamiento metabólico); pero iría en contra de un incremento del gradiente para el cotransporte de lactato- $\text{H}^+$  desde el músculo (Juel y Wibrand, 1989), secundario al posible incremento de protones en el interior de la célula muscular tras la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (tamponamiento iónico). Por otro lado, una reducción de la recaptación de lactato por el músculo y los tejidos periféricos podría explicar también la reducida diferencia arteriovenosa de lactato. Hay que tener en cuenta que se podría haber dado una disminución del "volumen de distribución efectivo" para el lactato, por los mismos mecanismos explicados para el  $\text{K}^+$ ; es decir, si se reducen la redistribución y la recaptación de  $\text{Lact}^-$  en los tejidos inactivos, se facilita el incremento de las  $[\text{Lact}^-]$  en plasma, pudiéndose activar la recaptación por parte de los eritrocitos. Esto se confirma con la existencia de  $[\text{Lact}^-]_{\text{GR}}$  superiores a las concentraciones plasmáticas en los AS (ver figura 26). La participación de los mecanismos de redistribución, recaptación y metabolización de lactato, en la determinación de las concentraciones finales del mismo es un fenómeno bien constatado (Donovan y Brooks, 1983; Brooks, 1985; Wasserman y col., 1986; Donovan y Pagliassotti, 1990; Brooks, 1991; Stanley, 1991; Wasserman y col., 1991). La lenta caída de las  $[\text{Lact}^-]$  en plasma (figuras 24 y 27) confirman también la menor eficiencia de los mecanismos que retiran dicho anión en los AS.

Con incrementos a nivel arterial en la  $[H^+]$  y la  $[Lact^-]$ , como los vistos en los AS, para mantener el flujo de lactato y  $H^+$  desde el músculo se necesitarían incrementos proporcionales en el interior del músculo. En éste sentido, Bangsbo y col. (1993) han demostrado descensos en la liberación de lactato desde el músculo en sujetos con altas  $[Lact^-]$  a nivel arterial, al final del ejercicio, a pesar de presentarse incrementos importantes en los gradientes de lactato y  $H^+$  que favorecerían la salida de estos iones "hacia el exterior" del músculo; por lo que piensan que altas  $[Lact^-]$  a nivel arterial pueden producir una inhibición directa en la liberación de lactato desde el músculo, independiente a la reducción del gradiente de lactato. Por otro lado, estos autores, han visto que los gradientes y flujos de  $H^+$  y de  $Lact^-$  no siempre se modificaron de forma paralela. En cuanto al gradiente de  $H^+$ , no se debe olvidar que otros mecanismos podrían tomar parte, bien cambiando el punto de activación del antiportador  $Na^+/H^+$  (Grinstein y Rothstein, 1986), bien compensando la inhibición de éste con la activación de otros transportadores iónicos de membrana (Moody, 1984; Hoffmann y Simonsen, 1989). Contrasta con lo expuesto, el que los AS pudiesen realizar el ejercicio físico por un periodo más prolongado de tiempo, más aún si consideramos los efectos asociados con la presumible disminución de pH a nivel intracelular en el músculo (Sahlin, 1983; Saltin y Collnick, 1983 Cady y col., 1989; Renaud, 1989; Lännergren y Westerblad, 1991; Westerblad y col., 1991; Fitts, 1994).

En nuestros datos, el LBF presentó valores superiores que los de CS sólo al final del ejercicio; por lo que, la existencia de un LBF reducido que pudiera conllevar a una reducción del flujo neto de lactato, se habría dado exclusivamente en la parte inicial del ejercicio, pero no al final del mismo.

Las relaciones de  $[Lact]_{GR}/[Lact]_p$  (figura 26) estuvieron cerca de la unidad durante el ejercicio y la recuperación, en acuerdo con los datos de Buono y Yaeger (1986), pero en clarísimo contraste con los datos de Juel y col., (1990) y los de Foxdal y col., (1990) que muestran valores inferiores a la unidad, especialmente durante el esfuerzo. Nuestros resultados sugieren la activación de un transportador específico de lactato en la membrana del eritrocito (Deuticke, 1982), con el fin de incrementar la recaptación del mismo. De acuerdo con esto, el lactato contenido en el interior de los eritrocitos contribuiría en más del 50% de la cantidad de lactato contenida en la sangre total de los AS, siendo esto así, los eritrocitos jugarían un papel fundamental como espacio titular de lactato.

El análisis de los cambios producidos en el equilibrio ácido base durante el ejercicio, es un tema que no está exento de complejidad. Como se ha visto en Resultados,

se ha intentado abordar este tema de una forma amplia, usando distintas "herramientas" o métodos de valoración del mismo. Inicialmente, se tratará de forma aislada cada una de las variables, para después tratar de hacerlo de forma conjunta.

El  $pH_a$  en los AS se mantuvo aproximadamente 0.16 unidades de pH por debajo de los valores observados para los CS, ésta diferencia fue observada en reposo y se mantuvo durante toda la prueba (figura 28); mientras que los valores de  $pH_v$  fueron prácticamente similares en la fase activa en ambos grupos, pero la recuperación tras el esfuerzo fue mucho más lenta en los AS que en los CS (figuras 28, B y C). Los valores más bajos de  $pH_v$  quedaron alrededor de 7.1 al final del ejercicio, y desde este punto la velocidad de recuperación del  $pH_v$  dependió de los valores correspondientes de  $pH_a$ ; de tal forma que, ambos valores de pH (arterial y venoso) parecen igualarse tras 20 minutos de recuperación, pero en un punto inferior para los AS. El menor  $pH_a$  concuerda con la pérdida de bases inducida por el AML a nivel renal, que conllevó a una acidosis metabólica no compensada en los AS. Por otro lado, la menor pendiente de recuperación en los AS sugiere una mayor acumulación de  $H^+$  durante el ejercicio, como consecuencia directa o indirecta de la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$ ; o alternativamente, una menor eficiencia de aquellos mecanismos encargados de la eliminación de ácidos o de la captación de bases. Englobando estos últimos, el manejo del  $CO_2$  por medio de la bomba ventilatoria y los cambios de las capacidades tamponadoras de la sangre, si se aborda el problema a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch. O de éstos más los cambios en la SID si se aborda el problema a partir del algoritmo de Stewart.

No obstante, la  $pCO_2$  que estuvo aumentada a nivel venoso durante el ejercicio (ver figura 29), mostró una caída brusca al inicio de la recuperación para alcanzar rápidamente los niveles de reposo e incluso menores, que se mantuvieron así a lo largo de toda la recuperación, por lo que no parece ser un factor que influya en el retraso de la cinética de recuperación del pH venoso. Mientras que a nivel arterial se observó una ligera caída de la  $pCO_2$  que permitió compensar la acidosis metabólica inducida por el ejercicio, es decir se mantuvo el  $pH \approx 7.4$ , exclusivamente en la fase de ejercicio en los CS. En cuanto a la menor capacidad de retirada de cargas ácidas se ha observado que una menor pendiente de caída de las  $[Lact^-]$  durante la fase de recuperación que podría ser la principal explicación de los cambios en la cinética del pH durante la fase de recuperación (comparar figuras 27 y 28). En este sentido, la capacidad buffer del plasma estimada como  $\Delta Lact^-/\Delta pH$ , sólo presentó ligeros cambios tras el uso de amiloride. Esta fue aumentando ligeramente durante la prueba en las muestras venosas, oscilando entre valores 50 a  $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} \cdot \text{pH}^{-1}$  a lo largo de toda la prueba, mientras que en las muestras arteriales se incrementó la capacidad buffer prácticamente al doble durante el ejercicio (siendo esta subida algo mayor en las muestras arteriales de los CS), para descender luego

durante la recuperación a los mismos niveles que los de las muestras venosas. Estos cambios en la capacidad buffer, calculada de esta forma, deben ser tomados con cautela, ya que el ácido láctico no fue la única carga ácida durante el ejercicio, más aún si consideramos que en los líquidos corporales éste se encuentra principalmente disociado en  $\text{Lact}^-$  e  $\text{H}^+$ , siendo cada uno de éstos iones retirados o tamponados por diferentes mecanismos. Por ejemplo, el incremento de la capacidad buffer observado en la sangre arterial, está más unido a la posibilidad de cambiar el pH por medio de la retirada de  $\text{CO}_2$  que a un incremento en la capacidad buffer de la sangre, propiamente dicho.

Es interesante observar que la  $[\text{HCO}_3^-]$  actual en sangre venosa (figura 30) fue superior a la observada en sangre arterial durante el ejercicio, siguiendo ambas una cinética similar durante la recuperación. Esto concuerda con un incremento de la producción de  $\text{CO}_2$  por los músculos, rápidamente reciclados en  $\text{HCO}_3^-$  en el interior del eritrocito (figuras 29 y 30), y también ayuda a explicar el incremento inicial de la relación  $[\text{Lact}]_p/\text{-B.E.}$  en la sangre venosa durante la fase activa de la prueba (figura 32), mientras que la carga ácida posiblemente permanezca parcialmente en el interior de los eritrocitos, lo que estaría incrementado en los AS como consecuencia de la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ . En este contexto, resulta interesante remarcar que el reciclado de  $\text{HCO}_3^-$  en el eritrocito podría estar limitado por la capacidad buffer de la Hb y especialmente por la velocidad del intercambio  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$  (Alper, 1991; Klocke, 1989). Esta no parece especialmente afectada bajo los efectos del AML, obsérvese en la figura 30 como la  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{actual}}$  se sigue reciclando a nivel venoso, situación en la que precisamente hemos considerado la existencia de un bajo  $\text{pH}_i$  para el eritrocito. La situación descrita resalta el importante papel de la Hb y la potencia de la misma como mecanismo tamponador. Además, la presencia de una caída importante de las  $[\text{Cl}^-]$  visto a nivel venoso frente a las arteriales ilustra claramente la importancia del efecto Hamburger o "desviación de cloruros" durante el ejercicio (ver figura 35 A1 y A2). Por otro lado, comparando los valores venosos de  $\text{HCO}_3^-$  actual con los arteriales, se puede comprobar que el sistema respiratorio elimina una importante cantidad de bicarbonato en forma de  $\text{CO}_2$  y que la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  no parece alterar dicha diferencia arterio-venosa; esta observación ayudaría a explicar porqué no se observaron cambios importantes en la  $\text{VCO}_2$  medidos a nivel sistémico, durante ninguna de las pruebas de esfuerzo. En la recuperación, una vez normalizada la  $\text{pCO}_2$ , el  $\text{HCO}_3^-$  continúa siendo consumido, presumiblemente por la liberación lenta de la carga ácida procedente preferentemente de la musculatura, en concordancia con los retrasos de la recuperación en el pH, la  $[\text{Lact}^-]$  y el  $\text{HCO}_3^-$  de los AS (figuras 27,28 y 30). A pesar de los incrementos importantes del bicarbonato actual, cuando se estudia el bicarbonato estándar o el exceso de base (figura 31), se pone de manifiesto la importante caída de los mismos tanto a nivel venoso como arterial, lo que indica la situación de clara acidosis metabólica inducida por

el ejercicio, que se compensa parcialmente durante el ejercicio en los CS pero no en los AS y que cuando se retira el componente respiratorio (ligado al control y manejo de la  $p\text{CO}_2$ ), tal como ocurre durante la recuperación, dicha acidosis se acentúa, tanto en los AS como en los CS.

En la figura 32 se observa como los incrementos de lactato ( y de los  $\text{H}^+$  asociados) que se presentan durante el ejercicio, no se asocian a una caída paralela en el valor de B.E., especialmente a nivel venoso, ya que durante el ejercicio dicha relación es superior a 1. Los datos observados durante el ejercicio concuerdan con lo descrito por Lidinger y col. (1992), que además han comprobado que dicha situación puede ser explicada por los cambios iónicos entre el plasma y el interior de los eritrocitos, tal como hemos discutido con anterioridad para nuestros datos. No obstante, es imprescindible resaltar que en la aparición del incremento en dicha relación, fue fundamental que no se observara una gran caída de las bases del plasma, y por tanto, se mantenga un valor lo más cercano a cero en B.E., lo que está mediado en nuestros experimentos por el reciclado intraeritrocitario del  $\text{HCO}_3^-$ , tal como antes se mostró en la figura 30. Este mecanismo retiraría  $\text{H}^+$  del plasma a nivel venoso, con formación final de  $\text{CO}_2$ , sin que ello conlleve movimientos de aniones  $\text{Lact}^-$  en el plasma. El amiloride no parece afectar la dinámica del fenómeno descrito. La relación permanece en valores cercanos a la unidad, a nivel arterial durante toda la prueba y a nivel venoso sólo durante la fase de recuperación. Estos valores contrastan con los valores inferiores a la unidad descrito por otros autores en experimentos similares (Juel y col., 1990), y otros experimentos que indican la existencia de una mayor eliminación de  $\text{H}^+$  que de  $\text{Lact}^-$  desde el músculo (Bangsbo y col., 1993). Al revisar nuestros datos, no se puede decir que desde el músculo no se haya liberado más  $\text{H}^+$  que  $\text{Lact}^-$ , pero si parece que una mayor cantidad de  $\text{H}^+$  fue retirada del plasma.

Viendo la evolución de pH,  $p\text{CO}_2$ , y  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$ , en el territorio inactivo (muestras venosas) se observa que los AS presentaron cambios evidentes frente a los CS. Los valores pH fueron prácticamente similares a los arteriales, tanto para AS como CS, si bien se observan valores de  $p\text{CO}_2$  superiores a los arteriales, junto con un mayor valor de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$  en el territorio inactivo. Lo que indica que la sangre a la salida del territorio inactivo no había sido modificada en su pH, se le incrementó la  $p\text{CO}_2$  y se añadió una cantidad considerable de  $[\text{HCO}_3^-]_{\text{std}}$ , éste aporte de bases ayudaría a compensar el desequilibrio ácido-base generado en el territorio activo.

El estudio cuantitativo del equilibrio ácido-base puede ser realizado por medio del algoritmo de Stewart (1978 y 1981), que además, puede ser aplicado a cualquier fluido corporal. Stewart ha formalizado las teorías físico-químicas clásicas y asume que en los líquidos corporales se cumplen las tres leyes fundamentales que gobiernan cualquier

solución acuosa: ley de conservación de masas, de preservación de la electroneutralidad y de existencia de equilibrios de disociación para los ácidos débiles y agua (reflejado por las correspondientes constantes). Y propone la existencia de tres variables independientes:  $p\text{CO}_2$ ,  $P_{\text{TOT}}$  y SID; a partir de las cuales se pueden explicar los cambios observados en el equilibrio ácido-base, y por tanto, se puede calcular cualquiera de las variables dependientes que actúan en el mismo, entre las que se incluye la  $[\text{H}^+]$ . Los cambios conceptuales incluidos por este algoritmo en la valoración del equilibrio ácido base a nivel sanguíneo son varios:

1.- la relación de la  $p\text{CO}_2$  -  $\text{HCO}_3^-$  que clásicamente se incluye en la ecuación de Hendelson-Hasselbalch y en el diagrama de Davenport (Boron, 1989a), están representados por la  $p\text{CO}_2$  como variable independiente y las correspondientes constantes de equilibrio.

2.- la capacidad buffer de la sangre, dependería principalmente de la concentración y del estado de disociación de las  $P_{\text{TOT}}$ .

3.- la SID, no considerada previamente de forma directa, se considera como variable independiente y vendría a representar los mecanismos que regulan la presencia de iones fuertes en el fluido orgánico; es decir, que considera los mecanismos de intercambio iónico transmembrana, que como habíamos visto (Boron, 1989 a y b) son de trascendental importancia en la regulación del equilibrio ácido-base.

La validez del algoritmo de Stewart ha sido ampliamente constatado, tanto en el músculo esquelético (Kowalchuk, 1988 a y b; Lindinger y Heigenhauser, 1989; Lindinger y col., 1990 b); como en el plasma (Heigenhauser y col., 1989; Weinstein y col., 1991, Lindinger y col., 1992).

En nuestros experimentos, sólo se usó el algoritmo para discernir la importancia de las distintas variables independientes en los cambios inducidos en el equilibrio ácido-base, concretamente sobre la única variable dependiente que puede ser medida con fiabilidad: la  $[\text{H}^+]$ .

Los cambios en la  $p\text{CO}_2$  y la SID, fueron descritos en los Resultados, destacando que durante el ejercicio, los cambios en la  $[\text{H}^+]$  calculados en los territorios inactivos (muestras venosas reflejadas en las figuras 16 y 54) están preferentemente ligados a los cambios en la  $p\text{CO}_2$  (figuras 14 y 53), puesto que la SID no se modificó apenas; mientras que durante la recuperación la situación se invierte, de tal forma que con la caída de la  $p\text{CO}_2$  las otras dos variables independientes (SID y  $P_{\text{TOT}}$ ) pasan a ser cuantitativa y

proporcionalmente más importantes en la determinación de la  $[H^+]$ . Precisamente, es durante la fase de recuperación donde aparecen las mayores diferencias entre los valores medidos y calculados de  $[H^+]$  (ver figuras 16, C y D; y 54, B y C), lo cual puede ser explicado en parte porque al ser la caída de la SID leve, la importancia cuantitativa de las  $P_{TOT}$  incrementa notablemente y éstas fueron estimadas y no medidas directamente; así, una infraestimación de las  $P_{TOT}$  conllevaría a una considerable infraestimación de la  $[H^+]$ . Esto podría justificar el descenso de los valores en los coeficientes de correlación de los sujetos controles ( $r \approx 0.6$  y  $r \approx 0.7$ , en figuras 16 y 54) pero no justificaría la diferencia observada entre éstos y los valores estimados para los sujetos que tomaron AML ( $r \approx 0.1$  y  $r \approx 0.6$ , en figuras 16 y 54), ya que en ambos casos se estimó las  $P_{TOT}$  de la misma forma.

Los cambios observados durante el ejercicio en la SID, a nivel venoso en el territorio activo (figura 33), fueron más marcados que los vistos en los territorios inactivos, además se observa un incremento transitorio de la SID que contrarrestaría parcialmente el incremento de la  $[H^+]$  que conlleva el gran incremento de la  $pCO_2$  (figura 29). Durante la fase de recuperación, la caída de la  $pCO_2$  hace que las otras dos variables independientes (SID y  $P_{TOT}$ ) pasen a ser cuantitativamente más importante. En este territorio las caídas en la SID son importantes con lo que la importancia relativa de las  $P_{TOT}$  descendió, lo que explica el incremento de los coeficientes de correlación entre las  $[H^+]$  medidas y calculadas, pero sigue sin explicar las diferencias entre los CS y los AS ( $r \approx 0.91$  en CS y  $r \approx 0.61$  en figura 33).

En cuanto a los cambios a nivel arterial, se observa que la caída en la SID y el incremento en las  $P_{TOT}$  justificarían la presencia de un incremento de la  $[H^+]$ , que estaría parcialmente contrarrestado por el descenso en la  $pCO_2$ , mediado por una hiperventilación relativa. Esta situación, que se instaura durante el ejercicio, se mantiene a lo largo de la fase de recuperación. A nivel arterial, al no darse altos niveles de  $pCO_2$  la correlación entre los valores de  $[H^+]$  medidos y calculados presentó menores coeficientes de correlación que a nivel venoso ( $r \approx 0.64$  en CS y  $r \approx 0.45$  figura 33).

Observando, la relación entre los valores medidos y calculados de  $[H^+]$  (figuras 16, 33 y 54), se ve que nuestros valores calculados no se correlacionaron tan perfectamente con los medidos como citan otros autores ( $r \approx 0.99$ , en Weinstein y col., 1991), pero se dieron valores aceptables y significativos para los sujetos controles ( $r > 0.6$ ), mientras que tras la ingesta de AML los coeficientes de correlación fueron claramente menores ( $r < 0.65$ ). Esto parece indicar que con la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$  se modificó el comportamiento de uno o varios elementos de los incluidos en la fórmula para el cálculo de la  $[H^+]$ . Se sabe que los cambios en las variables independientes no influyen



entre sí (Weinstein y col., 1991), tampoco se puede atribuir el cambio a las  $[P_{TOT}]$ , ya que fueron estimadas de la misma forma lo que conllevarían cambios similares de la  $[H^+]$ , y como hemos visto, las diferencias en la  $pCO_2$  de los AS y CS no fueron tan marcadas. Por lo que, es previsible que dichos cambios hayan sido inducidos por cambios en la SID o por cambios en el valor de una o varias de las constantes de equilibrio de disociación para un determinado valor de temperatura y pH. Hasta ahora se han evaluado los cambios a nivel plasmático, pero si consideramos la sangre como un fluido bicompartimental y tenemos en cuenta los incrementos de lactato medidos en el interior del eritrocito, los cambios en los valores estimados de pH intraeritrocitario y los cambios en los distintos iones plasmáticos, inducidos por la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$ , vemos que el papel modulador ejercido por el eritrocito en los cambios observados en el equilibrio ácido-base a nivel plasmático (tal como propone Lidinger y col, 1992) cambió ostensiblemente en nuestros experimentos, lo que podría explicar los cambios vistos al aplicar el algoritmo de Stewart.

En reposo, durante la fase previa a la realización de ejercicio físico, se admite una pérdida de agua a nivel renal, que es compensada a nivel plasmático con agua procedente de compartimentos distintos al muscular y al intraeritrocitario. Durante el ejercicio físico se produjo una salida de agua desde el compartimento vascular equivalente al 8-10% del volumen plasmático (0.35 l), observándose tanto en el territorio activo como inactivo (figuras 34 y 55), mientras que en el territorio muscular se incrementó en  $0.32 \text{ l}\cdot\text{kg}^{-1}$  de peso seco (algo superior en los CS que en los AS), lo que hace que el volumen total de agua que pasó a cada cuádriceps fuera de 0.22 l (0.44 l en ambos cuádriceps), por lo que el transvase de líquidos desde el territorio vascular sólo explicaría un 80% del acumulado a nivel de la musculatura activa. Estos datos concuerdan con lo descrito en la literatura (Sjøgaard, 1983, 1986, 1988 y 1990). Como vimos en la figura 37, los eritrocitos no parecen captar ni perder agua de forma drástica, ni en situación control ni con el uso del AML. Luego el 20% restante debe proceder de otros territorios.

Los cambios de las  $[Na^+]_{plasma}$  en el territorio inactivo son explicados en gran medida por los cambios en el volumen plasmático (figuras 15 y 55), contrastando con las  $[Cl^-]_{plasma}$  que se mantienen prácticamente estables, por lo que la relación  $Na^+/Cl^-$  tiende a incrementar su valor a lo largo del ejercicio, es decir los movimientos de agua están mas relacionados con los cambios de  $Na^+$  que con los de  $Cl^-$ . En el territorio activo, a nivel venoso se observa que los cambios en plasma de las  $[Na^+]$  y de  $[Cl^-]$  no pueden ser explicados totalmente por la hemoconcentración secundaria al ejercicio físico, al igual que ocurre con los cambios a nivel arterial (figuras 34 y 35), esto sugiere la participación de mecanismos que modifican el equilibrio hidro-electrolítico. Por ejemplo, es

interesante observar la notable diferencia de las  $[Cl^-]$  a nivel venoso y arterial (figura 35), que puede ser explicada por el intercambio  $HCO_3^-/Cl^-$  y como esto no parece afectarse de forma importante con la inhibición del antiportador  $Na^+/H^+$ . El intercambio  $HCO_3^-/Cl^-$  también puede explicar las diferencias observadas entre las  $[Na^+]$  y de  $[Cl^-]$  en el territorio inactivo y explicar en parte el incremento de la relación  $Na^+/Cl^-$  a nivel venoso en el territorio activo, durante el ejercicio. El resto de iones fue estudiado de forma independiente con anterioridad.

De forma clásica, se ha venido usando en la práctica clínica el concepto de "anion gap" ( $A.G_{c1c}$ ), en conjunción con el diagrama de Davenport y la relación  $Na^+/Cl^-$  para la valoración de los desórdenes mixtos de equilibrio ácido-base (Emmett y Seldin, 1989). Se observa que, durante el ejercicio, a nivel venoso en el territorio activo hay una clara elevación de la  $pCO_2$  (figura 36) asociada a una situación que podría ser descrita como una acidosis metabólica con  $A.G_{c1c}$  elevado, lo que concuerda con una acidosis láctica, corroborándose esto último al desaparecer una gran parte del desbalance iónico con la fórmula que incluye  $[Lact^-]$ , es decir en el  $A.G_{ejer.}$ . Esta situación pero con normalización de los niveles de  $pCO_2$  se observa durante la fase de recuperación en el territorio activo; y en el inactivo prácticamente durante toda la prueba (ver figuras 36 y 56). Si observamos la evolución a nivel arterial de los valores de pH (figura 28) y  $A.G_{c1c}$  (figura 36), se observa que, en los sujetos controles a pesar de la existencia del incremento del  $A.G_{c1c}$  no se observa que el pH caiga por debajo de 7.4, con lo que se puede considerar una situación de acidosis láctica compensada a nivel respiratorio, en cambio en los AS a pesar una de existir una dinámica respiratoria de similares características (figura 29), no se compensa la acidosis metabólica ya que el AML añadió una pérdida de bases a la situación vista en los CS. Cuando, durante la recuperación, desaparece la compensación respiratoria, tanto los AS como los CS entran en una situación de acidosis con  $A.G_{c1c}$  elevado (figura 36), que al no estar elevado el  $A.G_{ejer.}$  se puede considerar como acidosis láctica (figura 36).

## CONCLUSIONES.

1.- En el presente estudio, se ha demostrado que el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , que se considera un mecanismo básico de regulación del equilibrio ácido-base y del balance hidro-electrolítico a nivel celular, juega un importante papel en el control de la homeostasis del medio interno del ser humano, especialmente durante la realización de ejercicio físico intenso.

2.- Para inhibir el antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en el ser humano *in vivo* se usó el clorhidrato de amiloride, en dosis de 0.29-0.86 mg/kg de peso, administrado por vía oral y a corto plazo. El uso de dichas dosis, en las condiciones experimentales descritas, no conllevó en ningún caso la aparición de efectos secundarios adversos.

3.- En reposo, se dieron importantes cambios en las variables fisiológicas controladas a nivel renal, con incrementos en la excreción de sodio y bicarbonato, y un considerable ahorro de potasio e hidrogeniones; si bien, estos cambios fueron completamente compensados a nivel sistémico, prácticamente en todos los casos. Las modificaciones inducidas a nivel renal y la drástica reducción del transporte tubular neto de hidrogeniones, ponen de manifiesto la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en las células tubulares renales.

4.- Durante la realización de ejercicio físico intenso, con la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  se evidenciaron cambios notables en el equilibrio ácido-base y en el balance hidro-electrolítico, que conllevaron importantes modificaciones en la respuesta fisiológica habitual al esfuerzo físico, destacando los cambios en el tiempo de duración de las pruebas de esfuerzo y en el intercambio gaseoso.

5.- Bajo las condiciones fisiológicas observadas durante el ejercicio a nivel venoso, caracterizadas por un pH cercano a 7.1, una  $\text{pO}_2$  de 35 mm Hg, una  $\text{pCO}_2$  entre 80-90 mm Hg y una  $[\text{Lact-}]$  de  $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$  en plasma, la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en la membrana plasmática del eritrocito se hizo evidente y propició una potenciación del efecto Bohr, con un importante desplazamiento hacia la derecha de la curva de saturación parcial de la hemoglobina por el oxígeno, en los puntos inferiores de dicha curva; lo que conllevó un incremento del coeficiente de capacitancia de la sangre para el oxígeno. Estos cambios, asociados a los mayores niveles de  $\text{pO}_2$  a nivel periférico, indujeron reajustes en la dinámica cardio-circulatoria y en la respuesta metabólica, que podrían haber facilitado el incremento en la duración de las pruebas de esfuerzo.

6.- Por contra, la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  en la membrana plasmática del eritrocito, no parece haber afectado la dinámica de funcionamiento del tampón carbónico-bicarbonato, como demuestra la preservación de la velocidad de reciclado  $\text{CO}_2 \leftrightarrow \text{HCO}_3^-$  y las similares diferencias arterio-venosas en las  $[\text{Cl}^-]$ .

7.- Durante la realización de ejercicio físico intenso, comparando los datos en situación de inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  frente a los de la situación control, se ve que existieron similares pérdidas de  $\text{K}^+$  desde el territorio muscular activo, así como similares niveles de  $[\text{K}^+]$  a nivel venoso, mientras que se presentó un notable incremento en la  $[\text{K}^+]$  a nivel arterial, lo que concuerda con una disminución del "volumen de distribución efectivo" para el  $\text{K}^+$ . En nuestros experimentos, hemos comprobado la reducción de la recaptación de  $\text{K}^+$  en la musculatura activa tras la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ ; siendo previsible que esto mismo ocurra en los territorios inactivos, lo que unido a posibles modificaciones en la distribución sistémica del gasto cardíaco, con un incremento del flujo sanguíneo hacia a los tejidos activos, explicaría la disminución de dicho volumen de distribución. Por tanto, la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  afectó la dinámica habitual de eliminación-recaptación de  $\text{K}^+$  en el territorio activo, así como entre los territorios activos e inactivos.

8.- El "volumen de distribución efectivo" del lactato también parece reducido tras la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , ya que se observa una menor diferencia arterio-venosa en las  $[\text{Lact}^-]$  en plasma, debido al mayor acúmulo de lactato a nivel arterial, secundario a la reducida recaptación del mismo. Esta situación se asoció a un notable incremento del atrapamiento de  $\text{Lact}^-$  en el interior de los eritrocitos, que en éstas circunstancias, parece haberse convertido en un sumidero, hacia donde fue enviado parte del lactato plasmático eliminado desde la musculatura activa.

9.- Se dieron diferencias notables en el equilibrio ácido-base tras la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , entre las que cabe destacar, la presencia de una acidosis plasmática claramente instaurada durante la realización del ejercicio, ya que, a la acidosis metabólica láctica propia del ejercicio y que en los sujetos controles era compensada con la actuación del aparato respiratorio, se asocia entre otros cambios, una pérdida de bases a nivel renal que descompensan la situación anterior, sin que se observara una mayor compensación a nivel respiratorio. Durante la fase de recuperación, la acidosis plasmática se acentuó en los sujetos que ingirieron amiloride y apareció en los sujetos controles. Precisamente, en la fase de recuperación la compensación a nivel respiratorio es menos importante, luego el incremento o la aparición de la acidosis plasmática pone de manifiesto que los demás mecanismos que se encargan de retirar la carga ácida, principalmente ligada al lactato, no son tan rápidos y potentes como el aparato respiratorio, además de haber sido enlentecidos con la inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ .

10.- El estudio de la SID y la aplicación del análisis cuantitativo del equilibrio ácido-base por medio del algoritmo de Stewart, puso de manifiesto la importancia de las variables independientes en la determinación de la  $[\text{H}^+]$  en plasma. La  $\text{pCO}_2$  a nivel venoso durante el ejercicio es la variable independiente cuantitativamente más importante, pero en el resto de territorios y circunstancias pasan a serlo la SID y la  $\text{P}_{\text{TOT}}$ . La inhibición del antiportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , indujo cambios en la precisión de las estimaciones de la  $[\text{H}^+]$ .

11.- Si bien los cambios en las  $[\text{Na}^+]$  en plasma, pueden ser explicadas por los cambios en el volumen plasmático en los territorios inactivos, no sucede lo mismo con las  $[\text{Cl}^-]$ . Por contra, los cambios en las concentraciones iónicas vistas en el territorio activo no siguen los cambios en el volumen plasmático, lo que indican la presencia de mecanismos, como el que propicia el intercambio  $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ , que pueden alterar dichas concentraciones.

## REFERENCIAS

**Aickin, C.C. y Thomas, R.C.** "An investigation of the ionic mechanism of intracellular pH regulation in mouse soleus muscle fiber." *J. Physiol.*, 273: 295-316, 1977 b.

**Aickin, C.C. y Thomas, R.C.** "Micro-electrode measurement of intracellular pH and buffering power of mouse soleus muscle fiber." *J. Physiol.*, 267: 791-810, 1977 a.

**Aickin, C.C.** "Intracellular pH regulation by vertebrate muscle." *Ann. Rev. Physiol.*, 48: 349-361, 1986.

**Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. y Watson, J.D.** "The plasma membrane." Pags. 275-340 en *Molecular Biology of the cell*. 2ª Ed. Garland Publishing, Inc., New York, 1989.

**Allsop, P., Brooks, S., Cheetham, M., Hall, G.M. y Williams, C.** "Sequential muscle pH measurements during recovery from sprint running in man." *J. Physiol.*, 400:28P, 1988.

**Allsop, P., Hall, G.M., Jorfeldt, L. y Rutberg, H.** "Acid-base balance during recovery from brief high-intensity cycle exercise in man." *J. Physiol.*, 409:18P, 1989.

**Alper, S.L.** "The band 3-related anion exchanger (AE) gene family." *Ann. Rev. Physiol.*, 53: 549-564, 1991.

**Andersen, P. y Saltin, B.** "Maximal perfusion on skeletal muscle in man." *J. Physiol.*, 336: 233-249, 1985.

**Andersen, P., Adams, R.P., Sjøgaard, G., Thorboe, A. y Saltin, B.** "Dynamic Knee-extension as a model for the study of an isolated exercising muscle in man." *J. Appl. Physiol.*, 59: 1647-1657, 1985.

**Aronson, P.S.** "Kinetic properties of the plasma membrane  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger." *Ann. Rev. Physiol.*, 47: 545-560, 1985.

**Askanazi, J., Silverberg, P.A., Foster, R.J., Hyman, A.I., Milic-Emili, J. y Kinney, J.M.** "Effects of respiratory apparatus on breathing pattern." *J. Appl. Physiol.*, 48:577-580, 1980.

**Åstrand, P.O. y Rodhal, K.** Text Book of Physiology: Physiological basis of exercise. McGraw-Hill, Singapore, 1986.

**Baba, W.I., Lant, A.F., Smith, A.J., Townshend, M.M. y Wilson, G.M.** "Pharmacological effects in animals and normal human subjects of the diuretic amiloride hydrochloride (MK-870)." *Clin. Pharmac. Therap.*, 9: 318-327, 1968.

**Band, D.M., Lim, M., Linton, R.A.F. y Wolff, C.B.** "Changes in arterial plasma potassium during exercise." *J. Physiol.*, 328:74-75, 1982.

**Bangsbo, J., Gollnick, P.D., Graham, T.E., Juel, C., Kiens, B., Mizuno, M. y Saltin, B.** "Anaerobic energy production and  $\text{O}_2$  deficit-debt relationship during exhaustive exercise in humans." *J. Physiol.* 422: 539-559, 1990.

**Bangsbo, J., Graham, T.E., Kiens, B. y Saltin, B.** "Elevated muscle glycogen and anaerobic energy production during exhaustive exercise in man." *J. Physiol.* 451: 205-227, 1992.

**Bangsbo, J., Johansen, L., Graham, T.E. y Saltin, B.** "Lactate and  $\text{H}^+$  effluxes from human skeletal muscle during intense, dynamic exercise." *J. Physiol.*, 462: 115-133, 1993.

**Bascom, D.A., Clement, I.D., Cunningham, D.A., Friedland, J.S., Paterson, D.J. y Robbins, P.A.** "Changes in arterial plasma potassium ( $[\text{K}^+]_a$ ) and ventilation ( $V_E$ ) during exercise in subjects with McArdle's syndrome." *J. Physiol.*, 417:141P, 1989.

**Beaver, W.L., Wasserman, K. y Whipp, B.J.** "A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange." *J. Appl. Physiol.*, 60:2020-2027, 1986b.

**Beaver, W.L., Wasserman, K. y Whipp, B.J.** "Bicarbonate buffering of lactic acid generated during exercise." *J. Appl. Physiol.*, 60:472-478, 1986a.

**Bergström, J.** "Muscle electrolytes in man. Determined by neutron activation analysis on needle biopsy specimens. A study on normal subjects, kidney patients and patients with chronic diarrhea. *Scan. J. Cli. Lab. Invest.* 14 (Suppl. 68): 1-110, 1962.



- Bergström, J., Alvestrand, P., Fürst, P., Hultman, E., Sahlin, K., Vinnars, E. y Widström, A.** "Influence of severe potassium depletion and subsequent repletion with potassium on muscle electrolytes, metabolites and amino acids in man." *Clin. Sci. & Mol. Med.* 51: 589-99, 1976.
- Bidani, A. y Crandall, E.D.** "Velocity of CO<sub>2</sub> exchanges in lungs." *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 639-652, 1988.
- Blake, G.J. y Paterson, D.J.** "Effect of noradrenaline on systolic blood pressure and mean aortic flow in the anaesthetized rabbit during hyperkalaemia." *J. Physiol.*, 446:216P, 1992.
- Boron, W.F.** "Cellular buffering and intracellular pH". Pags. 33-56 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989b.
- Boron, W.F.** "Chemistry of buffer equilibria in blood plasma." Pags. 3-32 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989a.
- Boron, W.F.** "Intracellular pH regulation in epithelial cells." *Ann. Rev. Physiol.*, 48: 377-388, 1986.
- Brenner, B.M. y Berliner, R.W.** "The transport of potassium." En *Handbook of Physiology*, Section 8: Renal Physiology, American Physiology Society, Washington, D.C., 1973.
- Brooks, G.A.** "Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 17:22-31, 1985.
- Brooks, G.A.** "Current concepts in lactate exchange." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23:895-906, 1991.
- Brooks, G.A. y Fahey, T.** *Exercise Physiology*. MacMillan, Los Angeles, 1984.
- Buckler, K.J., Vaughan-Jones, R.D., Peers, C., Lagadic-Gossmann, D. y Nye, P.C.G.** "Effects of extracellular pH, Pco<sub>2</sub> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> on the intracellular pH in isolated type-I cells of the neonatal rat carotid body." *J. Physiol.* 444: 703-721, 1991b.
- Buckler, K.J., Vaughan-Jones, R.D., Peers, C., y Nye, P.C.G.** "Intracellular pH and its regulation in isolated type-I carotid body cells of the neonatal rat." *J. Physiol.* 436: 107-129, 1991a.
- Buono, M. y Yeager, J.E.** "Intraerythrocyte and plasma lactate concentration". *Eur. J. Appl. Physiol.*, 55: 326-329, 1990.
- Bushinsky, D.A.** "Internal exchange of hydrogen ions: Bone." Pags. 69-88, en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.



- Busse, M.W., Maassen, N. y Konrad, H.** "Relation between plasma  $K^+$  and ventilation during incremental exercise after glycogen depletion and repletion in man." *J. Physiol.*, 443:469-476, 1991.
- Cady, E.B., Jones, D.A., Lynn, J. y Newham, D.J.** "Changes in force and intracellular metabolites during fatigue in human skeletal muscle." *J. Physiol.*, 418: 311-325, 1989.
- Canessa, C.M., Schild, L., Buell, G., Thorens, B., Gautschi, I., Horisberger, J. D. y Rosier, B.C.** "Amiloride-sensitive epithelial  $Na^+$  channel is made of three homologous subunits." *Nature* 361: 467-470, 1993.
- Carrasco, J.L.** El Método Estadístico en la Investigación Médica. Ed. Ciencia 3 S.A., Madrid, 1989.
- Charney, A.N. y Feldman, G.M.** "Internal exchanges of hydrogen ions: Gastrointestinal tract." Pags. 89-105 en The regulation of acid-base balance. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.
- Clark, J.D. y Limbird, L.E.** " $Na^+-H^+$  exchanger subtypes: a predictive review." *Am. J. Physiol.*, 261 (Cell Physiol. 30): C945-C953, 1991.
- Clausen, T.** "Regulation of active  $Na^+-K^+$  transport in skeletal muscle." *Physiol. Rev.*, 66:542-580, 1986.
- Connett, R.J., Honig, C.R., Gayeski, T.E.J. y Brooks, G.A.** "Defining hypoxia: a system view of  $VO_2$ , glycolysis, energetics, and intracellular  $PO_2$ ." *J. Appl. Physiol.*, 68(3): 833-842, 1990.
- Conway, J., Paterson, D.J., Petersen, E.S. y Robbins, P.A.** "Changes in arterial plasma potassium and ventilation in response to exercise in humans." *J. Physiol.*, 399:36P, 1988.
- Costill, D.L. y Saltin, B.** "Muscle glycogen and electrolytes following exercise and thermal dehydration." Pags. 352-360, en Metabolic adaptations to prolonged physical exercise. Howald & Poortmans (Eds.). Birkhauser, Basel, 1975.
- Davies, N.M.** "Modulation of ATP sensitive  $K^+$  channels in skeletal muscle by protons." *Nature Lond.*, 343: 375-377, 1990.
- Davis, J.A.** "Anaerobic threshold: review of the concept and directions for future research." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 17:6-18, 1985.
- Deuticke, B.** "Monocarboxylate transport in erythrocytes." *J. Memb. Biol.*, 70: 80-103, 1982.
- Donaldson, G.C., Newstead, C.G. y Sneyd, J.R.** "The relationship between arterial potassium and carbon dioxide production rate during rowing in man." *J. Physiol.*, 414:27P, 1989.

**Donovan, C.M. y Brooks, G.A.** "Endurance training affects lactate clearance, not lactate production." *Am. J. Physiol.*, 244:E83-E92, 1983.

**Donovan, C.M. y Pagliassotti, M.J.** "Enhanced efficiency of lactate removal after endurance training." *J. Appl. Physiol.*, 68:1053-1058, 1990.

**DuBose, Th. D. Jr. y Bidani, A.** "Kinetics of CO<sub>2</sub> exchange in the kidney." *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 653-667, 1988.

**Emmett, M. y Seldin, D.W.** "Evaluation of acid-base disorders from plasma composition". Pags. 213-263 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989,a.

**Emmett, M. y Seldin, D.W.** "Overproduction acidosis". Pags. 391-429 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989,b.

**Escobales, N. y Canessa, M.** "Amiloride-sensitive Na<sup>+</sup> transport in human red cells: evidence for a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange system." *J. Membr. Biol.*, 90(1): 21-28. 1986.

**Estrada, F. y Sánchez, J.A.** "The effect of amiloride on the resting potential and the electrical constants of frog skeletal muscle fibres." *J. Physiol.*, 433: 705-717, 1991.

**Ferretti, G., Kayser, B., Schena, F., Turner, D.L. y Hoppeler, H.** "Regulation of perfusive O<sub>2</sub> transport during exercise in human: Effects of changes in haemoglobin concentration." *J. Physiol.*, 455: 679-688, 1992.

**Fink, R., Hase, S., Lüettgau, H.C. y Wettwer, E.** "The effect of cellular energy reserves and internal calcium ions on the potassium conductance in skeletal muscle of the frog." *J. Physiol. Lond.*, 336: 211-228, 1983.

**Fitts, R.H.** "Cellular mechanisms of muscle fatigue." *Physiol. Rev.*, 74: 49-94, 1994.

**Fitts, R.H.** "Substrate supply and energy metabolism during brief high intensity exercise: importance in limiting performance." En *Perspectives in exercise science and sport medicine*. Energy metabolism in exercise and sport. (Lamb y Gissolfi, Eds.). Dubuque IA: Brown & Benchmark, 1992.

**Forsberg, A.M., Nilsson, E., Werneman, J., Bergström, J. y Hultman, E.** "Muscle composition in relation to age and sex." *Clin. Sci.* 81: 249-56. 1991.

**Foxdal, P., Sjödin, B., Rudstam, H., Östman, C. y Hedenstierna, G.** "Lactate concentration differences in plasma, whole blood, capillary finger blood and erythrocytes during submaximal graded exercise in humans." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 61: 218-222, 1990.

**Gaebelein, C.J. y Ladd, C.M.** "Blood flow, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> y pH during progressive working contractions in a whole muscle group." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 54:638-642, 1986.

- Ganong, W.F.** "Bases generales y celulares de la Fisiología Médica." Pags. 3-40 en Fisiología Médica. 13ª Ed. El manual moderno, S. A. Mexico, D.F., 1992.
- Garty, H. y Benos, D.J.** "Characteristics and regulatory mechanisms of the amiloride-blockable Na<sup>+</sup> channel." *Physiol. Rev.*, 68: 309-373, 1988.
- Gibson, H. y Edwards, R.H.T.** "Muscular exercise and fatigue." *Sports Med.* 2: 120-132, 1985.
- Grayson, M.F., Smith, A.J. y Smith R.N.** "Absorption, distribution, and elimination of 14C-amiloride in normal human subjects." *Br. J. Pharmac.*, 48: 646-649, 1971.
- Greenhaff, P.L., Gleeson, M. y Maughan, R.J.** "Diet-induced metabolic acidosis and the performance of high intensity exercise in man." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57: 531-539, 1988a.
- Greenhaff, P.L., Gleeson, M. y Maughan, R.J.** "Dietary composition and acid-base status: limiting factors in the performance of maximal exercise in man?." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 56: 444-450, 1987b.
- Greenhaff, P.L., Gleeson, M. y Maughan, R.J.** "The effects of dietary manipulation on blood acid-base status and the performance." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 56: 331-337, 1987a.
- Greenhaff, P.L., Gleeson, M. y Maughan, R.J.** "The effects of diet on muscle pH and metabolism during high intensity exercise." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57: 531-539, 1988b.
- Greenleaf, J.E.; Van Beaumont, W.; Brock, P.J.; Morse, J.T. y Mangseth, G.R.** "Plasma volume and electrolyte shifts with heavy exercise in sitting and supine positions." *Am. J. Physiol.*, 236:R206-R214, 1979.
- Grinstein, S. y Rothstein, A.** "Mechanisms of regulation of the Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." *J. Membrane Biol.*, 90: 1-12. 1986.
- Gross, G. y Dodgson, S.J.** "Velocity of CO<sub>2</sub> exchanges in muscle and liver." *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 669-694, 1988.
- Gunn, R.B.** "Buffer equilibria in red blood cells." Pags. 57-67, en The regulation of acid-base balance. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.
- Hainaut, K. y Duchateau, J.** "Muscle fatigue, effects of training and disuse." *Muscle Nerve.* 12: 660-669, 1989.
- Harris, P. y Snow, D.H.** "Alterations in plasma potassium concentrations during and following short-term strenuous exercise in the horse." *J. Physiol.*, 376:46P, 1986.
- Heigenhauser, G.J.F., Jones, N.L., Kowalchuck, J.M. y Lindinger, M.I.** "The role of physicochemical systems in plasma acid-base control in exercise." Pags. 360-374, en Biochemistry of exercise VII, International series on sport sciences 21. (Taylor, Gollnick, Green, Ianuzzo, Earl, Noble, Métivier, Sutton Eds.). Human kinetics books, Illinois, 1989.

**Hermansen, L., Orheim, A. y Sejersted, O.M.** "Metabolic acidosis and changes in water and electrolyte balance in relation to fatigue during maximal exercise of short duration." *Int. J. Sports Med.*, 5:110-115, 1984.

**Hill, A.V.** "The revolution in muscle physiology." *Physiol. Rev.*, 12: 56-67. 1932.

**Hirsch, J.A. y Bishop, B.** "Human breathing patterns on mouthpiece or face mask during air, CO<sub>2</sub>, or low O<sub>2</sub>." *J. Appl. Physiol.*, 53:1281-1290, 1982.

**Hoffmann, E.K. y Simonsen, L.O.** "Membrane mechanisms in volume and pH regulation in vertebrate cells." *Physiol. Rev.*, 69 (2): 315-382, 1989.

**Honig, C.R., Connett, R.J. y Gayeski, T.E.** "O<sub>2</sub> transport and its interaction with metabolism; a system view of aerobic capacity." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24 (1): 47-53. 1992.

**Hugh, G.W.** "Hyperoxia and human performance: a brief review." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 14(4): 253-262, 1982.

**Hughson, R.L. y Green, H.J.** "Blood acid-base and lactate relationship studied by ramp work tests." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 14:297-302, 1982.

**Hultman, E. y Sahlin, K.** "Acid-base balance during exercise." *Exercise and Sports Sciences Reviews*, 8:41-128, 1981.

**Huxley, A.F. y Taylor, R.E.** "Local activation of striated muscle fibres." *J. Physiol.*, 144: 426-441, 1958.

**Jensen, F.B.** "Multiple strategies in oxygen and carbon dioxide transport by hemoglobin." pp 55-78 In: A. J. Woakes, M. K. Grieshaber, and C. R. Bridges. Physiological strategies for exchange and metabolism. Seminar Series 41. Cambridge Univ. Press. 1991.

**Jones, N.L., Sutton, J.R.; Taylor, R. y Toews, C.J.** "Effects of pH on cardiorespiratory and metabolic responses to exercise." *J. Appl. Physiol.*, 43:959-964, 1977.

**Jordfelt, L., Juhlin-Dannfelet, A. y Karlsson, J.** "Lactate release in relation to tissue lactate in human skeletal muscle during exercise." *J. Appl. Physiol.*, 44: 350-352, 1987.

**Juel, C.** "Human muscle lactate transport can be studied in sarcolemal giant vesicles made from needle-biopsies." *Acta Physiol. Scand.*, 142: 133-134, 1991a.

**Juel, C.** "Muscle lactate transport studied in sarcolemal giant vesicles." *Biochim. Biophys. Acta.*, 1065: 15-20, 1991b.

**Juel, C.** "The effect of  $\beta_2$ -adrenoceptor activation on ion-shifts and fatigue in mouse soleus muscles stimulated *in vitro*." *Acta Physiol. Scand.*, 134:209-216, 1988.

**Juel, C. y Wibrand, F.** "Lactate transport in isolated mouse muscle studied with a tracer-technique kinetics, stereospecificity, pH dependency and maximal capacity." *Acta Physiol. Scand.*, 137: 33-39, 1989.

**Juel, C., Bangsbo, J.; Graham, T. y Saltin B.** "Lactate and potassium fluxes from human skeletal muscle during and after intense, dynamic, knee extensor exercise." *Acta Physiol. Scand.*, 140:147-159, 1990.

**Karlsson, J. y Jacobs, I.** "Onset of blood lactate accumulation during muscular exercise as a threshold concept. I. Theoretical consideration." *Int. J. Sports Med.*, 3:190-201, 1982.

**Kelman, G.R.** "Digital computer subroutine for conversion of oxygen tension into saturation." *J. Appl. Physiol.*, 21: 1375-1376, 1966.

**Kirkendall, D.T.** "Mechanisms of peripheral fatigue." *Med. Sci. Sport Exerc.*, 22 - 4º: 444-449, 1990.

**Klocke, R.A.** "Velocity of CO<sub>2</sub> exchanges in blood." *Ann. Rev. Physiol.*, 50: 625-637, 1988.

**Koeppen, B. M. y Giebisch, G.** "Segmental hydrogen transport" Pags. 139-167 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.

**Koike, A., Weiler-Ravell, D., McKenzie, D.K., Zanconato, S. y Wasserman, K.** "Evidence that the metabolic acidosis threshold is the anaerobic threshold." *J. Appl. Physiol.*, 68:2521-2526, 1990.

**Kowalchuk, J.M., Heigenhauser, G.J.F., Lindinger, M.I., Obminski, G., Sutton, J.R. y Jones, N.L.** "Role of lungs and inactive muscle in acid-base control after maximal exercise." *J. Appl. Physiol.*, 65:2090-2096, 1988b.

**Kowalchuk, J.M., Heigenhauser, G.J.F., Lindinger, M.I., Sutton, J.R. y Jones, N.L.** "Factors influencing hydrogen ion concentration in muscle after intense exercise." *J. Appl. Physiol.*, 65:2080-2089, 1988a.

**Kremer, D., Boddy, K., Brown, J.J., Davies, D.L., Fraser, R., Lever, A.F., Morton, J.J. y Robertson, J.I.S.** "Amiloride in the treatment of primary aldosteronism and essential hypertension." *Clin. Pharmac. Therap.*, 7: 151-157, 1979.

**Lännergren, J. y Westerblad, H.** "Force decline due to fatigue and intracellular acidification in isolated fibres from mouse skeletal muscle." *J. Physiol.*, 434:307-322, 1991.

**Lant, A.F., Smith, A.J. y Wilson, G.M.** "Clinical evaluation of amiloride, a potassium-sparing diuretic." *Clin. Pharmac. Ther.*, 10:50-63, 1969.

- Laski, M.E. y Kurtzman, N.A.** "Evaluation of acid-base disorders from the urine." Pags. 265-283 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.
- Lind, F.G.** "Respiratory drive and breathing pattern during exercise in man." *Acta Physiol. Scand.*, Suppl 533, 1984.
- Lindinger, M.I. y Heigenhauser, G.J.F.** "Acid-base systems in skeletal muscle and their responses to exercise." Pags. 343-347, en *Biochemistry of exercise VII*, International series on sport sciences 21. (Taylor, Gollnick, Green, Ianuzzo, Earl, Noble, Métivier, Sutton Eds.). Human kinetics books, Illinois, 1989.
- Lindinger, M.I., Heigenhauser, G.J.F. y McKelvie, R.S.** "Lactate and K<sup>+</sup> shuttling in man during intensive exercise." *Can. J. Physiol. Pharmac.*, 68(5): AXIX, 1990, a.
- Lindinger, M.I., Heigenhauser, G.J.F., McKelvie, R.S. y Jones, N.L.** "Role of nonworking muscle on blood metabolites and ions with intense intermittent exercise." *Am. J. Physiol.*, 258:R1486-R1494, 1990, b.
- Lindinger, M.I., Heigenhauser, G.J.F., McKelvie, R.S. y Jones, N.L.** "Blood ion regulation during repeated maximal exercise and recovery in humans." *Am. J. Physiol.*, 262:R126-R136, 1992.
- Linton, R.A.F. y Band, D.M.** "The effect of potassium on carotid chemoreceptor activity and ventilation in the cat." *Respiration Physiology*, 59:65-70, 1985
- Maclaren, P.M., Gibson, H., Parry-Billings, M. y Edwards, R.H.** "A review of metabolic and physiological factors in fatigue." *Exerc. Sport Sci. Rev.*, 18: 29-66, 1989.
- Mahnensmith, R.L. y Aronson, P.S.** "The plasma membrane sodium-hydrogen exchanger and its role in physiological and patophysiological processes." *Circ. Res.*, 56(6): 773-788, 1985.
- Makimaa, M.** "Adrenergic regulation of hemoglobin oxygen affinity in rainbow trout red cells." *J. Comp. Physiol.*, 152: 67-72, 1983.
- Marcos, E.** "Aspectos fisiológicos de la fatiga inducida por el ejercicio físico. Alteraciones electrolíticas y del equilibrio ácido-base." Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla. 1992.
- Marcos, E., Fernández, M.A. y Ribas, J.** "Equilibrio ácido-base y balance electrolítico en el ejercicio de alta intensidad." *Arch. Med. Dep.*, IX(33): 15-22, 1992.
- Martin, G. y Morad, M.** "Activity-induced potassium accumulation and its uptake in frog ventricular muscle." *J. Physiol.*, 328:205-227, 1982.
- McLellan, T.M.** "Ventilatory and plasma lactate response with different exercise protocols: A comparison of methods." *Int. J. Sports Med.*, 6:30-35, 1985.

- Medbø, J.I. y Sejersted, O.M.** "Acid-base and electrolyte balance after exhausting exercise in endurance-trained and sprint-trained subjects." *Acta Physiol. Scand.*, 125:97-109, 1985.
- Medbø, J.I. y Sejersted, O.M.** "Plasma potassium changes with high intensity exercise." *J. Physiol.*, 421:105-122, 1990.
- Mellerowicz, H.** Ergometría. Editorial médica panamericana. Buenos Aires. 1984.
- Millar, J.A., Fraser, R., Mason, P., Leckie, B., Cumming, A.M.M. y Robertson, J.I.S.** "Metabolic effects of high dose amiloride and spironolactone: a comparative study in normal subjects." *Br. J. clin. Pharmacol.*, 18: 369-375, 1984.
- Moody, W. Jr.** "Effects of intracellular  $H^+$  on the electrical properties of excitable cells." *Ann. Rev. Neurosci.*, 7:257-278, 1984.
- Morris, A.H. y Crapo, R.O.** "Buffer equilibria in specialized tissues: Lungs." Pags. 123-137 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989a.
- Motais, R., García-Romeu, F. y Borgese, F.** "The control of  $Na^+/H^+$  exchange by molecular oxygen in trout erythrocytes. A possible role of hemoglobin as a transducer." *J. Gen. Physiol.*, 90: 197-207, 1987.
- Nattie, E.E.** "The alfastat hypothesis in respiratory control and acid-base balance." *J. Appl. Physiol.*, 1201-1207, 1990.
- Newstead, C.G.; Donaldson, G.C. y Sneyd, J.R.** "Potassium as a respiratory signal in humans." *J. Appl. Physiol.*, 69:1799-1803, 1990.
- Newstead, C.G.** "The relationship between arterial potassium and ventilation during exercise in man." *J. Physiol.*, 403:101P, 1988.
- Parkhouse, W.S., McKenzie, D.C., Hochachka, P.W. y Ovalle, W.K.** "Buffer capacity of desproteinized human vastus lateralis muscle." *J. Appl. Physiol.*, 58: 14-17, 1985.
- Pitts, R.F.** "Regulación renal del equilibrio ácido básico." Pags. 173-206, en *Fisiología del riñón y líquidos corporales*. Ed. Interamericana, Mexico, D.F., 1969.
- Poole, R.C. y Halestrap, A.P.** "Transport of lactate and other monocarboxylates across mammalian plasma membranes." *Am. J. Physiol.*, 264 (Cell Physiol. 33): C761-C782, 1993.
- Powers, S.K., Dodd, S. y Garner, R.** "Precision of ventilatory and gas exchange alterations as a predictor of the anaerobic threshold." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 52:173-177, 1984.

- Putnam, R.W., Roos, A. y Wilding, T.** "Properties of the intracellular pH-regulating system of frog skeletal muscle." *J. Physiol.* 381:205-219, 1986.
- Quintana, I., Felipe, A., Remesar, X. y Pastor-Anglada, M.** "Carrier-mediated uptake of L-(+)-lactate in plasma membrane vesicles from rat liver." *FEBS Lett.*, 235: 224-228, 1988.
- Rausch, S.M., Whipp, B.J., Wasserman, K. y Huszczuk, A.** "Role of carotid bodies in the respiratory compensation for the metabolic acidosis of exercise in humans." *J. Physiol.*, 444:567-578, 1991.
- Renaud, J.M.** "The effect of lactate on intracellular pH and force recovery of fatigued sartorius muscles of the frog, *Rana Pipiens*." *J. Physiol.*, 416: 31-47, 1989.
- Roth D.A.** "The sarcolemal lactate transporter: transmembrane determinants of lactate flux." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23:925-934, 1991.
- Roth D.A. y Brooks, G.A.** "Lactate and pyruvate transport is dominated by a pH gradient-sensitive carrier in rat skeletal muscle sarcolemal vesicles." *Arch. Biochem. Biophys.* 279-2°: 386-394, 1990.
- Sabatini, S. y Kurtzman, N. A.** "Overall acid-base regulation by the kidney." Pags. 185-209 en *The regulation of acid-base balance*. Seldin, D.W. y Ciebisch, G. (eds.). Raven Press, Ltd. New York. 1989.
- Sahlin, K.** "Effect of acidosis on energy and force generation in skeletal muscle." En: J. A. Vogel & J. Portmans (eds.) *International Series on Sports Science Vol. 13, Biochemistry of exercise*. Human Kinetics Publishers, Champaign, Illinois, 1983.
- Sahlin, K.** "Muscle fatigue and lactic acid accumulation." *Acta Physiol. Scand.*, 128 (Suppl 556):83-91, 1986.
- Saltin, B.** "Hemodynamic adaptation to exercise". *Am. J. Cardiol.* 55: 42D-47D. 1985.
- Saltin, B. y Gollnick,** "Skeletal muscle adaptability: significance for metabolism and performance." En *Handbook of Physiology*, Section 10: Skeletal Muscle, American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 1983.
- Sejersted, O.M., Vøllestad, N.K. y Medbø, J.I.** "Muscle fluid and electrolyte balance during and following exercise." *Acta Physiol. Scand.*, 128 (Suppl 556):119-127, 1986.
- Semplicini, A., Spalvins, A. y Canessa, M.** "Kinetics and stoichiometry of the human red cell Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger." *J. Membr. Biol.*, 107(3): 219-28. 1989.
- Siggaard-Andersen, O.** "Titratable acid or base of body fluids." *Ann. NY Acad. Sci.*, 133:41-58, 1966.
- Sjøgaard, G.** "Electrolytes in slow and fast muscle fibres of humans at rest and with dynamic exercise." *Am. J. Physiol.*, 245:R25-R31, 1983.



**Sjøgaard, G.** "Exercise-induced muscle fatigue: the significance of potassium." *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 583: 1-63, 1990.

**Sjøgaard, G.** "Muscle energy metabolism and electrolyte shifts during low-level prolonged static contraction in man." *Acta Physiol. Scand.*, 134:181-187, 1988.

**Sjøgaard, G.** "Water and electrolyte fluxes during exercise and their relation to muscle fatigue." *Acta Physiol. Scand.*, 128 (Suppl 556):129-136, 1986.

**Sjøgaard, G. y Saltin, B.** "Extra- and intracellular water spaces in muscles of man at rest and with dynamic exercise." *Am. J. Physiol.*, 243:R271-R280, 1982.

**Sjøgaard, G., Adams, R.P. y Saltin, B.** "Water and ion shifts in skeletal muscle of human with intense dynamic knee extension." *Am. J. Physiol.*, 248: R190-96.1985.

**Skinner, J.S. y Maclellan, T.M.** "The transition from aerobic to anaerobic metabolism." *Res. Q. Exer. Sport.*, 51: 234-248, 1980.

**Smith, A.J. y Smith, R.N.** "Kinetics and bioavailability of two formulations of amiloride in man". *Br. J. Pharmac.*, 48: 646-649, 1973.

**Smith, P.R. y Benos, D.J.** "Epithelial Na<sup>+</sup> Channels." *Ann. Rev. Physiol.*, 53: 509-530, 1991.

**Standfield, P.R.** "Tetraethyl ammonium ions and the potassium permeability of excitable cells." *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.*, 97: 1-67, 1983.

**Stanley, W.C.** "Myocardial lactate metabolism during exercise." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23: 920-924, 1991.

**Stewart, P.A.** How to understand Acid-Base: A Quantitative Acid-Base Primer for Biology and Medicine. Elsevier/North Holland, New York, 1981.

**Stewart, P.A.** Independent and dependent variables of acid base control. *Respir. Physiol.*, 33: 9-26, 1978.

**Thomas, L.J.** "Algorithms for selected blood acid-base and blood gas calculations." *J. Appl. Physiol.*, 33: 154-158, 1972.

**Tonnensen, T.I., Sandvig, K. y Olsnes, S.** "Role of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> antiports in the regulation of cytosolic pH near neutrality." *Am. J. Physiol.*, 258 (27): C1117-1126, 1990.

**Turner, D.L.** "Cardiovascular and respiratory control mechanisms during exercise: an integrated view." *J. exp. Biol.*, 160: 309-340, 1991.

**VanSlyke, D.D. y Cullen, G.E.** "Studies of acidosis 1: The bicarbonate concentration of blood plasma, its significance and its determination as a measure of acidosis. *J. Appl. Chem.* 30: 289-346, 1917.

- Vigne, P., Frelin, C. y Lazdunski, M.** "The Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> antiport is activated by serum and phorbol esters in proliferated myoblasts but not differentiated myotubes. Properties of the activation process." *J. Biol. Chem.*, 260:8008-8013, 1985.
- Vøllestad, N.K. y Sejersted, O.M.** "Biochemical correlates of fatigue. A brief review." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 57: 336-347, 1988.
- Vøllestad, N.K., Hallen, J. y Sejersted, O.M.** "Effect of exercise intensity on potassium balance in muscle and blood of man." *J. Physiol.*, 475,2: 359-368, 1994.
- Vyskocil, F.; Hník, P., Vejsada, R. y Ujec, E.** "The measurement of K<sub>e</sub><sup>+</sup> concentration changes in human muscles during volitional contractions." *Pflügers Arch.*, 399:235-237, 1983.
- Wagner, P.D.** "Gas exchange and peripheral diffusion limitation." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 24(1): 54-58. 1992.
- Walsh, M.L. y Banister, E.W.** "Possible mechanisms of the anaerobic threshold: a review." *J. Sports Med.*, 5:268-302, 1988.
- Ward, S.A., Blesovsky, L., Russack, S., Ashjian, A. y Whipp, B.J.** "Chemoreflex modulation on ventilatory dynamics during exercise in man." *J. Appl. Physiol.*, 63:2001-2007, 1987.
- Ward, S.A., Wasserman, K., Davis, J.A. y Whipp, B.J.** "Breathing-valve encumbrance and arterial blood gas and acid-base status in exercise in man." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 58:382-388, 1989.
- Wasserman, D.H., Connolly, C.C. y Pagliassotti, M.J.** "Regulation of hepatic lactate balance during exercise." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23:912-919, 1991.
- Wasserman, K.** "The anaerobic threshold measurement in exercise testing." *Chest*, 5:77-87, 1984b.
- Wasserman, K.** "The anaerobic threshold measurement to evaluate exercise performance." *Am. Rev. Respir. Dis.*, 129 Suppl.: S35-S44, 1984a.
- Wasserman, K., Beaver, W.L. y Whipp, B.J.** "Mechanisms and patterns of blood lactate increase during exercise in man." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 18:344-352, 1986b.
- Wasserman, K., Whipp, B.J. y Casaburi, R.** "Respiratory control during exercise." En *Handbook of Physiology*, Section 3: The Respiratory System, Vol. II, American Physiological Society, Bethesda, Maryland, 1986a.
- Wasserman, K., Whipp, B.J., Koyal, S.N. y Cleary, M.G.** "Effect of carotid body resection on ventilatory and acid-base control during exercise." *J. Appl. Physiol.*, 39:354-358, 1975.

- Weiner, I.M.** "Diuretics and other agents employed in the mobilization of edema fluid." Pags.: 713-731 en *The pharmacological basis of the therapeutics* (Goodman, A., Rall, Th.W., Nies, A.S. y Taylor, P. Eds.). MacMillan publishing Co., Inc. New York, 1990.
- Weinstein, Y., Magazanik, A., Grodjinovsky, A., Inbar, O.; Dlin, R.A. y Stewart, P.A.** "Reexamination of Stewart's quantitative analysis of acid-base status." *Med. Sci. Sports Exerc.*, 23:1270-1275, 1991.
- Weiss, P., Hersey, R.M., Dujovne, C.A. y Bianchine, J.R.** "The metabolism of amiloride in man." *Clin. Pharmac. Ther.*, 10: 401-406, 1969.
- Westerblad, H., Lee, J.A., Lännergren, J. y Allen D.G.** "Cellular mechanisms of fatigue in skeletal muscle." *Am. J. Physiol.*, 261 (Cell Physiol. 30): C195-C209, 1991.
- Wilson, D.F., Erecinska, M., Drown, C. y Silveri, A.** "The oxygen dependence of cellular energy metabolism." *Archs. Biochem. Biophys.*, 195: 485-493, 1979.
- Witttemberg, B.A. y Witttemberg, J.B.** "Transport of oxygen in muscle." *Ann. Rev. Physiol.*, 51: 857-878, 1989.
- Yoshida, T., Chida, M., Ichioka, M., Makiguchi, K., Eguchi, J. y Udo, M.** "Relationship between ventilation and arterial potassium concentration during incremental exercise and recovery." *Eur. J. Appl. Physiol.*, 61:193-196, 1990.
- Yoshida, T., Udo, M., Chida, M., Makiguchi, K., Ichioka, M. y Muraoka, I.** "Arterial blood gases, acid-base balance, and lactate and gas exchange variables during hypoxic exercise." *Int. J. Sports Med.*, 10:279-285, 1989.

# UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Reunido el Tribunal integrado por los abajo firmantes en el día de la fecha, para juzgar la Tesis Doctoral de D. Miguel Angel Fernandez Gomez titulada Efectos de la inhibición del antiporador sodio/hidrogenión sobre el equilibrio ácido-base e hidroelectrolítico durante el ejercicio físico. acordó otorgarle la calificación de Apts "cum laude"

Sevilla, 5 de Julio 1994

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

El Presidente

El Secretario,

El Doctorado,