

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA  
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MUSEO**

---

**TESIS DOCTORAL**

**MECANISMOS DE ACCION DE INTERVENCIONES  
CARDIOPROTECTORAS DURANTE LA ISQUEMIA  
Y LA REPERFUSION EN RATAS NORMALES E  
HIPERTROFICAS**

**JULIANA C FANTINELLI**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA SUSANA M MOSCA**

**• 2009 •**

---

	Página
<b>RESUMEN</b> .....	5
<b>ABSTRACT</b> .....	9
<b>INTRODUCCIÓN</b> .....	13
-Isquemia y Reperfusión.....	13
Alteraciones por isquemia-reperfusión.....	16
-Especies reactivas del oxígeno.....	17
-Poros de transición de permeabilidad mitocondrial.....	23
-Mecanismos cardioprotectores.....	24
-Preacondicionamiento isquémico.....	25
-Óxido nítrico.....	26
-Canales de K <sup>+</sup> dependientes de ATP.....	28
-Hipertrofia cardíaca.....	30
Tipos de hipertrofia cardíaca.....	30
Isquemia-reperfusión en corazones hipertróficos.....	32
<b>OBJETIVOS</b> .....	34
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	35
-Animales.....	35
-Protocolos experimentales.....	36
-Parámetros Medidos.....	38
-Determinaciones Bioquímicas.....	40
Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	40
Glutación reducido (GSH).....	40
Actividad citosólica de la enzima superóxido dismutasa (SOD).....	41
Contenido de proteínas.....	41

-Análisis estadístico.....	41
<b>RESULTADOS.....</b>	<b>43</b>
-Isquemia Global de 35 minutos y 2 hs de reperfusión.....	43
-Isquemia Global de 50 minutos y 2 hs de reperfusión.....	52
-Preacondicionamiento Isquémico.....	59
35 minutos de Isquemia Global y 1 ciclo de IG-R.....	59
50 minutos de Isquemia Global y 3 ciclos de IG-R.....	65
-N-Nitro-L-Arginina metil éster (L-NAME).....	71
35 minutos de Isquemia Global y 1PI en presencia de L-NAME.....	72
50 minutos de Isquemia Global, 1PI y 3PI en presencia de L-NAME.....	78
-5-Hidroidecanoato (5-HD).....	84
35 minutos de Isquemia Global y 1PI en presencia de 5-HD.....	85
50 minutos de Isquemia Global, 1PI y 3PI en presencia de 5-HD.....	90
-N-(2-Mercaptopropionil) glicina (MPG).....	97
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>104</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>112</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA CITADA.....</b>	<b>115</b>

---

Al Tano y a Pedro por su amor incondicional

---

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi directora Dra. Mosca por haberme enseñado tanto, por brindarme su experiencia, su disposición a ayudarme en todo momento, y por sobre todas las cosas por su calidez humana.

Al Dr. Cingolani por aceptarme para trabajar en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares y por creer en mí.

A Guillermo Schinella por haberme enseñado muchas de las técnicas bioquímicas realizadas en este trabajo, por sus consejos y su buena compañía.

A la Dra. Mattiazzi, que me ha permitido desarrollar este trabajo de tesis en el Centro de Investigaciones Cardiovasculares.

A Romi, Mónica, Nacho, Miriam, Inés, Omar, Carolina, Andrés y al Dr. Gende por su compañerismo, la ayuda, los consejos, las charlas en el almuerzo y los buenos y malos días.

A Irene por los consejos, los buenos momentos y porque siempre está dispuesta a ayudarme.

A todo el personal del Centro de Investigaciones Cardiovasculares por compartir el día a día.

Al Tano por sostenerme y acompañarme en los momentos difíciles, por su paciencia, sus consejos y por todo su amor.

A mi hijito Pedro por ser la razón que me estimula a querer superarme cada día y por adaptarse felizmente al ritmo de nuestras vidas.

A mis padres Mirta y Quique porque me transmitieron con su ejemplo valores de trabajo, perseverancia, me alentaron siempre a estudiar y a progresar, y me acompañaron en todo momento.

A mis hermanos Juan, Yanina y Fermín, por todo su apoyo.

---

## RESUMEN

En estudios previos realizados en ratas hipertensas espontáneas (SHR) seniles se mostró que los corazones poseen una aumentada susceptibilidad al daño por isquemia-reperfusión (I-R). Sin embargo, cuando se utilizaron corazones hipertróficos de animales adultos jóvenes la respuesta a la I-R fue variable, mostrando una similar ó menor tolerancia a la isquemia que los animales normotensos.

La sobrecarga intracelular de  $\text{Ca}^{2+}$  y la producción de especies reactivas del oxígeno (ROS) son las dos hipótesis que permiten explicar las alteraciones miocárdicas derivadas de la I-R (atontamiento, infarto y arritmias). De acuerdo a investigaciones recientes estos factores son capaces de desencadenar la formación del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (mPTP), de cuya apertura depende el daño miocárdico.

En la búsqueda de herramientas cardioprotectoras, en el año 1986, se observó que la aplicación de isquemias cortas previamente a una isquemia más prolongada logra disminuir las alteraciones miocárdicas ocasionados por la I-R. A este fenómeno se lo llamó "preacondicionamiento isquémico" (PI). Existen numerosos trabajos en animales normotensos que explican los mecanismos del PI. Sin embargo, en animales hipertensos y específicamente en SHR la información es escasa. Por lo tanto, los objetivos de este trabajo de tesis fueron: 1.- determinar la respuesta miocárdica y el estrés oxidativo frente a isquemias de distinta duración en SHR y ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de 5 a 6 meses de edad y 2.- examinar los efectos del PI sobre las variables mencionadas y los mecanismos implicados, poniendo énfasis en la participación del óxido nítrico (NO), los canales mitocondriales de  $\text{K}^+$  dependientes de ATP ( $\text{mitoK}^+_{\text{-ATP}}$ ) y la incidencia sobre el mPTP.

Se utilizaron corazones aislados y perfundidos por el sistema de Langendorff en los cuales después de un período de estabilización de 20 min se realizaron los siguientes protocolos experimentales: 1) 3hs de perfusión; 2) 35min de isquemia global (IG) y 2 hs de R; 3) 50min de IG y 2hs de R; 4) 1PI: 1 ciclo de 5min de IG y 10min de R previos a la IG de 35 min y 5) 3PI: 3 ciclos de 2min de IG y 5min de R previos a la IG de 50 min.

Para investigar la participación del NO y de los  $\text{mitoK}^+_{\text{-ATP}}$  ambos protocolos de PI (1PI y 3PI) fueron repetidos en presencia del bloqueante de la óxido nítrico sintetasa (NOS) L-

---

NAME ( $N^G$ -nitro-L-arginina metil éster), ó del bloqueante de los canales mitoK<sup>+</sup><sub>-ATP</sub> 5-HD (5-hidroxidecanoato). Para evaluar los efectos de las ROS en nuestro modelo experimental se utilizó un atrapante de dichas especies, el N-2-mercaptopropionil glicina (MPG).

Al finalizar cada protocolo experimental se determinó el tamaño del infarto (TI) y, en los homogenatos cardíacos, la concentración de las sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS), el contenido de glutatión reducido (GSH) y la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD). El estado de apertura del mPTP fue evaluado a través de la medida de la actividad citosólica de la enzima mitocondrial SODMn.

La aplicación de 35 min de IG y 2 hs de R produjo un TI de aproximadamente 30% en las ratas WKY y SHR. La concentración de TBARS sólo aumentó en las SHR. El contenido de GSH disminuyó y la actividad de SOD y SODMn aumentaron en ambas cepas. Cuando la IG fue de 50 min, el TI en SHR fue mayor ( $\approx$  60%) que el observado en las ratas WKY (40%). La concentración de TBARS y la actividad de SOD aumentaron sólo en SHR. El contenido de GSH disminuyó y la actividad citosólica de SODMn aumentó en ambas cepas.

Cuando se realizó el protocolo 1PI previo a la isquemia global de 35 min de duración, el TI disminuyó. Las TBARS disminuyeron sólo en SHR. El contenido de GSH aumentó y la actividad citosólica de SOD y SODMn disminuyó en ambas cepas. Con la aplicación de 1PI en WKY ó 3PI en SHR antes de la IG de 50 min y 2 hs de R, se observó disminución del TI en ambas cepas de ratas. Las TBARS no cambiaron, el contenido de GSH aumentó y la actividad citosólica de SODMn disminuyó en ambas cepas, pero la actividad de SOD sólo disminuyó en las SHR.

En SHR, cuando se realizó el PI en presencia de L-NAME en los dos períodos de IG (35 y 50 min), el TI fue similar al obtenido en los corazones no preacondicionados. La concentración de TBARS y la actividad citosólica de SOD y SODMn aumentaron, mientras que el contenido de GSH disminuyó. Sin embargo en las WKY, el bloqueo de la NOS, sólo modificó el efecto protector del PI cuando la IG fue de 50 min.

El bloqueo de los mitoK<sup>+</sup><sub>-ATP</sub> en los corazones preacondicionados en los dos períodos de IG de las SHR y cuando la IG fue de mayor duración en las WKY, aumentó el TI y el nivel de las TBARS se incrementó o no cambió significativamente. El contenido de GSH

---

disminuyó y la actividad citosólica de las enzimas SOD y SODMn aumentaron sólo en las SHR.

En ambas cepas el tratamiento con MPG, en presencia de IG de 50 min, disminuyó el TI, la concentración de TBARS no se modificó y el contenido de GSH aumentó. La actividad citosólica de SOD y SODMn disminuyó sólo en SHR.

Del análisis de los resultados presentados pueden extraerse las siguientes conclusiones:

- 1.- La respuesta del miocardio de las SHR adultas jóvenes comparada a la observada en ratas normotensas WKY de la misma edad cambia según la duración de la isquemia. En SHR la tolerancia es menor y la muerte celular es mayor que en las WKY cuando el período de isquemia se prolonga.
- 2.- En SHR, aunque la actividad de SOD aumentó y el sistema antioxidante GSH disminuyó, estos cambios no fueron suficientes para impedir el daño oxidativo, observándose un aumento de la peroxidación lipídica respecto a lo obtenido en las ratas WKY.
- 3.- En ambos protocolos de I-R y en las dos cepas (WKY y SHR) la actividad citosólica de SODMn aumentó, lo que sugiere que en dicha situación ocurrió la apertura del mPTP.
- 4.- Si bien el PI ejerció efecto protector frente a las dos isquemias realizadas (35 y 50 min) en ambas cepas de ratas, fue necesaria la aplicación de un mayor número de ciclos precondicionantes (en nuestro caso 3) en los corazones hipertróficos de las SHR cuando la isquemia fue de mayor duración.
- 5.- El PI disminuyó el estrés oxidativo en ambas cepas, lo que fue evidente porque aumentaron los niveles de GSH y disminuyó la actividad de la enzima SOD.
- 6.- La actividad citosólica de la SODMn disminuyó en los corazones precondicionados, sugiriendo que en estos corazones la apertura del mPTP fue menor.
- 7.- En las SHR, el NO y los mitoK<sup>+</sup><sub>-ATP</sub> participan en los efectos beneficiosos del PI frente a las isquemias de 35 y 50 min. En cambio, en las ratas normotensas WKY, ambos mediadores participan en el PI sólo cuando la isquemia fue de mayor duración.
- 8.- En ambas cepas, el tratamiento con MPG ejerció efecto cardioprotector disminuyendo el TI y el estrés oxidativo. La menor actividad citosólica de SODMn con este tratamiento sugiere que la apertura del mPTP disminuyó.

---

El preconditionamiento isquémico tanto en ratas hipertensas espontáneas (SHR) como en normotensas WKY disminuyó las alteraciones irreversibles producidas por la isquemia - reperfusión. En corazones hipertróficos la vía del efecto protector del PI frente a períodos isquémicos de 35 y 50 min involucra la participación del NO y de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP, cuya apertura promueve la entrada de  $K^+$  a la mitocondria, lo que produciría una disminución de la apertura del mPTP. Esta menor apertura llevaría a una menor liberación de ROS al citosol y la consecuente disminución del daño oxidativo observado en corazones preconditionados. En cambio, en corazones normotróficos, ambos mediadores aparecen significativamente involucrados en el PI sólo cuando la isquemia fue de 50 min. Por otra parte, el efecto cardioprotector obtenido en los corazones de ambas cepas tratados con un atrapante de ROS, que fue similar al obtenido con el PI, pone de manifiesto el papel injurioso que los ROS desempeñan en nuestro modelo de isquemia-reperfusión como determinantes de la pérdida de la integridad mitocondrial.

---

## ABSTRACT

In previous studies performed in spontaneously hypertensive senile rats it was observed an increased susceptibility to damage due to ischemia and reperfusion (I-R). However, when hypertrophied hearts from adult young rats were used, the response to I-R was variable as compared to normotensive animals.

A causal role of intracellular calcium overload and reactive oxygen species (ROS) production has been implicated in myocardial alterations derived from ischemia and reperfusion (stunning, infarct size and arrhythmias). In agreement to recent investigations, these factors are able to promote the building and opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) leading to myocardial damage.

In search of cardioprotective tools, Murry et al. (1986) observed that the application of brief episodes of ischemia before a prolonged ischemia reduced myocardial alterations caused by ischemia and reperfusion (I-R). This phenomenon was called "ischemic preconditioning" (IP). There are numerous works in normotensive animals but there is little information about the effects of IP and its underlying mechanisms in hypertensive animals and specifically in spontaneously hypertensive rats (SHR). Therefore, the aims of this investigation were: 1.-to determine the infarct size and oxidative stress in SHR and normotensive age-matched Wistar Kyoto (WKY) rats at different ischemia duration time and -2.-to examine the effects of IP on parameters above mentioned and its underlying mechanisms, emphasizing on nitric oxide (NO), mitochondrial ATP-sensitive  $K^+$  channels (mito $K^+_{-ATP}$ ), and mPTP.

Isolated hearts were perfused using the Langendorff technique and after a stabilization period the following experimental protocols were performed: 1) 3 hs of perfusion; 2) 35 min of global ischemia (GI) and 2 hs of reperfusion (R); 3) 50 min of GI and 2 hs of R; 4) 1IP: one cycle of 5 min of GI and 10 min of R before 35 min IG and 5) 3IP: three cycles of 2 min of GI and 5 min of R before 50 min IG.

To investigate the participation of NO and the mito $K^+_{-ATP}$  both IP protocols (1IP and 3IP) were repeated in the presence of the nitric oxide synthase (NOS) blocker L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil ester) or the mito $K^+_{-ATP}$  blocker 5-HD (5-hydroxidecanoate). To evaluate the effects of ROS in our experimental model we used N-2-mercaptopropionil

---

glycine (MPG), scavenger of ROS. The infarct size (IS), lipid peroxidation (estimated through thiobarbituric acid reactive substances assay, TBARS), reduced glutathione content (GSH) and superoxide dismutase enzyme (SOD) activity were assessed. mPTP state (open or close) was evaluated using the measure of cytosolic activity of mitochondrial enzyme SODMn.

After 35 min of GI and 2 hs of reperfusion IS was approximately 30% in WKY and SHR. TBARS concentration increased only in SHR. The GSH content decreased and cytosolic activity of SOD and SODMn increased in both rat strains. At GI 50 min, IS was higher in SHR (60%) than in WKY rats (40%). TBARS increased only in SHR, GSH content diminished, and SODMn activity increased in both rat strains.

When 1 IP protocol was performed before 35 min GI, IS diminished, GSH content increased, the cytosolic activity of SOD and SODMn diminished in both rat strains whereas TBARS concentration decreased only in SHR. When 1 IP (in WKY) or 3 IP (in SHR) was performed previously to GI 50 min, IS diminished, TBARS remained stable, GSH content increased and cytosolic activity of SODMn diminished in both rat strains but cytosolic SOD activity decreased only in SHR.

In SHR, when IP protocols were performed in L-NAME presence, IS values were similar to those obtained in non-preconditioned hearts. TBARS as well as SOD and SODMn activities increased whereas GSH content diminished. In contrast, the NOS blockade did not modify the protective effect of IP on WKY hearts when GI was 35 min, but it was abolished when GI was 50 min.

The blockade of  $\text{mitoK}^+_{\text{-ATP}}$  channels abolished or decreased the protection afforded by IP against both ischemia duration time (35 and 50 min) in hearts from SHR showing a similar or lightly decreased IS as compared to non preconditioned hearts. In addition, TBARS either increased (at 35 min GI) or showed no change (at 50 min GI), GSH content diminished and both cytosolic activity of SODT and SODMn increased. In WKY rats, the same protocol did not produce modification in parameters above mentioned when GI was 35 min but the protective effect of IP was abolished in presence of 5-HD when GI was 50 min.

---

In both rat strains the treatment with MPG diminished IS, increased GSH content whereas TBARS concentration was not modified. The cytosolic activity of SOD and SODMn diminished only in SHR.

The conclusions of this work are summarized as follows:

- 1.-The response of myocardium of adult young SHR compared to normotensive age-matched WKY rats changes according to ischemia duration time. During a prolonged ischemic period, SHR showed lesser tolerance and consequently higher myocardial damage than WKY rats.
- 2.-The modification of antioxidant systems (SOD and GSH) after ischemia and reperfusion in SHR were not enough to prevent the oxidative damage in these rats whose hearts presented a higher increase of lipid peroxidation and oxidative stress in comparison to hearts from WKY rats.
- 3.-In both protocols of I-R and in both rat strains the cytosolic activity of SODMn increased, suggesting mPTP opening .
- 4.-Although IP exerted protective effect against both ischemic periods in both rats strains, it was necessary to apply a major number of preconditioning cycles (in our case 3) in SHR when ischemic period was more prolonged.
- 5.-Oxidative stress in preconditioned hearts was less than in non-preconditioned hearts probably due to the increase of antioxidant defenses afforded by IP in both rat strains.
- 6.-The decrease of cytosolic SODMn activity in preconditioned hearts suggests that IP produced an attenuation of mPTP opening.
- 7.-In SHR, the increase of NO production and mitoK<sup>+</sup>-ATP opening would be the pathway leading to cardioprotection achieved by IP in both ischemic periods. However, in WKY, both mediators would take part in IP only when ischemia was more prolonged (50 min).
- 8.- The MPG treatment protected the hearts against ischemia and reperfusion injury, reducing IS and oxidative stress in both rat strains. The low cytosolic SODMn activity after MPG suggests that this intervention attenuates mPTP opening.

**The ischemic preconditioning (IP) in SHR, similarly to normotensive rats WKY, diminished irreversible alterations produced by ischemia and reperfusion. In hypertrophied hearts the protective effect of IP in both ischemic periods (35 and 50**

---

min) involves the participation of NO and mitoK<sup>+</sup>-ATP channels. The opening of these K<sup>+</sup> channels would be necessary stimulus for decreasing mPTP opening. This event would produce lower ROS release to the cytosol and the consequent decrease of oxidative damage observed in preconditioned hearts compared to non-preconditioned ones. On the other hand, in hearts from normotensive rats (WKY), NO and mitoK<sup>+</sup>-ATP channels turn out to be significantly involved in the beneficial effects of IP only when ischemia period was of 50 min. The fact that cardioprotection achieved by MPG treatment was similar to that observed after IP suggests that ROS are playing an important role in the loss of mitochondrial integrity and the alterations observed in our experimental model of ischemia and reperfusion.

---

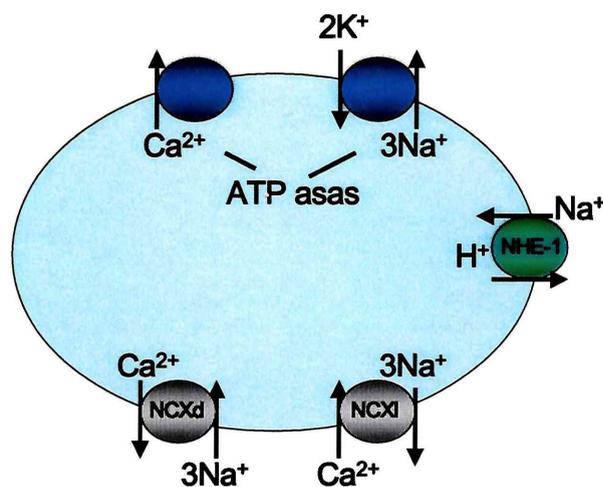
## INTRODUCCIÓN

### ISQUEMIA Y REPERFUSIÓN

La célula miocárdica, como todas las células del organismo, consume  $O_2$  y elimina  $CO_2$  y  $H_2O$  como resultado de su metabolismo aeróbico. Esta tarea conduce a la formación, sobre todo a partir de ácidos grasos y carbohidratos, de fosfatos de alta energía, [ATP (adenosintrifosfato) y CP (creatinafosfato)], que la célula utilizará para el mantenimiento de la asimetría iónica transmembrana y la actividad mecánica. Es así que la concentración intracelular de sodio ( $[Na^+]_i$ ) es mantenida en niveles bajos gracias a la actividad de la bomba  $Na^+/K^+$  ATPasa. Este complejo enzimático, utilizando como fuente de energía la hidrólisis del ATP, promueve la salida de  $Na^+$  desde el interior de la célula al espacio extracelular y al mismo tiempo permite el ingreso de  $K^+$  al compartimiento intracelular. La relación de intercambio entre  $Na^+$  y  $K^+$  es 3 a 2, es decir que se genera el movimiento neto de una carga positiva hacia afuera, contribuyendo al mantenimiento del potencial de membrana en reposo de la célula miocárdica. Por otra parte, la concentración intracelular de calcio ( $[Ca^{2+}]_i$ ) es mantenida en valores aproximadamente diez mil veces menores que los encontrados en el espacio extracelular gracias al funcionamiento de la bomba  $Ca^{2+}$ -ATPasa del sarcolema y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$  (NCX) (Ytrehus y col, 1994; Murphy y col, 1999). La  $Ca^{2+}$ -ATPasa es capaz de transferir la energía del ATP a un intermediario fosforilado de alta energía, que la utiliza para transportar un ión  $Ca^{2+}$ , en contra de su gradiente de potencial electroquímico, por cada molécula de ATP hidrolizada (Carafoli y Stauffer, 1994). La familia del NCX incluye transportadores de membrana distribuidos en varios tejidos y células, y constituyen uno de los principales mecanismos de extrusión de  $Ca^{2+}$  de la célula. El subtipo1 del NCX es el que predomina en el tejido cardíaco (Nicoll y col, 1990; Aceto y col, 1992). El NCX tiene la particularidad de ser electrogénico (su funcionamiento genera una diferencia de carga a través de la membrana), dado que transporta un  $Ca^{2+}$  por cada tres  $Na^+$ . Para ello utiliza el gradiente de potencial electroquímico de  $Na^+$  que genera y mantiene la bomba  $Na^+/K^+$ -ATPasa. Este intercambiador tiene dos modos de funcionamiento, uno directo que promueve la salida de  $Ca^{2+}$  de la célula durante la relajación miocárdica, y un modo inverso a través del cual facilita la entrada de  $Ca^{2+}$  al interior celular. Este modo del NCX opera en condiciones de

alta concentración de  $\text{Na}^+$  intracelular y potencial de membrana elevados (Nuss y Houser, 1992) (Fig 1).

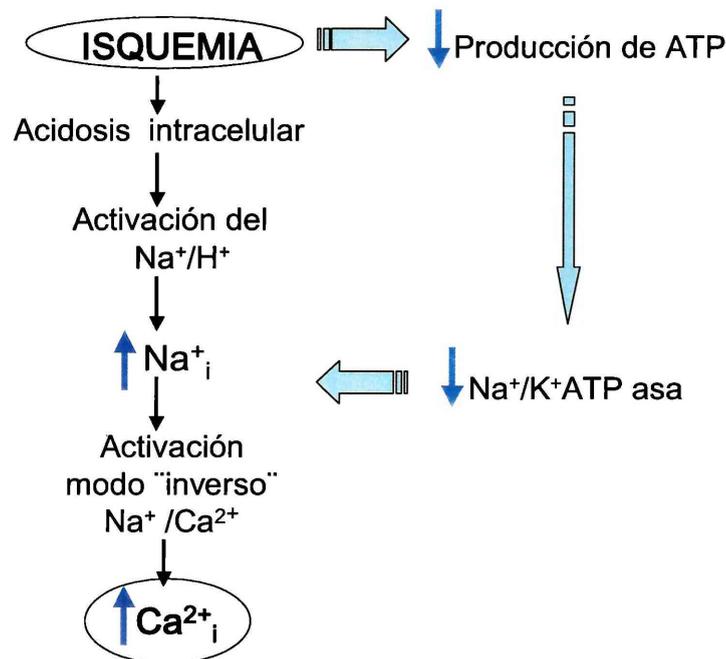
En condiciones normales, el ATP y la CP son producidos por el metabolismo aeróbico a través de la fosforilación oxidativa que tiene lugar en la mitocondria. Cuando el flujo coronario se reduce (isquemia), el  $\text{O}_2$  aportado es inadecuado para soportar la fosforilación oxidativa y el ATP sólo es proporcionado por el metabolismo anaeróbico. En estas condiciones se utilizan principalmente el glucógeno como sustrato y se generan protones ( $\text{H}^+$ ) y lactato, que llevan a la acidosis intracelular, la que activa mecanismos alcalinizantes de los cuales el más importante es el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ , siendo la isoforma 1 la selectiva del músculo cardíaco (NHE-1) (Fig 1).



**Figura 1.** Esquema de una célula miocárdica donde se muestran las bombas  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  y  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas, el intercambiador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  isoforma 1 (NHE-1) y los modos directo e inverso del intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (NCXd y NCXi, respectivamente).

El NHE-1 mueve  $\text{H}^+$  hacia el espacio extracelular e ingresa  $\text{Na}^+$  al interior de la célula promoviendo el aumento de la  $[\text{Na}^+]_i$ , al cual contribuye la disminución de la actividad de la bomba  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasa por la falta de ATP (Anderson y col, 1990; Nawada y col, 1997; Van Emous y col, 1998). El aumento del  $[\text{Na}^+]_i$  conduce a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  por dos mecanismos, una disminución de la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  por el NCX operando en el modo directo y un aumento de la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la célula a través del mismo intercambiador trabajando en forma inversa. De esta manera, en la isquemia se genera un aumento de los

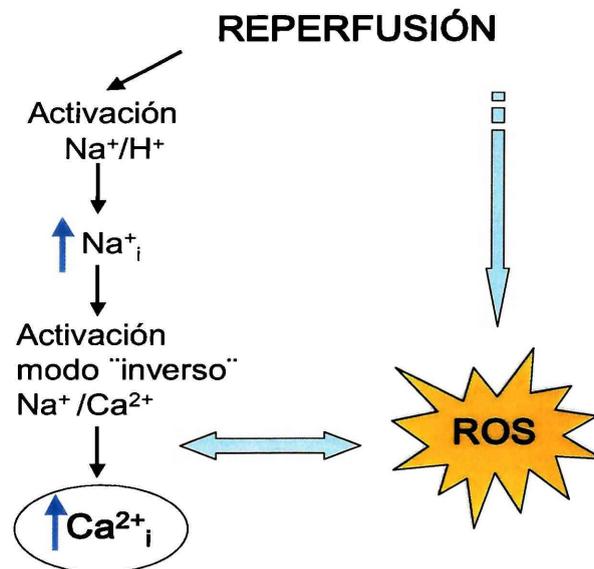
niveles citosólicos de  $\text{Na}^+$  y de  $\text{Ca}^{2+}$  (Heyndrickx y col, 1975; Murphy y col, 1999; Tani y col; 1989), (Fig 2).



**Figura 2.** Cascada de eventos que ocurren durante la isquemia

El proceso de reperfusión (restablecimiento del flujo coronario) está asociado con cambios bioquímicos y funcionales del miocardio que pueden determinar la supervivencia ó la muerte celular. Aunque la restauración del flujo sanguíneo es un prerrequisito para salvar a la célula miocárdica, la reperfusión en sí misma puede acelerar o adicionar injuria a la ya generada por la isquemia.

Durante esta etapa la normalización del pH extracelular (7.4) y el mantenimiento de la acidosis intracelular, conducen a la activación del NHE-1 y, secundariamente, a la activación del NCX, llevando a la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ . Con la introducción de  $\text{O}_2$  a la célula miocárdica también ocurre en los primeros minutos de la reperfusión la producción abrupta de las especies reactivas del  $\text{O}_2$  (ROS) (Garlick y col, 1987; Zweier y col, 1987; Ambrosio y col, 1991) (Fig 3).



**Figura 3.** Acontecimientos que tienen lugar durante la reperfusión

### **Alteraciones por isquemia-reperfusión**

Las alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión son el *atontamiento miocárdico*, *las arritmias* y *el infarto miocárdico*. La aparición del atontamiento ó del infarto depende de la duración de la isquemia. Períodos de isquemia de aproximadamente de 15 min desencadenan una alteración reversible (atontamiento) y cuando se extiende más allá de 20 minutos ocurre la alteración irreversible o infarto.

#### Atontamiento

El atontamiento miocárdico, término acuñado por Braunwald y Kloner en 1982, es la disminución transitoria de la contractilidad que se observa en la reperfusión después de cortos períodos de isquemia y en ausencia de daño irreversible. Lo más importante del atontamiento es su reversibilidad con un tiempo de recuperación que puede ir de varias horas a días. Esta alteración contráctil es el resultado de dos componentes: uno que ocurre en la reperfusión y otro que tiene lugar durante la isquemia. No se conocen las proporciones relativas de cada uno de ellos y es probable que varíen en los distintos modelos experimentales.

Las dos hipótesis que permiten explicar las alteraciones del atontamiento miocárdico son la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> y la producción de ROS (Bolli, 1990; Kloner y col,1998; Gao y col,

---

1997; Van Eyk y col, 1998). La injuria producida por el  $\text{Ca}^{2+}$  es en parte mediada por la proteólisis que ocurre como resultado de la activación de proteasas (calpaínas) dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Especialmente la calpaína I ataca a la troponina I (TnI) clivándola y provocando una respuesta disminuída de los miofilamentos al  $\text{Ca}^{2+}$  (Gao y col, 1997).

### Infarto miocárdico

Si la isquemia se extiende más allá de 20 a 30 min las alteraciones ultraestructurales del miocardio pasan de un estado reversible (atontamiento) a un estado irreversible que es caracterizado como muerte celular. Es así, que el desarrollo de una sostenida oclusión coronaria es usualmente diagnosticada como infarto agudo de miocardio (IAM) y puede resultar en muerte temprana por paro cardíaco debido a arritmias o a una pérdida suficiente de la contractilidad del ventrículo izquierdo. La restauración del flujo coronario a través de la arteria ocluída es el principal tratamiento del IAM y la aplicación de la reperfusión temprana para restaurar el aporte sanguíneo a la zona de riesgo isquémica es central para limitar la extensión de la injuria irreversible. Sin embargo, es reconocido que la reperfusión puede estar asociada con posterior injuria (Yellon y Baxter, 2000; Downey y Cohen, 2006). Por lo tanto, es apropiado hablar del IAM como una patología por isquemia-reperfusión.

La necrosis y apoptosis son los dos procesos que contribuyen a la muerte celular. Aún cuando existen controversias, la mayor parte de las evidencias disponibles sugieren que en el infarto miocárdico el número de células apoptóticas es muy bajo comparado con el de células necróticas. Estos mecanismos serían puestos en marcha cuando se produce la formación y apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria (Crompton M, 1999; Di Lisa y col, 2001; Halestrap y col, 2004) en el cual las ROS y el  $\text{Ca}^{2+}$  participan activamente.

## **ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO (ROS)**

Dentro de las ROS se encuentran las especies radicales como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el anión hidroxilo ( $\text{OH}^-$ ) y el óxido nítrico ( $\text{NO}^\cdot$ ), y las especies no radicales como el

---

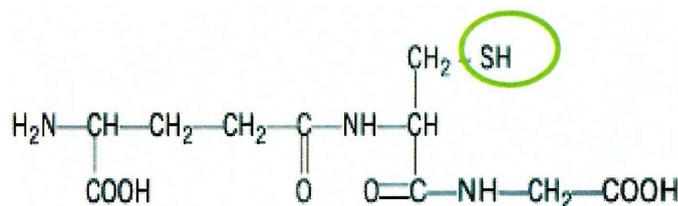
peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), oxígeno singulete ( $^1\text{O}_2$ ) y el peroxinitrito ( $\text{ONOO}^-$ ). Las especies radicales son átomos o grupos de átomos que tienen un electrón desapareado con capacidad de aparearse. Necesitan para aparear su electrón no apareado el de una molécula estable que se lo ceda, la cual se convierte a su vez en un radical libre por quedar con un electrón desapareado, iniciándose así una reacción en cadena.

La principal fuente de producción de las ROS es la cadena respiratoria de la mitocondria. Otras fuentes se muestran a continuación:

## Fuentes de ROS

Cadena de transporte de electrones de la mitocondria  
NADPH oxidasa  
Xantino oxidasa  
Células fagocíticas, endoteliales y leucocitos  
Citocromo P450  
Peroxisomas

El nivel celular de las ROS depende del balance entre la producción y la remoción de las mismas. En condiciones fisiológicas, los efectos perjudiciales de las ROS son contrarrestados por los sistemas antioxidantes. Estos sistemas son todas aquellas sustancias que hallándose presentes en bajas concentraciones respecto a las de un sustrato oxidable (biomoléculas), retardan o previenen la oxidación de dicho sustrato. Dentro de estos sistemas están los enzimáticos y los no enzimáticos. Dentro de los primeros están las enzimas catalasa, superóxido dismutasa (SOD) y glutatión peroxidasa (GPx). Esta última enzima utiliza como cofactor el glutatión que forma parte de uno de los más importantes sistemas antioxidantes. El glutatión reducido (GSH) es un tripéptido formado por glutamato-glicina-cisteína (Fig 4)



**Figura 4.** Estructura química del glutatión reducido. Se indica el grupo sulfidrilo (-SH) que interviene en las reacciones de oxido-reducción.

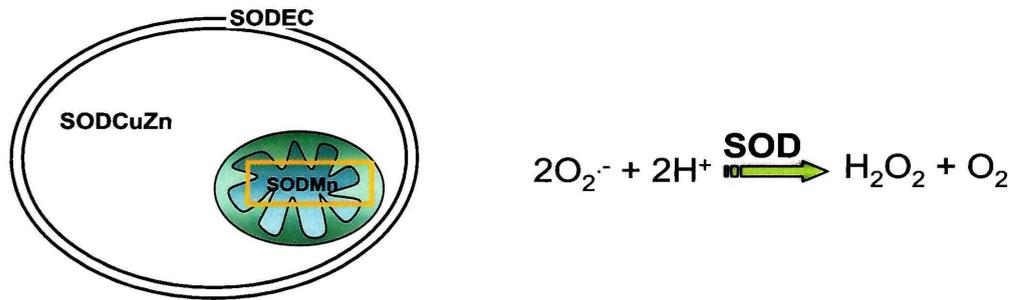
El GSH no solamente actúa como "scavenger" ó atrapante de las ROS, sino que regula el estado redox intracelular. El sistema del glutatión consiste en el GSH, la GPx y la glutatión reductasa (GRed). La GPx cataliza la reducción del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otros peróxidos convirtiendo el GSH a su forma oxidada (GSSG) (Fig 5).



**Figura 5.** Esquema general de las reacciones químicas catalizadas por la glutatión peroxidasa

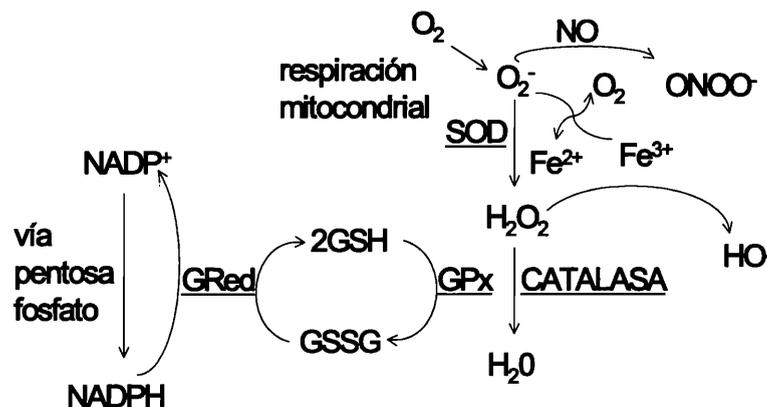
El GSSG es posteriormente reducido de nuevo a GSH por la GRed. En condiciones normales, más del 95% del glutatión celular está en forma reducida, así que el ambiente intracelular es primordialmente reductor. La fuerza reductora del GSH es una medida de su poder de captación de ROS.

La enzima SOD representa otro de los grandes sistemas antioxidantes del organismo. Como se esquematiza en la Fig 6, se distinguen la SOD dependiente de Mn<sup>2+</sup>, que se localiza dentro de la mitocondria, la SOD dependiente de Cu<sup>2+</sup>-Zn<sup>2+</sup> que se encuentra en el citosol y la SOD extracelular (EC) que se localiza fuera de la célula (van Deel y col, 2008; Kinnula y Crapo, 2004). Todas las SOD catalizan la reacción de conversión del anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) en la molécula peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).



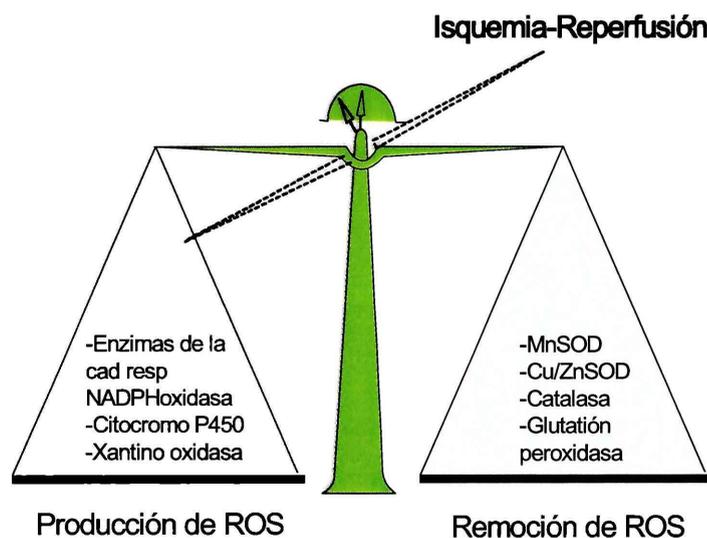
**Figura 6.** Esquema de la localización de las distintas isoformas de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y reacción química catalizada por ellas.

Dentro de los sistemas antioxidantes no enzimáticos se encuentran la albúmina, metalotioneína y ceruloplasmina, ferritina, ácido úrico, bilirrubina, vitaminas E y C, etc. En la Fig 7 se esquematiza una síntesis de las vías de regulación de los sistemas antioxidantes frente a la formación de ROS. Como puede observarse el radical  $\text{O}_2^{\cdot-}$  (generado por las fuentes anteriormente mencionadas) mediante la captación de electrones y la participación de la enzima SOD y de los iones  $\text{Fe}^{3+}$  (reacciones de Fenton y de Haber Weiss) se convierte en las especies  $\text{H}_2\text{O}_2$  y  $\text{OH}^{\cdot}$ . Además de las enzimas SOD, GPx y catalasa que actúan directamente sobre las ROS existen otros “soportes” antioxidantes que incluyen GRed y enzimas involucradas en la vía de las pentosas fosfato que mantienen los niveles celulares de GSH y NADPH, cofactores necesarios para SOD y GPx:



**Figura 7.** Esquema de las vías de regulación de los sistemas antioxidantes.

Las ROS pueden tener efectos beneficiosos para la supervivencia celular cuando su producción no excede la capacidad antioxidante del tejido. Estas propiedades beneficiosas están esencialmente relacionadas con su capacidad para actuar como segundos mensajeros en el interior celular (Herrlich y Bohmer, 2000; Allen y Tresini, 2000; Sastre y col, 2000). Una importante prueba que sugiere un papel de las ROS como segundos mensajeros, es su capacidad para activar a NF- $\kappa$ B, que es un factor de transcripción que regula la expresión inducible de varios genes involucrados en la supervivencia celular (Karin y Lin, 2002, Haendeler y col, 2004; Vaquero y col, 2004; Das y Maulik, 2004). Sin embargo, cuando la producción de las ROS es excesiva y/o disminuye la actividad o concentración de los sistemas antioxidantes, se produce un desequilibrio llamado "estrés oxidativo", representado en el esquema de la Fig 8. Este desequilibrio ocurre en situaciones como la isquemia-reperfusión.

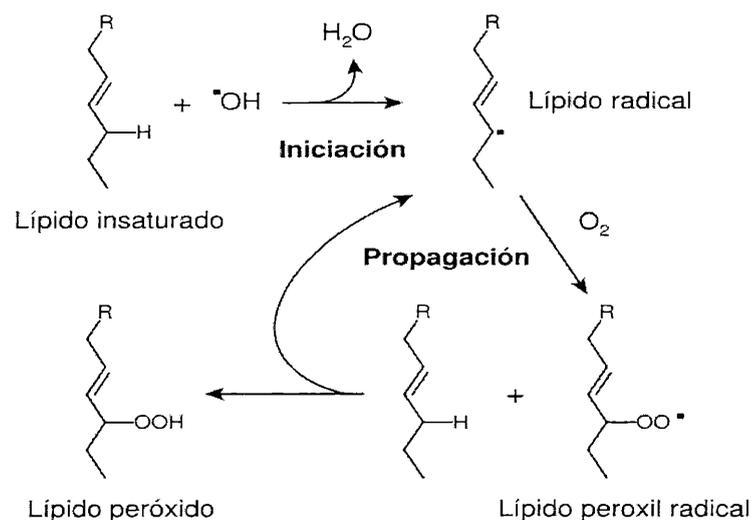


**Figura 8.** Esquema representativo del balance entre la producción y remoción de las ROS y el desequilibrio producido por la isquemia-reperfusión.

Numerosos estudios (Arroyo y col, 1987; Bolli y col, 1988; Garlick y col, 1987; Zweier, 1988; Zweier y col, 1987; Ambrosio y col, 1991) han demostrado que las ROS se generan principalmente durante los primeros minutos de la reperusión. Es así que intervenciones que disminuyen la producción de dichas especies ó aumentan los sistemas antioxidantes atenúan las alteraciones producidas por la isquemia-reperfusión (Kilgore y col,1994; Kevin

y col, 2003; Padma y col, 2006). También existen evidencias experimentales que muestran que un déficit del gen de la SODMn (Asimakis y col, 2002) provoca un aumento de la injuria miocárdica y la sobreexpresión del mismo produce una atenuación del daño miocárdico. Aunque los mecanismos responsables de las ROS como agente causal del daño por isquemia-reperfusión no se conocen claramente, estudios recientes focalizan la atención en la mitocondria y específicamente en la formación del poro de transición permeabilidad mitocondrial (mPTP) (Halestrap y col, 2004).

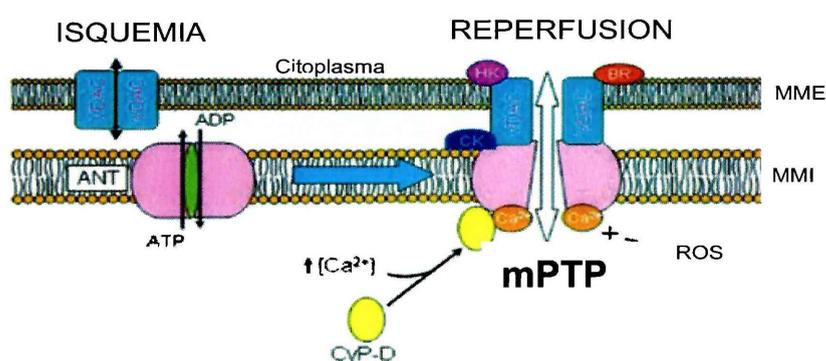
Las ROS producen el ataque de las proteínas (Venardos y col, 2007), el ADN (Klaunig y Kamendulis, 2004) y los lípidos (Andreadou y col, 2009), causando en estos últimos la peroxidación. Este proceso implica una reacción directa de las ROS con los lípidos de la membrana celular para formar radicales libres intermedios y peróxidos semi-estables (Fig 9). A ello le sigue una cadena de reacciones autocatalíticas que lesionan la membrana y producen aldehídos terminales, entre otros el malondialdehído. Este aldehído hace de mediador en una serie de reacciones de enlace cruzado y puede además servir como índice de la magnitud de la peroxidación lipídica.



**Figura 9.** Esquema de reacción general de peroxidación lipídica

## PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (MPTP)

La mitocondria es una organela cuya función principal es la oxidación de sustratos con producción de ATP, mediante la fosforilación oxidativa a través de una cadena transportadora de electrones con consumo de  $O_2$ . Es a su vez depósito de  $Ca^{2+}$  y de otras sustancias. Frente al estrés producido por la isquemia y reperfusión, la mitocondria responde con la formación del mPTP, un poro no específico multimérico que se encuentra en la membrana de la organela, estableciendo puntos de contacto entre la membrana interna y externa. El modelo hipotético clásico (Zamzami y Kroemer, 2001) para la formación del mPTP (ver Fig 10) incluye la adenina nucleótido translocasa (ANT) que se encuentra en la membrana mitocondrial interna, y el canal aniónico dependiente de voltaje (VDAC) en la membrana mitocondrial externa. Otras proteínas que se han considerado parte de este complejo son la hexoquinasa (HKII) (citoplásica), la ciclofilina D (CyP-D) (matricial), la creatina quinasa (mtCK) (espacio intermembrana) y el receptor periférico de benzodiazepinas (PBR) (membrana mitocondrial externa). No obstante, los verdaderos constituyentes del poro continúan siendo debatidos dado que recientemente se ha descrito la formación del poro, en mitocondrias procedentes de ratones *knock-out* para ANT (Kokoszka y col, 2004).



**Figura 10.** Formación del mPTP durante la reperfusión. CypD: complejo ciclofilina D; CK: creatina quinasa; VDAC: canal aniónico dependiente de voltaje; ANT: adenina nucleótido translocasa; HK: hexoquinasa; BR:receptor perisférico de benzodiazepinas; MME: membrana mitocondrial externa y MMI: membrana mitocondrial interna.

---

La formación del mPTP permite el paso de agua y solutos de peso molecular menor a 1.5 kDa. Es un canal que funciona con alta conductancia, es dependiente de voltaje y no selectivo. Bajo condiciones fisiológicas normales, la membrana mitocondrial interna es impermeable a la mayoría de los solutos y el mPTP no se forma. En condiciones de estrés, como en la isquemia-reperfusión, la formación del poro en la membrana interna resulta en la pérdida de la impermeabilidad y rápido colapso del potencial de la membrana mitocondrial. Está descrito que la formación del mPTP ocurre durante la reperfusión y de acuerdo con el tiempo de apertura del mismo se puede desencadenar la apoptosis, la necrosis ó ambas (Crompton y col, 1988; Duchon y col, 1993; Lemasters y col, 1997; Halestrap y col, 1998; Di Lisa y col, 2001). Entonces, la formación o la inhibición del mPTP durante la reperfusión determina la muerte o la sobrevivencia celular (Halestrap y col, 2004). En el año 1998, Halestrap y col propusieron que la formación del mPTP se produce como resultado de la unión de la CyP-D mitocondrial a la ANT en la membrana mitocondrial interna. Esta unión se ve favorecida por la modificación del grupo tiol de la ANT ó de otros grupos tioles causada por las ROS, cuya producción puede ser aumentada por el aumento del  $Ca^{2+}$  intramitocondrial (Kanno y col, 2004). Es decir, la sobrecarga de  $Ca^{2+}$  y las ROS mitocondriales son los principales inductores de la formación del mPTP.

## **MECANISMOS CARDIOPROTECTORES**

La filosofía de la reperfusión temprana reside en el reconocimiento de que la extensión de la injuria irreversible (tamaño de infarto) es el primer determinante de la extensión del remodelamiento post-infarto y de la propensión al desarrollo de la insuficiencia cardíaca crónica y muerte (Simoons y col, 1997). Es decir, pacientes que sobreviven a un episodio isquémico agudo pero mantienen un considerable infarto transmural son de alto riesgo para la consecuente morbilidad asociada a la insuficiencia cardíaca. Esto determina que cualquier intervención que pueda maximizar la efectividad de la reperfusión o atenuar el avance de la injuria irreversible durante la isquemia ó reperfusión, tenga un significativo potencial terapéutico. Por ello los investigadores enfocan la atención en identificar los blancos tratables farmacológicamente para disminuir el tamaño del infarto durante la

---

isquemia-reperfusión. Así, el término cardioprotección se refiere específicamente a intervenciones capaces de disminuir el tamaño del infarto u otras alteraciones derivadas de la isquemia-reperfusión, como las arritmias y el empeoramiento de la función contráctil. La aplicación de estrategias experimentales más sofisticadas ha permitido conocer las cascadas complejas de transducción de señales involucradas en la regulación de la muerte y supervivencia del cardiomiocito durante la isquemia-reperfusión.

## PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO

Numerosos trabajos señalan como un mecanismo cardioprotector al fenómeno llamado “preacondicionamiento isquémico” (PI) descrito por Murry y col en el año 1986 (ver Fig 11). Esta intervención se basa en que breves episodios de isquemia aplicadas previamente a la isquemia de mayor duración, disminuye las alteraciones ocasionados por la isquemia-reperfusión (Yellon y col, 1998; Yellon y Downey, 2003; Heusch, 2004)



I : Isquemia; R : perfusión

**Figura 11.** Esquema de un protocolo de preacondicionamiento isquémico.

La gran reproducibilidad de este fenómeno utilizando una amplia variedad de protocolos experimentales, rápidamente dejaron al PI como un mecanismo muy importante para la cardioprotección. Existen numerosas evidencias que este fenómeno también ocurre en el corazón humano. En el año 1994, Ikonomidis y col demostraron que la aplicación de cortos episodios de isquemia previos a una isquemia de 90 min de duración mejoraba la supervivencia de miocitos cardíacos humanos cultivados. También se comprobó que repetidas oclusiones coronarias en el curso de una angioplastia pueden preacondicionar al corazón, de tal manera que en la última inflada del balón se observó disminución del dolor de

---

pecho, de la elevación del segmento ST y de la producción de lactato comparadas con la primera (Laskey, 2005). Otros estudios clínicos muestran que la angina preinfarto protege al miocardio, exhibiendo los pacientes disminución de la incidencia de arritmias (Kloner y Yellon, 1994). El hecho de que algunos pacientes con enfermedad coronaria puedan desarrollar menos dolor en el segundo test de ejercicio que en el primero cuando esos test están separados por un corto período de reposo, puede ser considerado como otro ejemplo de PI en humanos (Kloner y Yellon, 1994).

Aunque los mecanismos del PI no están totalmente aclarados, en la actualidad se conoce que existen múltiples vías de señalización que regulan el crítico balance entre la muerte y la sobrevivencia celular durante la isquemia-reperusión. Trabajos recientes proponen una teoría del PI que comienza con la fase llamada "trigger" que ocurre en los ciclos precondicionantes de isquemia-reperusión y que consiste en la aparición de ligandos cardioprotectores. Uno de los primeros ligandos propuestos fue la adenosina (Liu y col, 1991). Investigaciones posteriores mencionan a la bradiquinina, acetilcolina, opioides y fenilefrina como posibles mediadores (Cohen y col, 2001). La interacción de dichos ligandos con receptores de membrana lleva a la activación de distintas quinasas como la proteína quinasa C (PKC) (Liu y col, 1994), la proteína quinasa mitogénica p38 (p38MAPK) (Mocanu y col, 2000), el complejo fosfatidilinositol-3-quinasa/Akt (PI3K/Akt) (Mocanu y Yellon, 2007), la glucógeno sintetasa quinasa-3  $\beta$  (Tong y col, 2002) y la interacción entre ellas en las distintas cascadas de señalización (Hausenloy y col, 2004a). También el óxido nítrico (NO) directa ó indirectamente a través de la activación de la guanilato ciclasa (GC) ha sido considerado como un factor importante en la cardioprotección dada por el PI (Rakhit y col, 1999; Bolli, 2001).

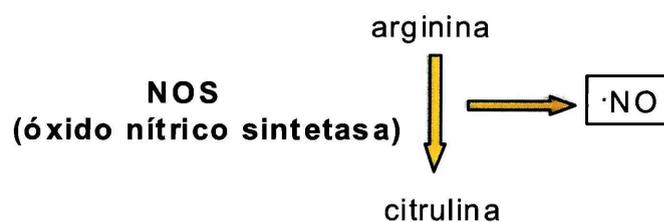
## **OXIDO NÍTRICO (NO)**

El NO (óxido de nitrógeno (II)) es una molécula que tiene dos propiedades importantes que en parte explican su dualidad: no está cargada y tiene un electrón desapareado ( $\cdot\text{N}=\text{O}$ ). Por tal motivo el NO difunde libremente a través de las membranas y el electrón desapareado la convierte en una especie reactiva.

---

El NO reacciona fácilmente con el radical  $O_2^{\cdot-}$  (ver Fig 7), proceso que puede ser beneficioso porque hace desaparecer un radical potencialmente injurioso, pero también puede ser peligroso porque de la reacción resulta la formación de peroxinitrito (ONOO-), el cual es citotóxico (Ferdinandy y col, 2003). La manifestación de uno u otro de dichos efectos en situaciones específicas parece depender de la forma en la cual el NO es liberado ó transportado (Stamler y col, 1992).

El NO se genera a partir de la transformación del aminoácido L-arginina en L-citrulina (Fig 12), proceso catalizado por la enzima óxido nítrico sintetasa (NOS).



**Figura 12.** Formación del óxido de N (II)

Esta enzima presenta tres isoformas conocidas: (a) tipo I o neuronal (nNOS) y tipo III o endotelial (eNOS), que se expresan en forma constitutiva en las células y coexisten en los miocitos cardíacos liberando pequeñas cantidades de NO por cortos períodos de tiempo (Depre y col, 1997), y (b) la isoforma inducible o tipo II (iNOS) que se encuentra distribuída en células inmunes (Steiner y col, 2000). Se ha identificado además una variante de la nNOS en la mitocondria llamada NOS mitocondrial (mtNOS) (Giulivi y col, 1998), responsable del 50% del NO citosólico en el miocardio de la rata y cuya actividad aumenta durante la hipoxia (Elfering y col, 2002; Zaobornyj y col, 2005) y la isquemia (Depre y col, 1997). El propio NO, a través de la vía guanilato ciclasa soluble (GCs)-GMPc, regula la expresión de la mtNOS y la biogénesis mitocondrial, efectos que se asocian con un aumento de la fosforilación oxidativa y del contenido celular de ATP (Nisoli y col, 2004).

El NO juega un rol importante en las alteraciones cardiovasculares que siguen a la isquemia-reperfusión. Su participación en estos procesos ha sido estudiada mediante la

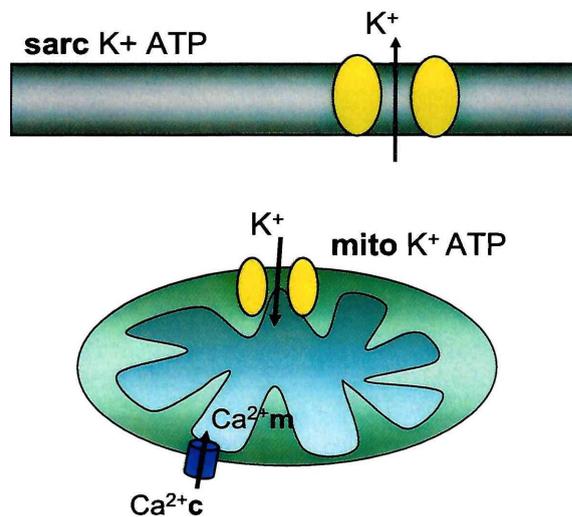
---

administración de sustancias dadoras de NO, las cuales administradas antes de la isquemia disminuyen el tamaño del infarto y la recuperación de la función miocárdica (Yan y col, 2001), mimetizando el clásico preacondicionamiento isquémico. La isquemia-reperusión provoca activación de la NOS (Bolli, 2001; Gewaltig y Kojda, 2001) y el aumento del NO producido desencadena, a nivel de la función miocárdica, efectos contradictorios. Trabajos recientes muestran que el NO ejerce una acción cardioprotectora (Bolli, 2001; Jones y Bolli, 2006; Ferdinandy y col, 2003; Jugdutt, 2002), mientras que otros señalan que contribuye a un aumento del daño miocárdico. Es así, que la inhibición de la NOS muestra un efecto protector contra la isquemia-reperusión, lo cual sugiere efectos nocivos del NO (Kobara y col, 2003).

La acción beneficiosa del NO estaría dada por un efecto antioxidante (Massoudy y col, 1995) y por promover la apertura de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP (Ljubkovic y col, 2007). Recientemente se ha demostrado que el NO disminuye la muerte celular bloqueando el mPTP a través de la vía de señalización GCs-GMPc-proteína quinasa G (PKG) (Kim y col, 2004). El efecto perjudicial del NO sería debido a la formación de  $ONOO^-$ , anión que produce nitración de proteínas llevando a la inactivación de importantes enzimas, tales como la SOD (Kojda y Harrison, 1999; O'Donnell y Freeman, 2001).

### **CANALES DE $K^+$ DEPENDIENTES DE ATP ( $K^+_{-ATP}$ )**

Los canales de  $K^+$  son una familia de proteínas de membrana que juegan un rol crítico en una gran variedad de procesos fisiológicos, incluidos la regulación de la frecuencia cardíaca, contracción muscular (Baines y col, 1999), la liberación de neurotransmisores y regulación del volumen celular (Ferdinandy y col, 2007). Los miocitos cardíacos contienen dos tipos de canales de  $K^+$  (Fig 13), los que se encuentran en la membrana celular o sarcolema ( $sarK_{-ATP}$ ) y los que están en la membrana mitocondrial interna ( $mitoK^+_{-ATP}$ ) (Noma A, 1983; Garlid y col, 1997).



**Figura 13.** Esquema de la localización de los canales  $K^+_{-ATP}$  en la célula miocárdica.

Los  $sarcK^+_{-ATP}$  están formados por el poro y las subunidades receptoras (Nishida y col, 2009) y durante la hipoxia o la isquemia estos canales se abren facilitando el aumento del influjo de  $K^+$ .

A nivel mitocondrial, el flujo de  $K^+$  a través de su membrana interna modifica el potencial de membrana, regulando el volumen de la mitocondria, la producción de energía y la homeostasis del  $Ca^{2+}$ . Para permitir el ciclado de  $K^+$  a través de la membrana mitocondrial interna, la mitocondria expresa el antiporter ( $H^+/K^+$ ), el canal de  $K^+$  activado por  $Ca^{2+}$  y el  $mitoK^+_{-ATP}$ .

Estudios recientes (Garlid y col, 1997) demostraron que la tolerancia del miocardio frente a la injuria por isquemia y reperfusión está aumentada por la activación de los  $mitoK^+_{-ATP}$ . Asimismo, Grover y Garlid en el año 2000, propusieron a los canales  $mitoK^+_{-ATP}$  como blanco molecular de la cardioprotección ejercida por el diazóxido, abridor del canal. Es así como gran cantidad de estudios comenzaron a focalizar su atención en la apertura de dichos canales como mecanismo central del PI (Ardehali y O'Rourke, 2005; Takano y col, 2000; Noma ,1983) demostrando la importancia del flujo de  $K^+$  mitocondrial para la cardioprotección.

---

Se ha propuesto que la apertura de los canales mitoK<sup>+</sup>-ATP puede causar una despolarización de la mitocondria durante la reperfusión suficiente como para reducir la producción de las ROS, la acumulación de Ca<sup>2+</sup> y de esta manera evitar la apertura del mPTP (Hanley y Daut, 2005; Ylitalo y col, 2000; Wang y col, 2001; Grover y Garlid, 2000; Oldenburg y col, 2003; Liu, y col, 1998; Costa y col, 2006).

## **HIPERTROFIA CARDÍACA**

El concepto de hipertrofia cardíaca (HC) se basó tradicionalmente en el aumento de peso del corazón determinado principalmente por el mayor tamaño de los miocitos. Las células musculares cardíacas si bien representan sólo aproximadamente el 30% del número total de las células del miocardio, dado su gran tamaño constituyen aproximadamente el 76% del volumen del órgano y por ello su crecimiento impacta significativamente sobre el peso final del corazón. Sin embargo, recientemente Merkle y col (2007) trabajando con un modelo de ratón que sobreexpresa la proteína caspasa I (cisteína-proteasa involucrada en los mecanismos de apoptosis), señalaron que se evidenció HC y fibrosis en el miocardio sin aumento del peso del corazón. Si se tiene en cuenta que el determinante de la respuesta hipertrófica puede generar simultáneamente apoptosis con disminución del número total de miocitos con su repercusión en el peso final del corazón, esta nueva evidencia sugiere la posibilidad de reubicar la definición de HC a nivel del tamaño del miocito, no necesariamente acompañada por aumento de peso del órgano.

### Tipos de Hipertrofia Cardíaca

La HC podría interpretarse “a priori” como una respuesta adaptativa del miocardio frente a la situación que la origina. Al aumentar el espesor de la pared ventricular como consecuencia de la HC, se favorecería la normalización del estrés al que está sometido el ventrículo ante una sobrecarga hemodinámica, de acuerdo a lo enunciado por la Ley de Laplace (Tensión = Presión x Radio/2 Espesor). En determinadas situaciones como durante el crecimiento, el embarazo o la práctica de actividad física intensa, la respuesta a la sobrecarga hemodinámica se caracteriza por aumento del tamaño de los miocitos con

---

incremento proporcional de los elementos estructurales del miocardio y con función contráctil conservada o incluso aumentada. Este tipo de respuesta se denomina HC fisiológica y cumple realmente una función de adaptación. Por el contrario, puede suceder que la HC se acompañe de aumento de la fibrosis intersticial, mayor incidencia de apoptosis, disminución de la densidad capilar y reprogramación de la expresión génica con inducción de genes fetales y represión de los genes que codifican las respectivas isoformas del adulto (Sadoshima e Izumo, 1997; McKinsey TA y Olson, 1999; Chien, 1999; van Empel VP y De Windt, 2004). Estas alteraciones en la estructura del miocardio se asocian con deterioro de la función ventricular evolucionando habitualmente hacia la insuficiencia cardíaca, razón por la cual a este tipo de HC se la define como HC patológica (MacLellan y Schneider, 1999).

Son numerosas las evidencias que sustentan que la HC patológica no es necesaria para la compensación funcional frente a una situación de sobrecarga hemodinámica, a pesar de prevenir o atenuar el aumento del estrés parietal. La inhibición de su desarrollo en distintas situaciones de sobrecarga hemodinámica experimental no produce deterioro en la función cardíaca (Akhter y col, 1998; Esposito y col, 2002; Wettschureck y col, 2001). Del mismo modo, la inducción de su regresión conlleva a una reducción del riesgo cardiovascular independientemente del tratamiento por el que se logre (Mathew y col, 2001; Verdecchia y col, 1998).

En el año 1963 Okamoto cruzó ratas Wistar Kyoto (WKY) que desarrollaban presión elevada. Los animales obtenidos de esta cruce comenzaron a desarrollar hipertensión entre la quinta y sexta semana de edad, alcanzando presiones sistólicas de entre 180 y 200 mmHg en la fase adulta. Además, comenzando las semanas 40 y 50 de vida esta cepa desarrolló características de la enfermedad cardiovascular, como ser hipertrofia cardíaca y vascular (Conrad y col, 1995). A partir de entonces este modelo de hipertensión, que presenta características similares al tipo de hipertensión esencial descrita en humanos, ha sido el más utilizado para el estudio de la enfermedad cardiovascular (Pinto y col, 1998).

---

### Isquemia-reperfusión en corazones hipertróficos

La respuesta hipertrófica o remodelamiento hipertrófico, es el resultado de la estimulación de múltiples vías de señalización intracelular que alteran la transcripción génica (Frey y Olson, 2004; Frey y col, 2004) promoviendo modificaciones a nivel celular y molecular que se manifiestan mediante una serie de cambios morfológicos y funcionales. Se sabe que la respuesta hipertrófica lleva a la alteración de genes que codifican proteínas involucradas en la homeostasis del  $\text{Ca}^{2+}$  y del  $\text{Na}^+$  y en el aumento de los niveles de los péptidos natriuréticos (Feldman y col, 1993; Johnatty y col, 2000; Lorell y Carabello, 2000).

Para estudiar bajo condiciones experimentales la tolerancia de los corazones hipertróficos frente a la injuria por isquemia y reperfusión, se han utilizado diferentes modelos como ser ratas Dahl sensibles a la sal (Saupe y col, 2000), constricción aórtica (Peyton y col, 1982; Gaasch y col, 1990; Snoeckx y col, 1990; Friehs y del Nido 2003) e hipertensión espontánea entre otros (Belichard y col, 1988; Snoeckx y col, 1986; Snoeckx y col, 1989). Los animales hipertróficos presentan distinto comportamiento frente a la isquemia-reperfusión dependiendo del diseño experimental usado y especialmente de la edad de los animales utilizados. Los animales seniles muestran una aumentada susceptibilidad al daño por isquemia y/o reperfusión (Allard y col, 1994; Snoeckx y col, 1993; Wexler y col, 1988). Sin embargo, cuando se usan animales adultos jóvenes, con moderada hipertrofia, los resultados no son tan concluyentes. Existen datos previos que muestran que los animales presentan en algunos casos una disminuída (Grover y col, 1996; Haneda y col, 1986) y en otros una similar (Hoffmeister y col, 1998) recuperación postisquémica con respecto a corazones de ratas normales.

En cuanto al precondicionamiento isquémico (PI) ha sido muy estudiado como mecanismo protector en los corazones normales pero existen evidencias escasas en el miocardio hipertrófico (Pantos y col, 1996; Boutros y Wang, 1995; Nakagawa y col, 1997). Por lo tanto, aún no han sido totalmente identificados los mediadores responsables de dicha protección. En corazones hipertróficos de ratas con constricción aórtica abdominal, existen evidencias recientes que el PI previene las alteraciones generadas por la isquemia y reperfusión a través de la activación de los canales de  $\text{K}^+_{\text{-ATP}}$  mitocondriales (Rajesh y col, 2004). Otro intermediario que posee activa participación en el miocardio de corazones normotróficos es el NO. El NO juega un rol crucial en el mantenimiento de la presión

---

sanguínea (Loscalzo y Welch, 1995). Se ha descrito que las las ratas hipertensas espontáneas (SHR) tienen una deficiencia en la vasodilatación dependiente de NO que fue, en un principio, atribuida a una disminución en la expresión de la eNOS en el endotelio coronario (Crabos y col, 1997). Otro argumento a favor de esta hipótesis, fue el hallazgo que la respuesta de miocitos de ratas hipertróficas por sobrecarga de presión a los dadores del NO era menor (Ito y col, 1997). Contrariamente, en miocitos cardíacos postisquémicos de ratas con accidente cerebrovascular (*stroke prone*), fue descrito una mayor actividad de la iNOS. También, en el miocardio de las ratas SHR se observó una mayor actividad de la nNOS y eNOS (Nava y col, 1995), indicando que el miocardio es capaz de generar mayores niveles de NO, pero su biodisponibilidad no es suficiente (Nava y col, 1998). Varios estudios demostraron que la inactivación del NO y la consiguiente disminución de su biodisponibilidad estaría relacionada con la marcada actividad de las ROS (Schackenberg y Wilcox, 1999; Schackenberg y col, 1998; Klem y col, 1995; Kojda G y Harrison DG, 1999).

Investigaciones previas sugieren que en corazones hipertróficos la vía del NO-GMPc estaría alterada y su regulación diferencial podría ser la causa de la alteración cardíaca inducida por la isquemia y reperfusión. Esta hipótesis se basa en que, en ratas normotensas, un aumento de NO a través del GMPc estaría provocando un efecto protector frente a la injuria por reperfusión, mientras que en ratas hipertensas el NO no sería lo suficientemente bioactivo como para estimular la formación de GMPc y de esta manera ejercer la protección del miocardio (Tetsuji y col, 2007).

---

## OBJETIVOS

Los objetivos de este trabajo de tesis fueron estudiar en ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas espontáneas (SHR) adultas jóvenes (5-6 meses de edad):

- 1-Los efectos de isquemias de distinta duración sobre
  - el tamaño del infarto
  - la función miocárdica
  - el estrés oxidativo.
- 2-Los efectos del preconditionamiento isquémico (PI) sobre las variables mencionadas
- 3-La participación del NO en el PI
- 4-La participación de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP en el PI.
- 5-Los efectos del atrapamiento farmacológico de las especies reactivas del oxígeno (ROS), mediante el tratamiento con N-2-mercaptopropionilglicina (MPG) sobre las variables mencionadas.

---

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **ANIMALES**

Se utilizaron ratas machos normotensas Wistar Kyoto (WKY) e hipertensas espontáneas (SHR) de 5 a 6 meses de edad obtenidas del Bioterio de la Facultad de Ciencias Médicas, de la Universidad Nacional de La Plata. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo con la guía para el cuidado y uso de animales de laboratorio publicado por el Instituto Nacional de la Salud (NIH) de Estados Unidos (publicación nro. 85-23, revisada en el año 1996).

#### Obtención del corazón aislado

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (60 mg/kg i.p.) Se les abrió rápidamente el tórax, se aisló la aorta, y se cortaron las conexiones cardíacas liberando al corazón de grasa y tejido conectivo, sacándolo del animal. La aorta se ligó con hilo de lino a una cánula colocada en un sistema de perfusión Langendorff. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 50 seg para evitar el deterioro del preparado. La composición del Ringer fue: NaCl 120 mM, CaCl<sub>2</sub> 1.35 mM, KCl 4.7 mM, MgSO<sub>4</sub> 1.2 mM, NaCO<sub>3</sub>H 20 mM y dextrosa 11.1 mM, el cual fue termostaticado a 37°C y equilibrado con una mezcla gaseosa de 95%O<sub>2</sub> - 5% CO<sub>2</sub>, para obtener un valor de pH de aproximadamente 7.40.

#### Perfusión de corazones aislados de rata

Luego de un breve período de estabilización, se produjo el bloqueo aurículo-ventricular dañando con una fina aguja el tejido conductor del septum auricular. La estimulación eléctrica se realizó a través de dos electrodos que fueron suturados a la pared ventricular derecha para mantener la frecuencia cardíaca constante en un valor de  $280 \pm 10$  lat/min. Para evaluar la actividad mecánica de los corazones se colocó un balón de látex atado a un tubo de polietileno en el ventrículo izquierdo a través de la válvula mitral. El extremo opuesto del tubo fue conectado a un transductor de presión (AD Instruments) que permitió medir la presión del ventrículo izquierdo (PVI). El globo de látex y el tubo de polietileno se

---

llenaron con un volumen de agua suficiente para lograr una presión diastólica final (PDF) de entre 8-12 mmHg, volumen que se mantuvo constante durante todo el experimento. La presión de perfusión coronaria fue monitoreada en el punto de canulación de la aorta y ajustada a aproximadamente entre 60-70 mmHg. El flujo coronario, controlado por una bomba peristáltica fue de aproximadamente entre 10-12 ml/min en todos los grupos experimentales. La PVI fue adquirida usando un conversor analógico-digital y el programa de adquisición Chart V4.2.3 AD Instruments. A través de esta señal se obtuvieron los parámetros mecánicos necesarios para evaluar la función miocárdica.

## PROCOLOS EXPERIMENTALES

### 1- Control (C)

Perfusión durante 3 hs.



### 2- Isquemia y Reperusión (IR)

IR1

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) Isquemia global normotérmica (IG): 35 min
- c) Reperusión (R): 2 horas



IR2

- a) Estabilización (E): 20 min
- b) Isquemia global normotérmica (IG): 50 min
- c) Reperusión (R): 2 horas



### 3- Preacondicionamiento isquémico (PI)

1PI

- a) Estabilización (E): 10 min

- b) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R  
 c) Se seguirán los pasos b) y c) del protocolo IR1.



**3PI**

- a) Estabilización (E): 5 min  
 b) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG / 5 min R  
 c) Se seguirán los pasos b) y c) del IR2.



**4- Preacondicionamiento isquémico + intervenciones (L-NAME ó 5-HD)**

**4.1**

- 1PI + L-NAME (N<sup>G</sup>-nitro-L-arginina metil éster: bloqueante de la óxido nítrico sintetasa).  
 a) Estabilización (E): 5 min  
 b) L-NAME: 10 min antes del PI y durante los 10 min de reperfusión del PI.  
 c) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG / 10 min R  
 d) Se seguirán los pasos b) y c) del IR1.



**4.2**

- 1PI + 5-HD (sal sódica del ácido 5-hidrovidecanoico: bloqueante de los canales mitocondriales de K<sup>+</sup>).  
 a) Estabilización (E): 5 min  
 b) 5 HD: 10 min antes del PI y durante los 10 min de reperfusión del PI.  
 c) 1 ciclo de IG-R: 5 min IG /10 min R  
 d) Se seguirán los pasos b) y c) del IR1.



**4.3**

**-3PI + L-NAME**

- a) Estabilización (E): 5 min  
 b) L-NAME: 5 min antes del ciclo de PI y durante cada Reperfusión del PI

- c) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG / 5 min R  
 d) Se seguirán los pasos b) y c) del IR2.



#### 4.4

-3PI + 5-HD

- a) Estabilización (E): 5 min  
 b) 5-HD: 5 min antes del ciclo de PI y durante cada Reperusión del PI  
 c) 3 ciclos de IG-R: 2 min IG / 5 min R  
 d) Se seguirán los pasos b) y c) del IR2.



#### 5- MPG (N-2-mercaptopropionil glicina: atrapante de ROS)

- a) Estabilización (E): 10 min  
 b) MPG: 10 min previos a la IG de 50 min y en los primeros 10 min de la R.  
 c) Se continuará la reperusión hasta completar las 2 hs.



### PARÁMETROS MEDIDOS

#### Presión arterial sistólica

Este parámetro se controló semanalmente en la cola de las ratas en forma indirecta usando el método pletismográfico (Byrom y Wilson, 1938) y siguiendo las modificaciones detalladas en el trabajo realizado por Fritz y Rinaldi (2007).

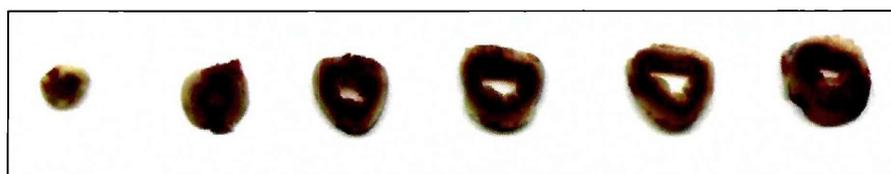
#### Índice de Hipertrofia

El índice de hipertrofia (IH) fue calculado como el cociente entre la masa del ventrículo izquierdo (MVI, expresada en mg) y la masa corporal (MC, expresada en g) de las ratas.

### Determinación del tamaño del infarto

Al término del período de reperfusión el corazón fue retirado del sistema de Langendorff y el ventrículo izquierdo (VI), una vez pesado, se congeló a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  por una hora. Al cabo de este tiempo el VI fue cortado en trozos de 2 mm de espesor a lo largo del eje mayor desde la punta a la base, los cuales fueron pesados y sumergidos en una solución al 1 % de cloruro de trifeniltetrazolio (TTC) durante 14 min. El colorante ingresa a las células y al ser reducido queda atrapado en su interior tiñéndolas de color rojo. Sólo las células que conservan actividad deshidrogenasa, pueden retener este colorante. En consecuencia, las células que se encuentran vivas, quedarán teñidas de color rojo, mientras que las células muertas no se teñirán, permitiendo así la diferenciación del tejido infartado (ver Fig 14). Los trozos de corazón fueron guardados en formalina al 10% por 24 horas luego de lo cual se escanearon y, usando un programa de análisis de imágenes (Scion Image 1.62), se determinaron las áreas de infarto y las áreas de riesgo. El área total de infarto pesada se calculó como  $(A1 \times P1) + (A2 \times P2) + (A3 \times P3) + (A4 \times P4) + (A5 \times P5) + (A6 \times P6)$ , donde  $A_i$  es el área de infarto de cada trozo y  $P_i$  es la masa respectiva. Como en esta preparación el corazón entero constituye el área de riesgo (AR), el área total de riesgo pesada fue calculada de la misma forma que el área total de infarto pero teniendo en cuenta el área  $A_i$  total de cada trozo. El tamaño del infarto se expresó como porcentaje de AR.

**Figura 14.** Trozos de VI teñidos con TTC



### Función miocárdica sistólica y diastólica

La función sistólica fue evaluada a través de la presión desarrollada del VI (PD) y la máxima velocidad de desarrollo de la presión del VI ( $+dP/dt_{max}$ ). La PD se calculó restando a la presión pico la PDF. La  $+dP/dt_{max}$  fue el máximo valor positivo de la primera derivada

---

de la PVI en función del tiempo. La función diastólica fue evaluada a través de la PDF y de la máxima velocidad de caída de la presión del VI ( $-dP/dt_{max}$ ) que constituyó el máximo valor negativo de la primera derivada de la PVI en función del tiempo.

## **DETERMINACIONES BIOQUÍMICAS**

Para realizar estas determinaciones los distintos grupos experimentales fueron repetidos, ya que no se pueden utilizar los corazones usados para medir el tamaño del infarto.

### Estrés oxidativo

#### 1- Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Buege y Aust, 1978)

Para la estimación de la peroxidación lipídica se utilizó la determinación de TBARS. Para ello, luego de finalizado cada uno de los protocolos experimentales, los corazones se retiraron del sistema de Langendorff. Se aisló el VI y se colocó en un buffer compuesto por KCl (140 mM) y  $KPO_4H_2$  (20 mM) en la proporción de 1 g de tejido en 5 ml de buffer. El tejido fue homogeneizado durante 1 min. a temperatura entre 0-2°C y luego centrifugado 10 min. a 3000 rpm. El sobrenadante fue utilizado para la determinación de TBARS. El ensayo consistió en lo siguiente: a 0.5 ml del sobrenadante se le agregó 1.5 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 10%, 1.0 ml de ácido tiobarbitúrico al 0.67 % y 0.5 ml de agua bidestilada. La preparación se agitó 10 seg y se incubó a 100 °C durante 15 min. Al término de este período se observó la formación de un producto de color rosado. Las muestras fueron enfriadas y centrifugadas 10 min a 2500 rpm. En el sobrenadante obtenido se leyó la absorbancia a 535 nm contra un blanco con mezcla de reacción y sin muestra. Los resultados fueron expresados como nmoles por mg de proteína (nmoles/ mg de prot), utilizando el coeficiente de extinción de  $1.56 \times 10^5 M^{-1} cm^{-1}$ .

#### 2- Glutión reducido (GSH) (Sedlak y Lindsay, 1958)

Para la determinación del contenido de GSH se midieron los grupos sulfidrilos no unidos a proteínas. El fundamento de la reacción consiste en que el 5,5'-ditiobis-2-ácido nitrobenzoico (DTNB) es reducido por los grupos sulfidrilos a 2-nitro-5 mercaptobenzoico, que es de color amarillo intenso. El ensayo consistió en lo siguiente: a una alícuota (820

---

µl) del homogenato se agregó 180 µl de TCA al 28 %. Las muestras se agitaron y luego se centrifugaron 10 min a 7.000 rpm. A 250 µl del sobrenadante se le agregaron 250 µl de TCA al 5 %, 1 ml de Tris HCl a una concentración de 0.4 M (pH = 8.9) y 25 µl del colorante DTNB preparado en metanol a una concentración final de 10 mM.

Se midió la absorbancia a 414 nm dentro de los 5 min de agregado el DTNB contra un blanco con la mezcla de reacción sin muestra. Se realizó una curva de calibración usando distintas concentraciones de GSH. Los resultados obtenidos se expresaron como µg por mg de proteína (µg/mg prot).

### 3- Actividad citosólica de la enzima superóxido dismutasa (SOD) (Beuchamp y Fridovich, 1971)

La actividad de la enzima SOD se determinó utilizando el sistema hipoxantina - xantina - azul de tatrastol (NBT) a través de la inhibición de la producción del formazán a una temperatura de 25 ° C y pH = 10.2.

La mezcla de reacción contiene 10 µl del sobrenadante, 780 µl de buffer KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-KOH (50 mM), 100 µl de EDTA (10 mM), 10 µl de hipoxantina (10 mM) y 100 µl NBT (1 mM) en ausencia o presencia de CNK (5 mM).

Las muestras se incubaron 30 min a temperatura ambiente. Luego de este período se inició la reacción con el agregado de 100 µl de xantina oxidasa (0.66 U/ml). Se incubaron las muestras 30 minutos a 25° C. Luego de este período de tiempo, y para finalizar la reacción, se agregaron 300 µl de CuCl<sub>2</sub> en una concentración 1mM. Se leyó la absorbancia a 560 nm cada 30 segundos durante 5 minutos y los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición por mg de proteína (% inh/mg prot).

### Contenido de proteínas

La concentración de proteínas fue evaluada a través del método de Bradford (Bradford, 1976), mediante la utilización del estándar de albúmina de suero de bovino.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar. Para el estudio de diferencias significativas entre dos grupos experimentales se utilizó la prueba de t-Student.

---

Para la comparación entre más de dos grupos se utilizó análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de Student-Newman-Keuls para comparaciones múltiples. En todos los casos el valor de 0,05 se consideró como el límite de significación estadística.

---

## RESULTADOS

### VALORES BASALES DE LOS ANIMALES UTILIZADOS

En la siguiente tabla se muestran los valores de presión arterial sistólica (PA), masa corporal (MC), masa del ventrículo izquierdo (MVI), y el índice de hipertrofia (IH) de las ratas WKY y SHR. El IH se calculó como el cociente entre MVI (en mg) y MC (en g).

	WKY (n=129)	SHR (n=138)
PA (mmHg)	125 ± 4	192 ± 2*
MC (g)	316 ± 5	317 ± 6
MVI (g)	1,06 ± 0,04	1,49 ± 0,05*
IH (mg/g)	3,67 ± 0.12	4,61 ± 0,18*

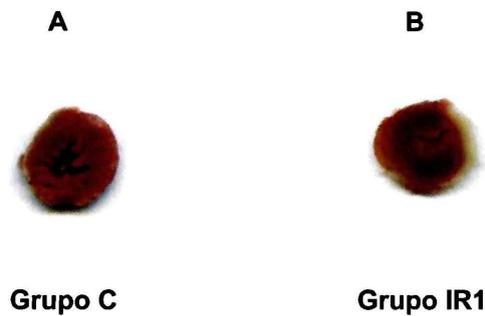
\* p< 0,05 con respecto a WKY

La cepa SHR mostró valores de PA, MVI e IH significativamente mayores que la WKY.

### ISQUEMIA GLOBAL DE 35 MINUTOS-2 HORAS DE REPERFUSIÓN (IR1)

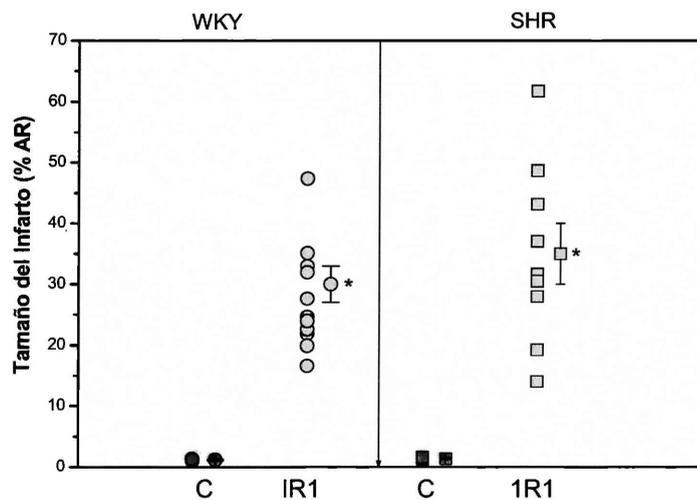
#### Tamaño del Infarto:

La Fig 15 muestra un trozo de corazón correspondiente al grupo control, sin isquemia (A) y otro del grupo sometido a 35 min de isquemia global (IG) y 2 hs de reperfusión (B) de ratas WKY, teñidos con TTC. El área no teñida (color claro) corresponde al área infartada y el área total (suma de la zona de color rojo y la de color claro) corresponde al área de riesgo.



**Figura 15:** El área total define el área de riesgo y el área no teñida la infartada. A: grupo C (control sin isquemia); B: grupo IR1 (IG 35 min y 2 hs de reperusión).

En la Fig 16 se muestran los valores individuales y los promedios de los tamaños del infarto medidos al final del período de reperusión, de corazones de ratas WKY y SHR pertenecientes a los grupos C e IR1. En las ratas WKY los valores promedios fueron de  $1,2 \pm 0,1$  % (n=4) en el grupo C y de  $30 \pm 3$  % (n=11) en el IR1. En las SHR estos valores fueron de  $1,3 \pm 0,2$  % (n=4) y de  $35 \pm 5$  % (n=9) en los grupos C e IR1, respectivamente.



**Figura 16:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo (AR), en ratas WKY y SHR. C: grupo control; grupo IR1: IG 35'-R 2hs. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

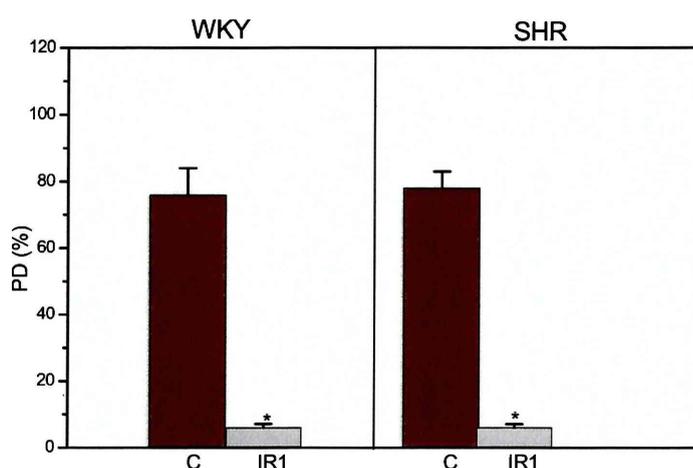
## Función miocárdica:

### *-Función Sistólica*

Los valores absolutos de presión desarrollada (PD) medidos al final de los 20 min del período de estabilización en ratas WKY y SHR no presentaron diferencias significativas. Estos valores fueron  $76 \pm 2$  y  $83 \pm 3$  mmHg en WKY (n=15) y SHR (n=13) respectivamente.

En el grupo C, al final de las 3 hs de reperfusión la PD, expresada como porcentaje de los valores obtenidos durante la estabilización, fueron de  $76 \pm 8$  % y  $78 \pm 4$  % en las cepas WKY y SHR, respectivamente.

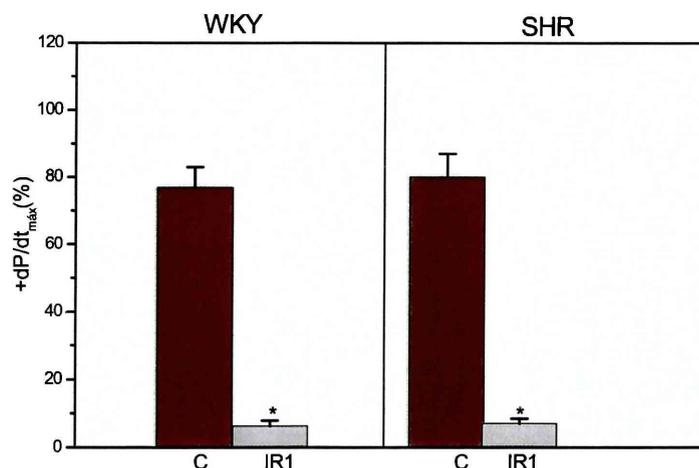
En el grupo IR1 la PD disminuyó durante la isquemia hasta valores cercanos a 0, y en la reperfusión se fue recuperando llegando al final de la misma a valores de  $6 \pm 1$  % en cada cepa de ratas (n=20). Estos valores se muestran en la Fig 17.



**Figura 17:** Valores de la presión desarrollada (PD), expresadas como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones de ratas WKY y SHR pertenecientes a los grupos C e IR1 de WKY y SHR.\*  $p < 0,05$  con respecto a C.

En el grupo C, al término del período de reperfusión, la máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{máx}$ ) fue de  $77 \pm 6$  % en las ratas WKY y de  $80 \pm 7$  % en las SHR.

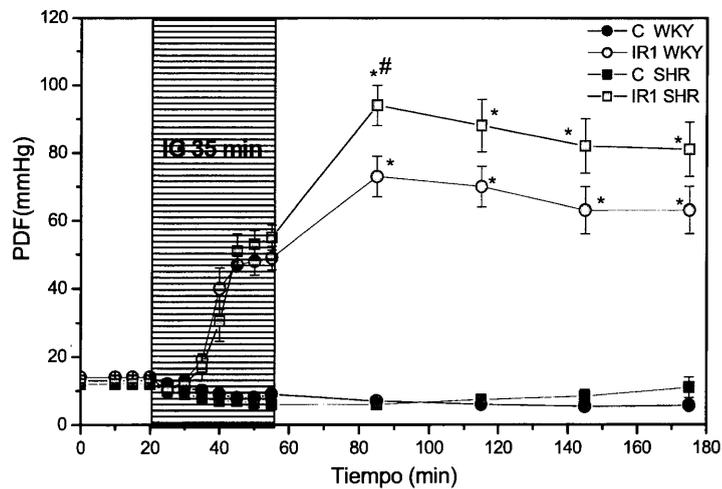
La  $+dP/dt_{máx}$  en los corazones IR1 hacia el final de las 2 hs de reperfusión se comportó de manera similar que la PD y alcanzó valores de  $6 \pm 2$  % y  $7 \pm 1$  % en las ratas WKY y SHR respectivamente (Fig 18).



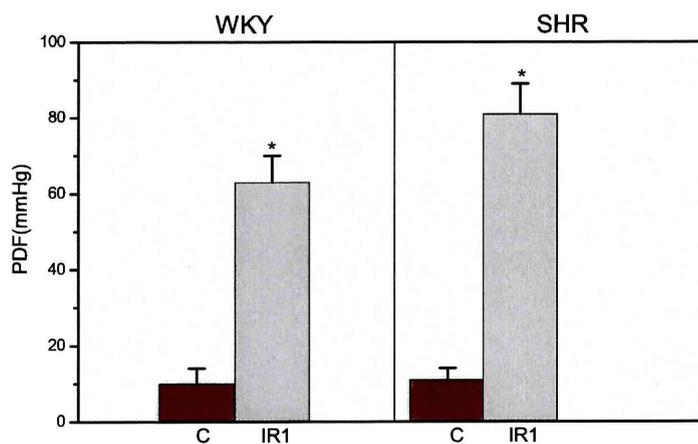
**Figura 18:** Máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{\text{máx}}$ ) expresada como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones de los grupos C e IR1 en ambas cepas.\*  $p < 0,05$  con respecto a C.

#### *-Función Diastólica:*

La Fig 19 muestra la modificación de la presión diastólica final (PDF) en función del tiempo en las ratas WKY y SHR en los grupos C e IR1. La PDF de ambas cepas al final de la reperusión en el grupo C no cambió significativamente con respecto a los valores hallados durante la estabilización, llegando a  $10 \pm 4$  vs  $14,0 \pm 0,4$  mmHg en las ratas WKY y  $11 \pm 3$  vs  $13,0 \pm 0,5$  mmHg en las SHR. En el grupo IR1 la PDF aumentó durante la isquemia llegando al final de los 35 min a un valor que en SHR no fue distinto al obtenido en las ratas WKY ( $55 \pm 4$  vs  $49 \pm 3$  mmHg). Durante todo el período de reperusión la PDF fue significativamente diferente entre las cepas, siendo al final de  $63 \pm 7$  y  $81 \pm 8$  mmHg respectivamente para las ratas WKY y SHR. (Fig 20). Sólo a los 30 minutos iniciales de la reperusión, la PDF de las SHR fue significativamente mayor a la observada en las ratas WKY.



**Figura 19:** Presión diastólica final (PDF) en función del tiempo en los grupos C e IR1 en WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a C; #  $p < 0,05$  SHR vs WKY.

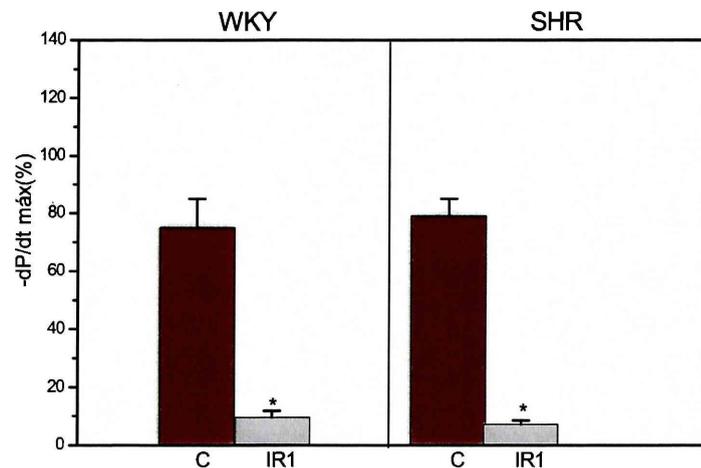


**Figura 20:** Valores de la presión diastólica final (PDF) al final del periodo de reperfusion en los grupos C e IR1 en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a C

Los cambios de la máxima velocidad de caída de la presión del ventrículo izquierdo ( $-dp/dt_{m\acute{a}x}$ ) al final de los protocolos experimentales en las ratas WKY y SHR se muestran en la Fig 21.

En el grupo C este parámetro alcanzó valores similares en ambas cepas de ratas ( $75 \pm 10$  % y  $79 \pm 6$  % en WKY y SHR respectivamente).

En el grupo IR1, aunque la recuperación postisquémica de la  $-dP/dt_{m\acute{a}x}$  fue menor que la de los corazones pertenecientes al grupo C, los valores fueron similares para ambas cepas ( $10 \pm 2\%$  en las ratas WKY y  $7 \pm 1\%$  en las SHR).



**Figura 21:** Máxima velocidad de caída de la presión del ventrículo izquierdo ( $-dP/dt_{m\acute{a}x}$ ), expresada como porcentaje de los valores obtenidos durante la estabilización, en corazones de los grupos C e IR1 en ambas cepas. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

La presión de perfusión (PP) en el grupo IR1 de la cepa WKY al final del período de estabilización fue de  $71 \pm 3$  mmHg, aumentando a  $113 \pm 7$  mmHg hacia el final de las 2 hs de la reperfusión. En la cepa SHR el aumento de la PP durante la reperfusión fue mayor alcanzando el valor de  $140 \pm 11$  mmHg hacia el final del período desde un valor inicial de  $81 \pm 5$  mmHg.

**Los resultados hasta aquí presentados indican que la aplicación de 35 min de isquemia global y 2 hs de reperfusión (IR1) indujo una recuperación postisquémica de la función miocárdica similar en ambas cepas, que guardó relación con el tamaño de infarto observado**

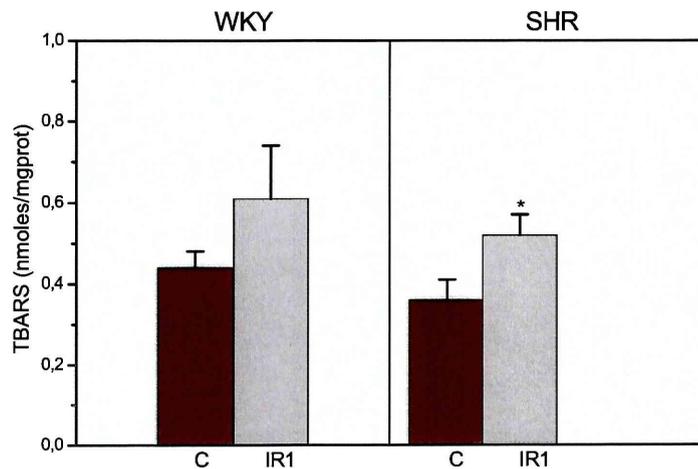
#### Determinaciones Bioquímicas:

##### *-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

La concentración de TBARS (indicador de la peroxidación lipídica) en los corazones de los grupos C de las ratas WKY y SHR fue similar, siendo los valores de  $0,44 \pm 0,04$

nmoles/mg prot (n=8) y de  $0,36 \pm 0,05$  nmoles/mg prot (n=9) en WKY y SHR, respectivamente.

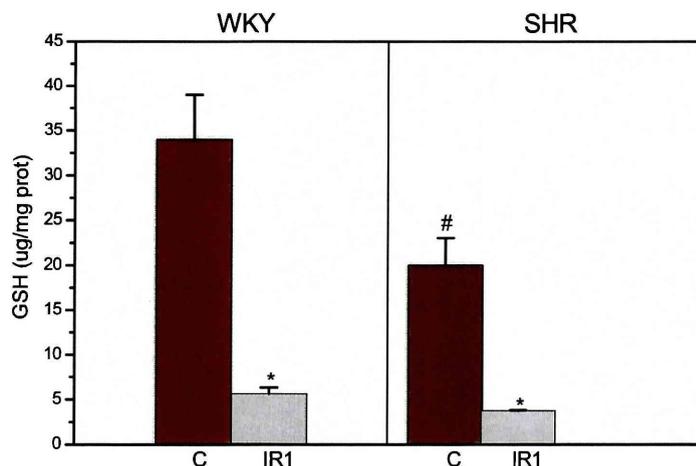
Cuando los corazones fueron sometidos a IR1, las TBARS alcanzaron los valores de  $0,61 \pm 0,13$  nmoles/mg prot (n=10) en las WKY y de  $0,52 \pm 0,05$  nmoles/mg prot (n=9) en las SHR (Fig 22).



**Figura 22:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína, en las cepas WKY y SHR. C: grupo control; IR1: grupo IG 35'-R 2hs. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

**-Glutación reducido (GSH):**

En la cepa WKY el contenido de GSH en los corazones del grupo C fue de  $34,1 \pm 4,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  de prot y disminuyó en aquellos sometidos a isquemia ( $5,7 \pm 0,6$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot). En el grupo C de la cepa SHR, el valor del GSH fue significativamente menor que en las WKY ( $18,9 \pm 2,6$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot). En los corazones isquémicos (IR1) el nivel de GSH disminuyó significativamente a  $3,8 \pm 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot, (Fig 23).

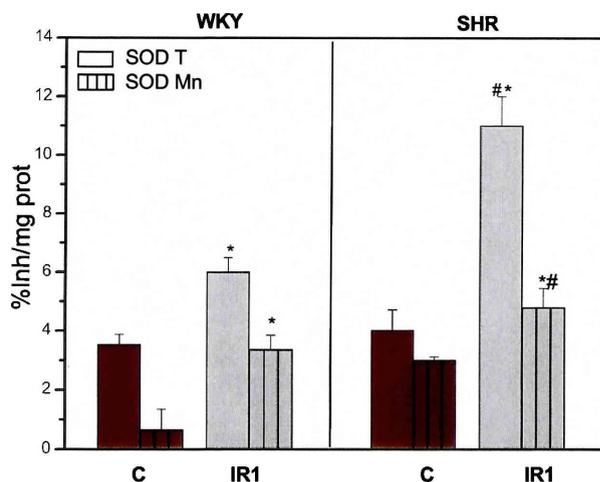


**Figura 23:** Contenido de glutatión reducido (GSH), en  $\mu\text{g}$  por  $\text{mg}$  de proteína, en las dos cepas de ratas y en los grupos C e IR1. \* $p < 0,05$  con respecto a C; #  $p < 0,05$  SHR vs. WKY.

*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En los corazones aislados de las ratas WKY perfundidos durante 3 hs (grupo C), la actividad citosólica total de la SOD (SODT) fue  $3,5 \pm 0,3$  % inh/mg prot, mientras que no se detectó actividad significativa de SODMn ( $0,6 \pm 0,6$  % inh/mg prot). En los corazones del grupo IR1 de esta misma cepa la actividad citosólica de ambas enzimas aumentó, siendo los valores de  $6,0 \pm 0,5$  y  $3,3 \pm 0,5$  % inh/mg prot para SODT y SODMn respectivamente (Fig 24).

En cuanto al grupo C de las SHR, los valores de la actividad citosólica de ambas enzimas fueron  $4,0 \pm 0,7$  y  $3,0 \pm 0,1$  % inh/mg prot para SODT y SODMn respectivamente.



**Figura 24:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como % inh por mg de prot, en corazones de los grupos C e IR1 de las cepas WKY y SHR.\*p < 0,05 con respecto a C; # p < 0,05 SHR vs. WKY.

Cuando se realizó el protocolo IR1 en esta cepa dicha actividad aumentó significativamente siendo los valores de  $11,0 \pm 1,0$  y  $5,0 \pm 0,6$  %inh/mg prot para SODT y SODMn respectivamente (Fig 24).

**A partir de los resultados presentados sobre las determinaciones bioquímicas podemos resumir que la isquemia global de 35 min y 2 hs de reperusión (IR1):**

- 1- aumentó significativamente la concentración de TBARS sólo en las SHR aún cuando existe una tendencia al aumento en las WKY**
- 2- disminuyó el contenido de GSH en ambas cepas**
- 3- aumentó la actividad citosólica de SODT y SODMn en ambas cepas.**

**Cabe destacar que la actividad de SODT y SODMn mostró valores significativamente mayores en las SHR con respecto a los observados en las ratas WKY.**

## ISQUEMIA GLOBAL DE 50 MINUTOS-2 HORAS DE REPERFUSIÓN (IR2)

### Tamaño del Infarto:

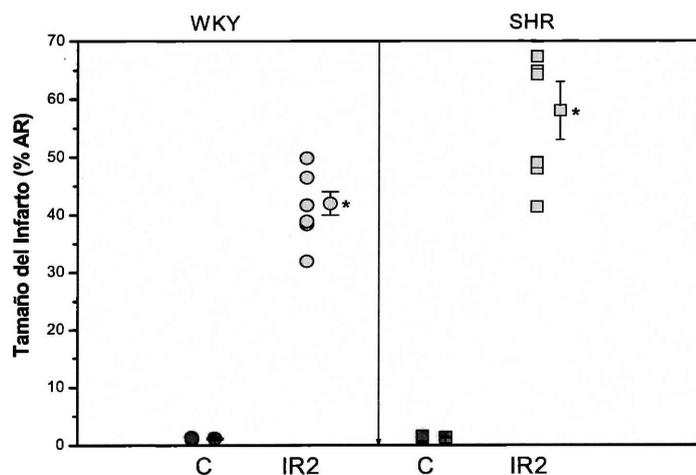
La Fig 25 muestra trozos de corazones de ratas WKY y SHR sometidos a 50 min de isquemia global y 2 hs de reperfusión, teñidos con TTC.



**Figura 25:** El área total (rojo+clara) define el área de riesgo y el área no teñida (clara) la infartada.

Los valores individuales y promedios de los tamaños del infarto en los grupos C e IR2 para ambas cepas se muestran en la Fig 26.

En los corazones de las ratas WKY el tamaño del infarto fue de  $42 \pm 2\%$  (n=7), mientras que en las SHR fue de  $58 \pm 5\%$  (n=7). Este valor fue significativamente mayor con respecto a aquel obtenido en las ratas WKY.



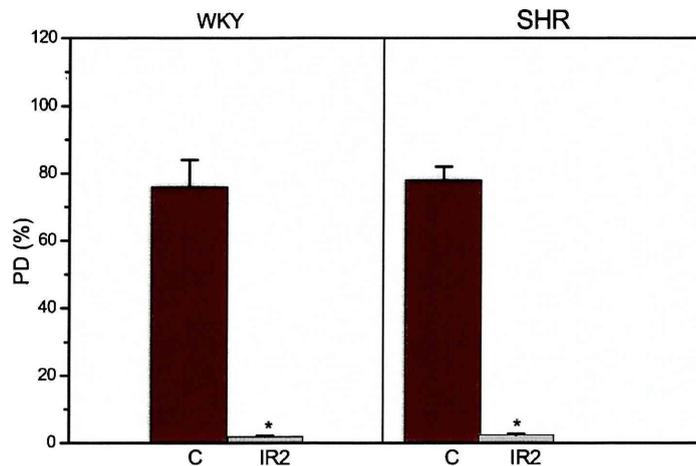
**Figura 26:** Tamaño del infarto en ambas cepas en los grupos C e IR2 (IG 50'-R 2hs). \*  $p < 0,05$  con respecto a C. #  $p < 0,05$  SHR vs WKY.

---

Función miocárdica:

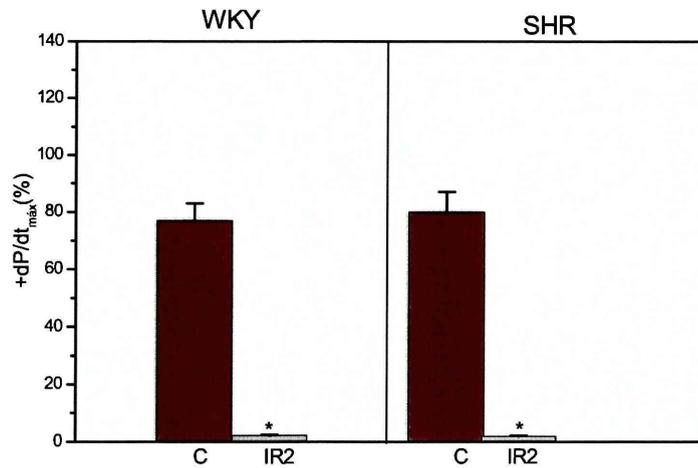
*-Función Sistólica*

En las ratas WKY, la presión desarrollada (PD) en los corazones del grupo IR2, disminuyó hasta  $1,9 \pm 0,3 \%$  y en las SHR hasta  $2,5 \pm 0,9 \%$  (Fig 27).



**Figura 27:** Presión desarrollada (PD), expresada como porcentaje de los valores observados durante la estabilización en corazones de los grupos C e IR2 (IG 50'-R 2hs) en ambas cepas de ratas.\*  $p < 0,05$  con respecto a C.

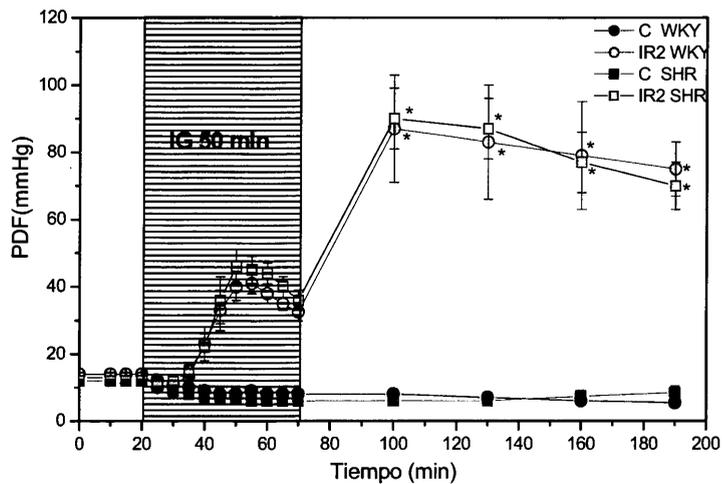
Como se observa en la Fig 28, la recuperación de la  $+dP/dt_{\text{máx}}$  en los corazones del grupo IR2 de las ratas WKY y SHR fue similar dando como resultado un valor de  $2,0 \pm 0,3 \%$  para cada cepa.



**Figura 28:** Máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{max}$ ), expresada como porcentaje de los valores obtenidos durante la estabilización, en corazones de los grupos C e IR2 (IG 50'-R 2hs) en ambas cepas. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

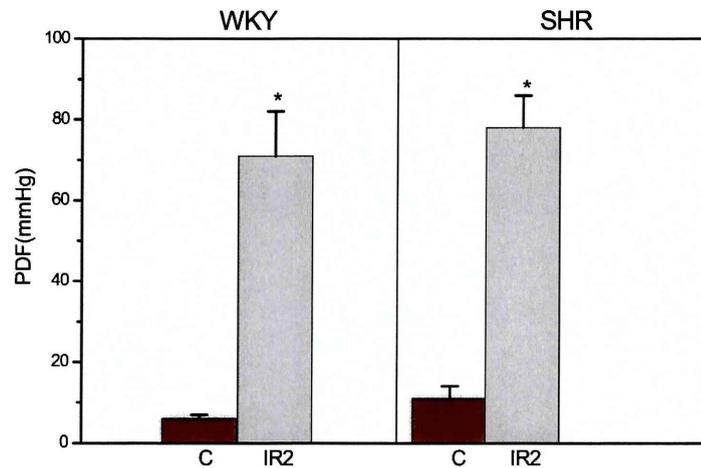
#### -Función Diastólica

En la Fig 29 se muestran los cambios de la presión diastólica final (PDF) en función del tiempo. Este parámetro aumentó gradualmente durante la isquemia, llegando al final del período a valores de  $33 \pm 2$  y  $37 \pm 3$  mmHg en las ratas WKY y SHR respectivamente.



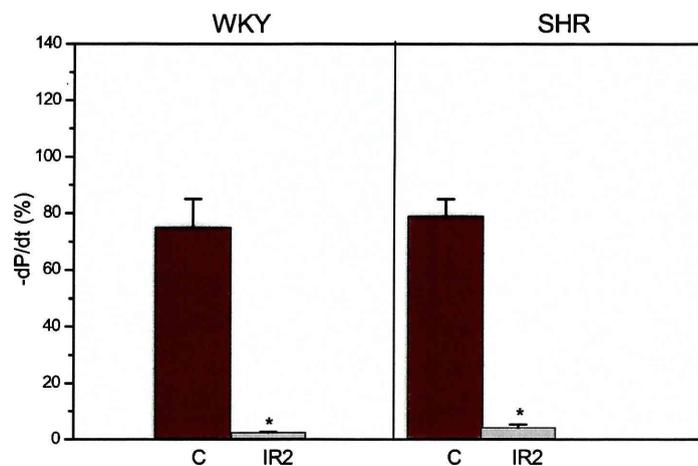
**Figura 29:** Valores de la presión diastólica final durante los protocolos C (control) y de IR2 (IG 50'-R 2hs) en WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

En la reperfusión la PDF continuó aumentando a todos los tiempos, alcanzando hacia el final de las 2 hs, valores de  $71 \pm 11$  y  $78 \pm 8$  mmHg, en las cepas WKY y SHR respectivamente (Fig 30).



**Figura 30:** Valores de presión diastólica final (PDF) en mmHg en corazones del grupo C (control) e IR2 (IG 50'-R 2hs) en ambas cepas de ratas. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

Los valores de la  $-dP/dt_{\text{máx}}$  obtenidos en los grupos C e IR2 se muestran en la Fig 31. Este parámetro disminuyó en el grupo IR2 alcanzando al final de la reperfusión valores similares en ambas cepas ( $2,5 \pm 0,2$  % y  $4,2 \pm 1,1$  % en WKY y SHR respectivamente).



**Figura 31:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones de los grupos C e IR2 de las ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

Los cambios de la presión de perfusión en este grupo, con un período de isquemia de mayor duración (IR2) fueron similares a los observados en el grupo IR1. Al término de la reperfusión los valores fueron de  $125 \pm 18$  mmHg en las ratas WKY y de  $139 \pm 13$  mmHg en las SHR.

**Los resultados hasta aquí presentados indican que la aplicación de 50 min de isquemia global y 2 hs de reperfusión (IR2) produce:**

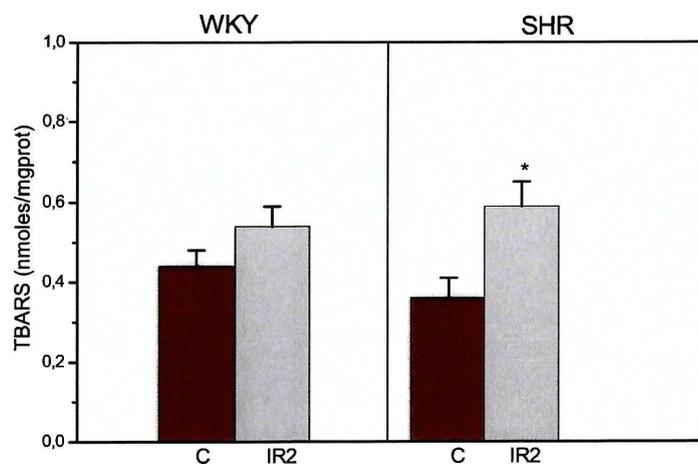
**1- un tamaño del infarto significativamente mayor en SHR que el obtenido en las ratas WKY**

**2- una recuperación postisquémica de la función miocárdica similar en ambas cepas.**

Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

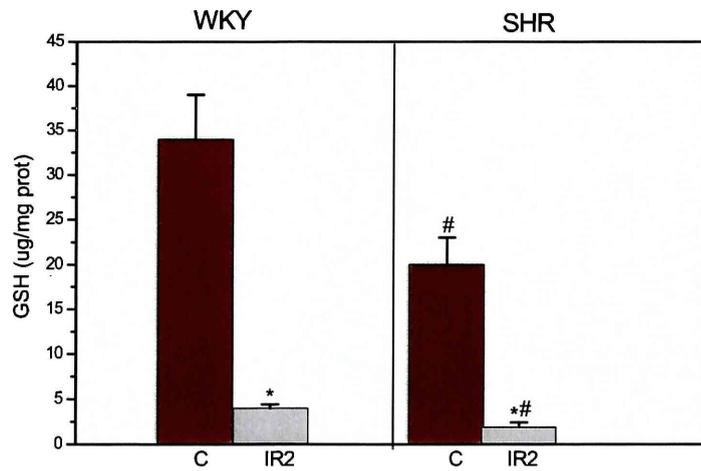
Las TBARS aumentaron significativamente en la cepa SHR llegando a valores de  $0,59 \pm 0,06$  nmoles/mg de prot (n=9), mientras que en la cepa WKY se observó un ligero aumento ( $0,54 \pm 0,05$  nmoles/mg de prot) (n=11) que no alcanzó significación estadística (Fig 32).



**Figura 32:** Concentración de TBARS en las cepas WKY y SHR, expresada en nmoles por mg de proteína, en los grupos C e IR2 (IG 50'-R 2hs). \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

**-Glutación reducido (GSH):**

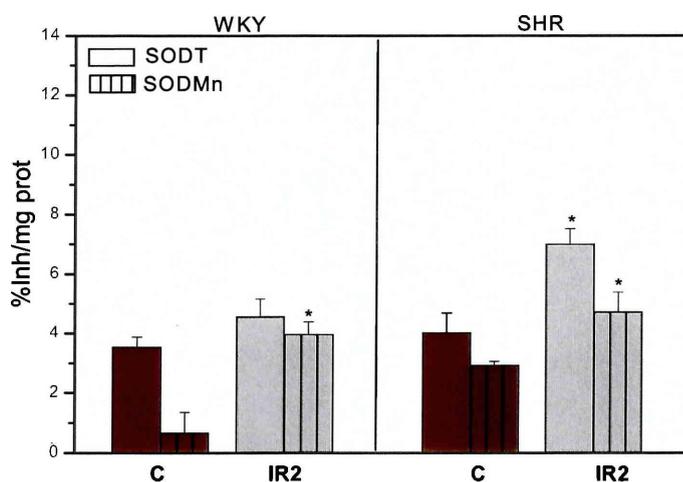
En la cepa WKY el contenido de GSH en el grupo IR2 disminuyó hasta valores de  $4,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg prot}$ , mientras que en las SHR el valor obtenido fue de  $1,9 \pm 0,5 \mu\text{g}/\text{mg prot}$  (Fig 33).



**Figura 33:** Contenido de glutación reducido (GSH) expresado en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína en WKY y SHR de los grupos C e IR2. \* $p < 0,05$  con respecto a C; # $p < 0,05$  SHR vs WKY.

**-Enzima superóxido dismutasa (SOD):**

En las ratas WKY la actividad citosólica de SODT y SODMn en el grupo IR2 fueron de  $4,5 \pm 0,6$  y  $3,9 \pm 0,4 \text{ %inh}/\text{mg prot}$  respectivamente. En la cepa SHR estos valores fueron de  $6,9 \pm 0,5 \text{ %inh}/\text{mg prot}$  para SODT y de  $4,7 \pm 0,6 \text{ %inh}/\text{mg prot}$  para SODMn (Fig 34).



**Figura 34:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos C e IR2 de las cepas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a C.

**De los resultados obtenidos de las determinaciones bioquímicas podemos resumir que la isquemia global de 50 min y 2 hs de reperusión (IR2):**

- 1- aumentó la concentración de TBARS sólo en SHR**
- 2- disminuyó el contenido de GSH en ambas cepas, aunque este valor fue significativamente menor en SHR con respecto al observado en las WKY**
- 3- aumentó la actividad citosólica de SODMn en ambas cepas**
- 4- aumentó la actividad citosólica de SODT sólo en SHR.**

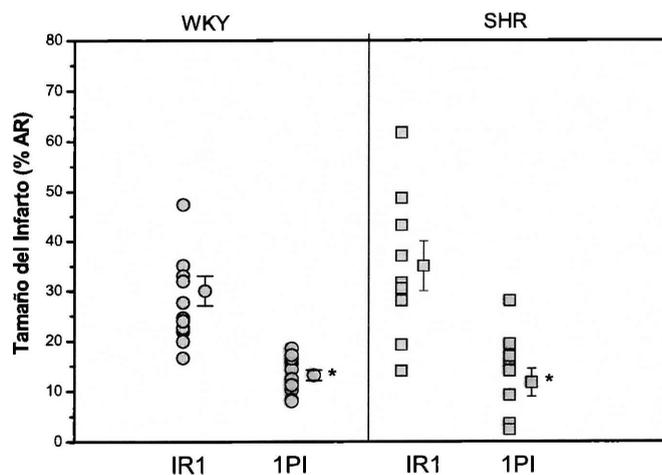
## PREACONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO (PI)

Para determinar los efectos del precondicionamiento isquémico en ambas cepas de ratas, se aplicaron uno ó varios ciclos de isquemia global seguidos de reperfusión antes de la isquemia prolongada (35 ó 50 min).

### -35 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL (IG) Y 1 CICLO DE IG-R (1PI)

#### Tamaño del Infarto:

En la Fig 35 se muestran los valores individuales y los promedios de los tamaños del infarto en los corazones de las ratas WKY y SHR en los que se aplicó 1PI y 35 min de (IG). Este parámetro disminuyó significativamente en las dos cepas con respecto a sus respectivos controles isquémicos (IR1). Los valores fueron de  $13 \pm 1 \%$  (n=9) vs  $30 \pm 3 \%$  en WKY y de  $12 \pm 3 \%$  (n=9) vs  $35 \pm 5 \%$  en las SHR.



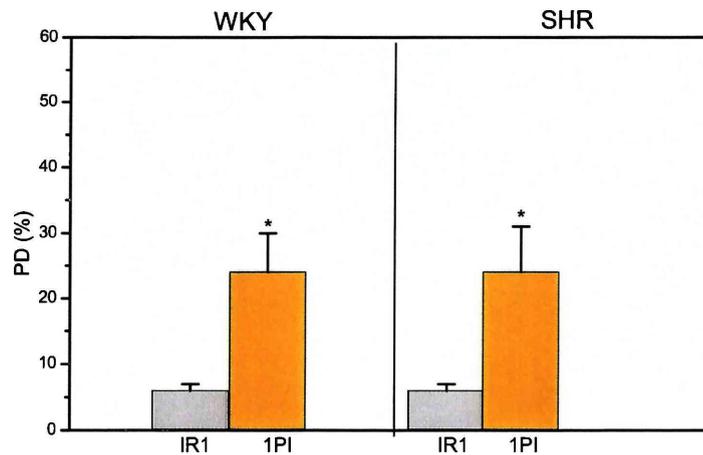
**Figura 35:** Tamaño del infarto, expresado como porcentaje del área de riesgo (AR) en WKY y SHR de los grupos IR1 (IG 35'-R 2hs) y 1PI (1 ciclo de 5 min de IG y 10 min de R). \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1.

#### Función miocárdica:

##### *-Función Sistólica*

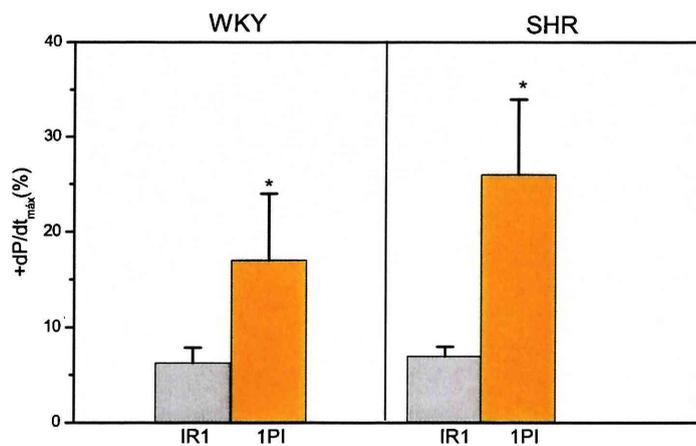
La aplicación de 1PI provocó un aumento significativo de la PD al final de la reperfusión con respecto al grupo IR1, que fue similar para ambas cepas.

Los valores fueron de  $24 \pm 6$  % y  $24 \pm 7$  % para WKY y SHR respectivamente (Fig 36).



**Figura 36:** Presión desarrollada (PD), expresada como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones del grupo IR1 y de 1PI en ambas cepas de ratas.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1.

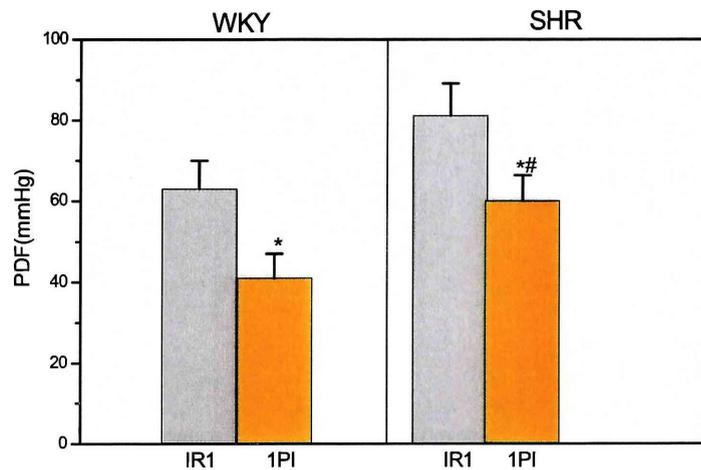
El porcentaje de la  $+dP/dt_{\text{máx}}$  se comportó de manera similar en ambas cepas de ratas, aumentando significativamente con respecto a los grupos IR1. Los valores fueron de  $17 \pm 7$  y  $26 \pm 8$  % para WKY y SHR, respectivamente (Fig 37).



**Figura 37:** Máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{\text{máx}}$ ) expresada como porcentaje de los valores preisquémicos en los grupos IR1 y 1PI para ambas cepas.\*  $p < 0.05$  con respecto a IR1.

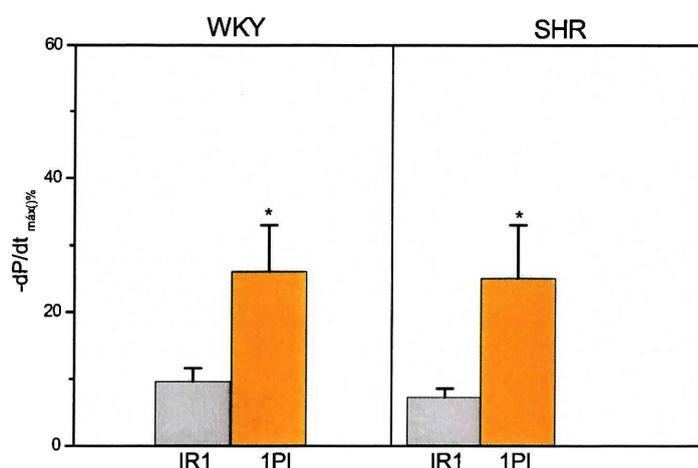
*-Función Diastólica:*

Al final de la reperfusión los corazones preconditionados mostraron valores de PDF significativamente menores que los no preconditionados. Estos valores fueron  $41 \pm 6$  y  $60 \pm 6$  mmHg para WKY y SHR respectivamente, siendo esta diferencia entre cepas significativa (Fig 38).



**Figura 38:** Valores de presión diastólica final (PDF) al cabo de 2 hs de reperfusión de corazones IR1 y 1 PI en ambas cepas de ratas.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1; #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI correspondiente a WKY.

La  $-dP/dt_{m\acute{a}x}$  aumentó significativamente en el grupo 1PI con respecto al grupo IR1, alcanzando valores de  $26 \pm 7$  % y  $25 \pm 8$  % en WKY y SHR respectivamente (Fig 39).



**Figura 39:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones del grupo IR1 y 1PI en ratas WKY y SHR.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1.

En las ratas WKY, el PI no modificó los valores de la presión de perfusión alcanzada por los corazones respecto de los no preconditionados. Al término de la reperfusión la PP fue de  $112 \pm 10$  mmHg. En SHR el valor alcanzado hacia el final de las 2 hs de reperfusión en los corazones preconditionados fue significativamente menor ( $118 \pm 7$  mmHg) con respecto al obtenido en corazones no preconditionados ( $140 \pm 11$  mmHg).

**En resumen, la aplicación de 1 ciclo de isquemia global y 10 min de R (1PI), antes de la isquemia global de 35 min y 2 hs de reperfusión (IR1) en WKY y SHR indujo:**

**1- disminución del tamaño del infarto**

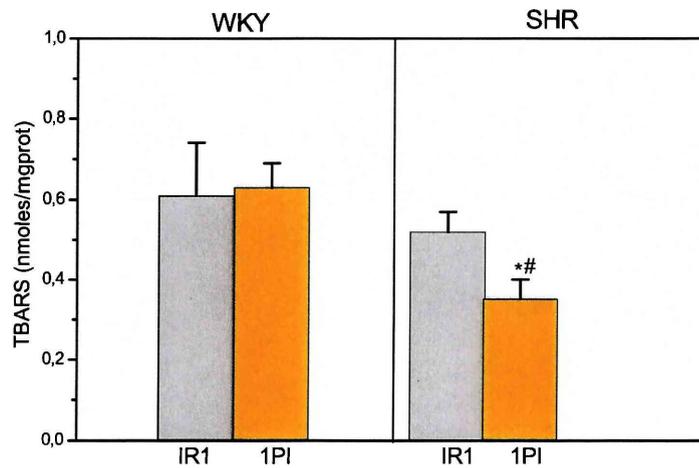
**2- incremento de la recuperación postisquémica de la función sistólica y diastólica.**

Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

La concentración de TBARS en los corazones del grupo 1PI en la cepa WKY no presentó diferencias significativas con respecto a IR1 dando valores de  $0,63 \pm 0,06$  nmoles/mg de prot (n=8) vs  $0,61 \pm 0,13$  nmoles/mg de prot (Fig 40). En cambio en las SHR, 1PI indujo una disminución significativa de las TBARS resultando en  $0,35 \pm 0,02$  nmoles/mg de prot

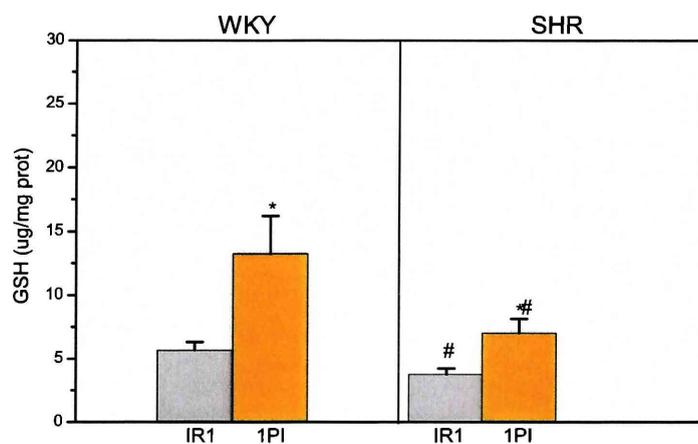
(n=10) vs  $0,52 \pm 0,05$  nmoles/mg de prot, valor que fue significativamente menor al observado en corazones precondicionados de la cepa WKY (Fig 40).



**Figura 40:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína en las cepas WKY y SHR en los grupos IR1 y 1PI.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a WKY.

*-Glutación reducido (GSH):*

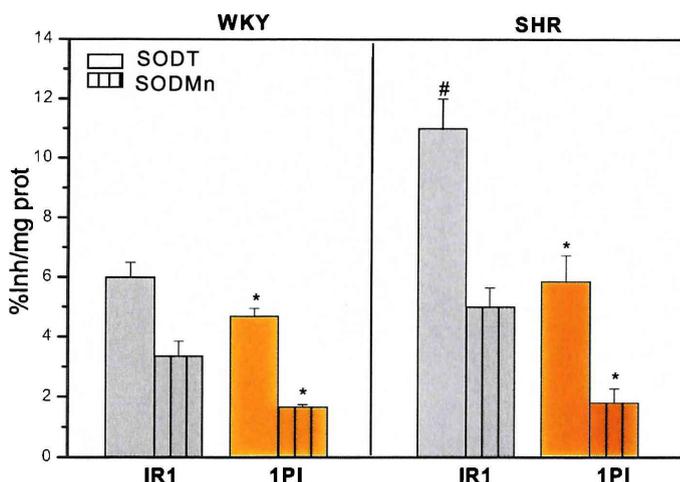
En los corazones precondicionados los valores de GSH aumentaron significativamente llegando a valores de  $13,2 \pm 3,0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot en WKY y  $7,0 \pm 1,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot en las SHR (Fig 41).



**Figura 41:** Contenido de glutación reducido (GSH) en las dos cepas de ratas luego de los protocolos IR1 y 1PI.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a WKY

**-Enzima superóxido dismutasa (SOD):**

En el grupo 1PI de las ratas WKY (Fig 42) los valores correspondientes para SODT y SODMn fueron significativamente menores con respecto a los obtenidos en el grupo IR1 ( $4,7 \pm 0,2$  y  $1,7 \pm 0,1$  vs  $6,0 \pm 0,5$  y  $3,3 \pm 0,5$  %inh/mg prot).



**Figura 42:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína en corazones de los grupos IR1 y 1PI de las cepas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  SHR vs WKY.

En los corazones preacondicionados de las SHR la actividad citosólica de ambas enzimas también disminuyó significativamente respecto a los corazones no preacondicionados ( $5,9 \pm 0,9$  y  $1,8 \pm 0,5$  vs.  $11,0 \pm 1,0$  y  $5,0 \pm 0,6$  %inh/mg prot para SODT y SODMn respectivamente).

**Los resultados de las determinaciones bioquímicas realizadas indican que la aplicación de 1 ciclo de isquemia global y 10 min de R (1PI), aplicados antes de la isquemia global de 35 min y 2 hs de perfusión (IR1):**

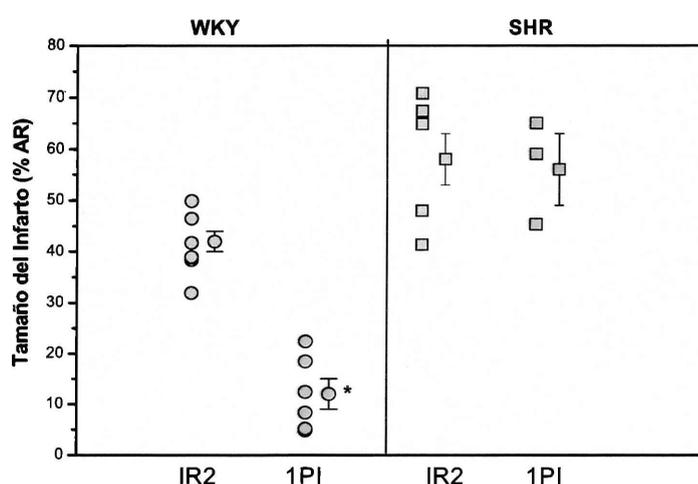
- 1- disminuye la concentración de TBARS sólo en SHR**
- 2- aumente el contenido de GSH en ambas cepas**
- 3- disminuye la actividad citosólica de SODT y SODMn en ambas cepas.**

## -50 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL (IG): 1PI Y 3 PI

Para determinar los efectos del preconditionamiento isquémico (PI) frente a un período de isquemia global de 50 min se aplicaron 1 (1PI) ó 3 ciclos (3PI) de isquemia-reperfusión antes de realizar la isquemia.

### Tamaño del Infarto:

En la Fig 43 se muestra el tamaño del infarto obtenido en los corazones preconditionados con 1PI de las ratas WKY y SHR.



**Figura 43:** Tamaño del infarto en ambas cepas luego de los protocolos IR2 (IG 50'-R 2hs) y 1PI (1 ciclo de 5 min de IG y 10 min de R) antes de la IG de 50 min y perfusión.\* p < 0,05 con respecto a IR2.

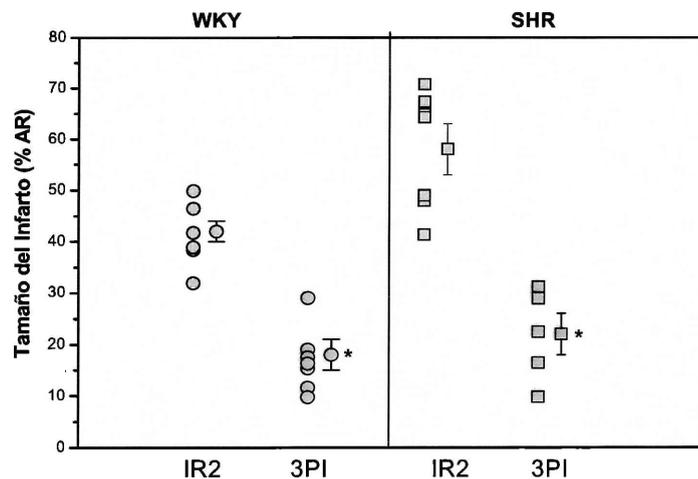
Este parámetro disminuyó significativamente en la cepa WKY con respecto a su respectivo grupo control isquémico (IR2) dando valores de  $12 \pm 3 \%$  (n=6) vs  $42 \pm 2 \%$ .

En las SHR, sin embargo, el tamaño del infarto no fue modificado por 1PI dando valores de  $56 \pm 7 \%$  (n=4) vs  $58 \pm 5 \%$  en IR2.

Dado que 1PI no disminuyó el tamaño del infarto en las SHR, decidimos utilizar 3 ciclos preconditionantes (3PI) de 2 min de isquemia, seguidos de 5 min de perfusión previos a la isquemia global de 50 min.

La Fig 44 muestra que la aplicación de 3PI disminuyó significativamente el tamaño del infarto con respecto a IR2 en ambas cepas. En las WKY este parámetro fue  $17 \pm 3 \%$  (n=7) y no mostró diferencias con respecto a los valores obtenidos con un solo ciclo (1PI) (Fig

43). En las SHR el tamaño del infarto fue de  $22 \pm 4 \%$  ( $n=7$ ), valor significativamente menor con respecto al obtenido en IR2 ( $58 \pm 5 \%$ ).



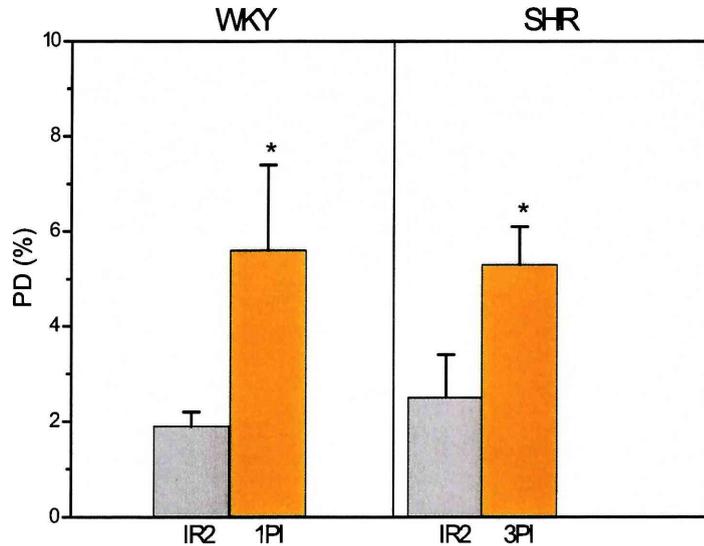
**Figura 44:** Tamaño del infarto en ambas cepas luego de los protocolos IR2 (IG 50'-R 2hs) y 3PI (3 ciclos de 2 min de IG y 5 min de R). \* $p < 0,05$  con respecto a IR2.

**Los resultados que se mostrarán a continuación en las ratas WKY son referidos a los grupos IR2 y 1PI y en SHR a los grupos IR2 y 3PI.**

#### Función miocárdica:

##### *-Función Sistólica*

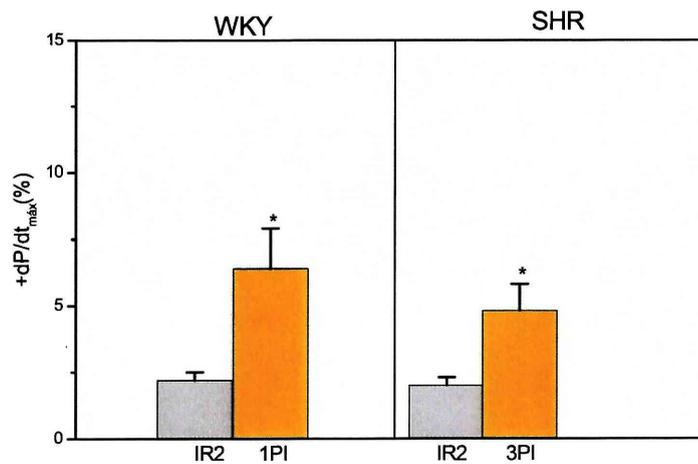
En ambas cepas los corazones preacondicionados con 1 ó 3 ciclos mostraron valores de presión desarrollada significativamente mayores a los encontrados en los respectivos grupos IR2. En las ratas WKY el valor fue de  $5,6 \pm 1,8 \%$  y en las SHR  $5,3 \pm 0,8 \%$  (Fig 45).



**Figura 45:** Presión desarrollada (PD), expresada como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones de los grupos IR2, 1PI en ratas WKY y 3PI en las SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

El porcentaje de la  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$  en los corazones de los grupos 1PI y 3PI hacia el final de las 2 hs de reperfusión se comportó de manera similar a la PD en ambas cepas de ratas aumentando significativamente con respecto a los grupos IR2 respectivos (Fig 46).

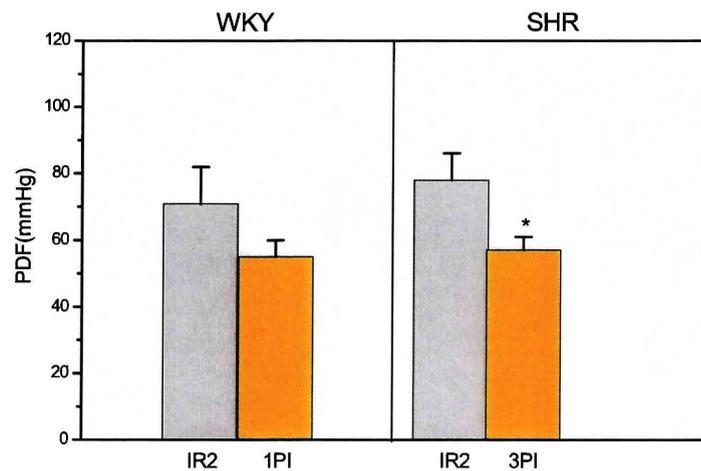
En las ratas WKY los valores fueron de  $6,4 \pm 1,5$  % y en las SHR de  $4,8 \pm 1,0$  % (Fig 46).



**Figura 46:** Máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ ), expresada como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones IR2, 1PI en ratas WKY y 3PI en SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

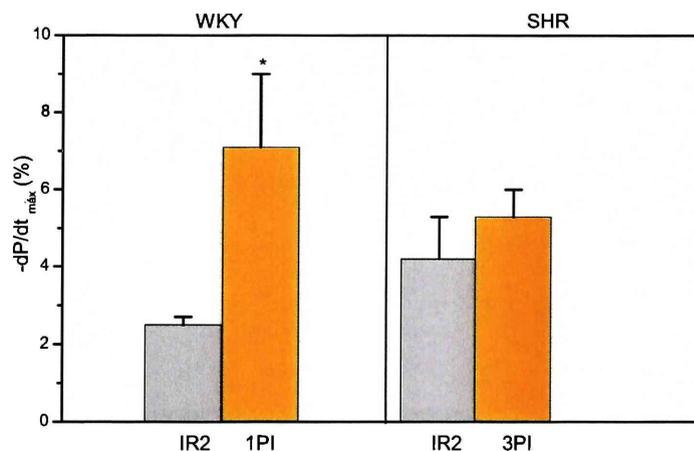
**-Función Diastólica:**

Al final de la reperfusión, la PDF en el grupo 1PI tendió a ser menor que el valor observado en corazones del grupo IR2 en ambas cepas de ratas ( $55 \pm 5$  mmHg en WKY y  $57 \pm 4$  mmHg en SHR) pero sólo en SHR alcanzó significación estadística (Fig 47).



**Figura 47:** Valores de presión diastólica final (PDF) en corazones IR2, 1PI en las WKY y 3PI en las SHR.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

El PI en las ratas WKY incrementó significativamente la  $-dP/dt_{\text{máx}}$  al final de la reperfusión ( $7,1 \pm 1,9$  % vs  $2,5 \pm 0,2$  %), mientras que en las SHR los valores obtenidos con 3 PI no fueron estadísticamente diferentes con respecto al grupo IR2 ( $5,3 \pm 0,7$  % vs  $4,2 \pm 1,1$  %) (Fig 48).



**Figura 48:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones del grupo IR2, 1PI en ratas WKY y 3 PI en SHR.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

Ambas cepas alcanzaron al final de la reperfusión valores similares de la presión de perfusión (PP). Sin embargo, sólo en SHR el PI disminuyó significativamente la PP ( $107 \pm 5$  vs.  $139 \pm 13$  mmHg en corazones no preacondicionados).

**De los resultados hasta aquí presentados podemos resumir que la aplicación de 1PI en WKY ó 3PI en las SHR antes de la isquemia global de 50 min y 2 hs de reperfusión (IR2):**

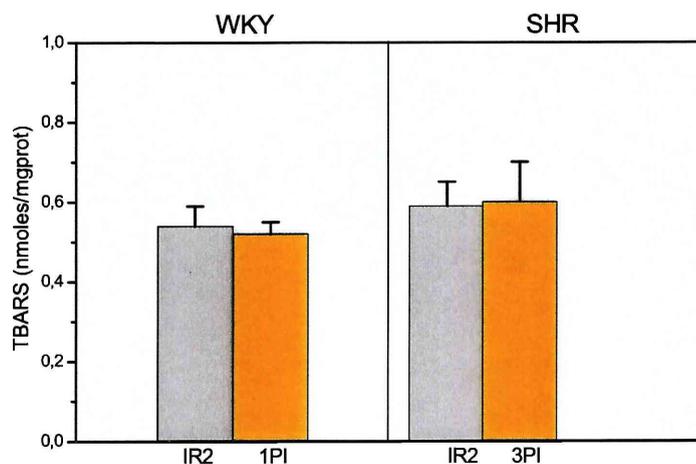
**1- disminuyó el tamaño del infarto**

**2- aumentó la recuperación postisquémica de la función sistólica y diastólica.**

Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

La concentración de TBARS no fue modificada por el PI en ambas cepas de ratas. En las WKY el valor fue  $0,52 \pm 0,03$  nmoles/mg de prot (n=6) y en las SHR  $0,6 \pm 0,1$  nmoles/mg de prot (n=7), (Fig 49).

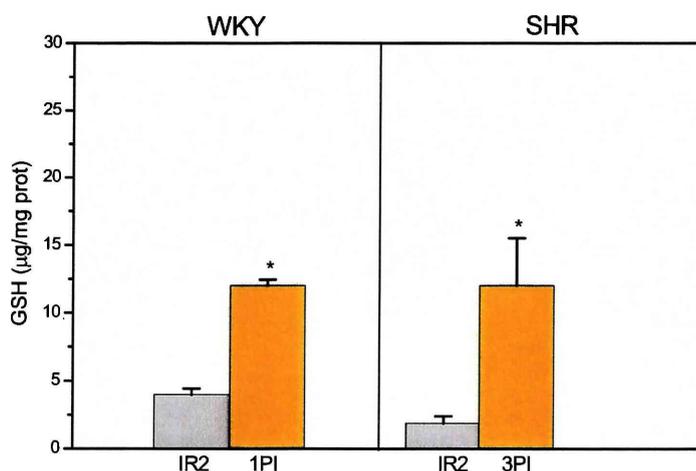


**Figura 49:** Concentración de TBARS, expresada en nmoles por mg de proteína en los grupos IR2, 1PI en las ratas WKY y 3PI en las SHR.

*-Glutathión reducido (GSH):*

En ambas cepas el preconditionamiento aumentó los niveles de GSH llegando a valores de  $12,0 \pm 0,4 \mu\text{g}/\text{mg prot}$  en WKY y de  $12,0 \pm 3,5 \mu\text{g}/\text{mg prot}$  en SHR.

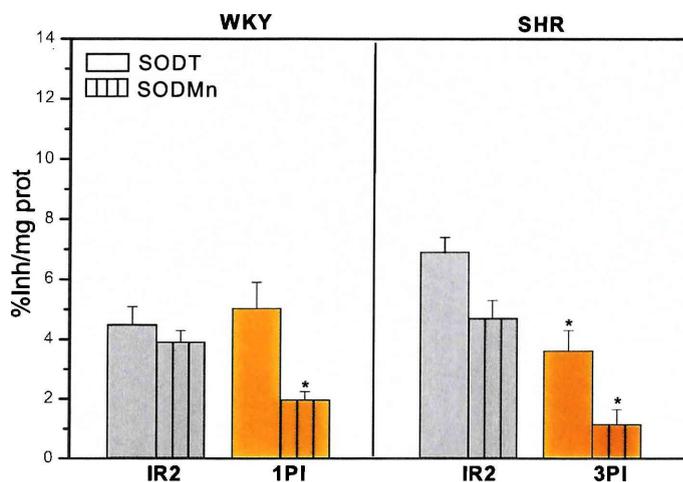
Estos valores fueron significativamente mayores con respecto a los obtenidos en los corazones no preconditionados (Fig 50).



**Figura 50:** Contenido de GSH, expresado en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína en los grupos IR2, 1PI en WKY y 3PI en SHR.\*  $p < 0.05$  con respecto a IR2.

*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En las ratas WKY, la aplicación de 1PI no modificó los valores de SODT ( $5,0 \pm 0,9$  vs.  $4,5 \pm 0,6 \text{ %inh}/\text{mg prot}$ ) pero disminuyó los de SODMn ( $2,0 \pm 0,3$  vs  $4,0 \pm 0,4 \text{ %inh}/\text{mg prot}$ ). En las SHR, la actividad citosólica de ambas enzimas en el grupo 3PI fue significativamente menor con respecto a las del grupo IR2 ( $3,6 \pm 0,7$  vs  $6,9 \pm 0,5 \text{ %inh}/\text{mg prot}$  y  $1,1 \pm 0,5$  vs  $4,7 \pm 0,6 \text{ %inh}/\text{mg prot}$ , para SODT y SODMn respectivamente) (Fig 51).



**Figura 51:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inh por mg de prot, en corazones de los grupos IR2, 1PI en WKY y 3PI en SHR.\* p < 0,05 con respecto a IR2.

**En resumen, las determinaciones bioquímicas indican que la aplicación de 1PI en WKY o 3PI en las SHR, aplicados antes de la isquemia global de 50 min y 2 hs de reperfusión (IR2):**

- 1- no cambia la concentración de TBARS**
- 2- aumenta el contenido de GSH**
- 3- disminuye la actividad citosólica de SODMn**
- 4- disminuye la actividad citosólica de SODT sólo en las SHR.**

### **N-NITRO-L-ARGININA METIL ÉSTER (L-NAME): BLOQUEANTE DE LA ÓXIDO NÍTRICO SINTETASA**

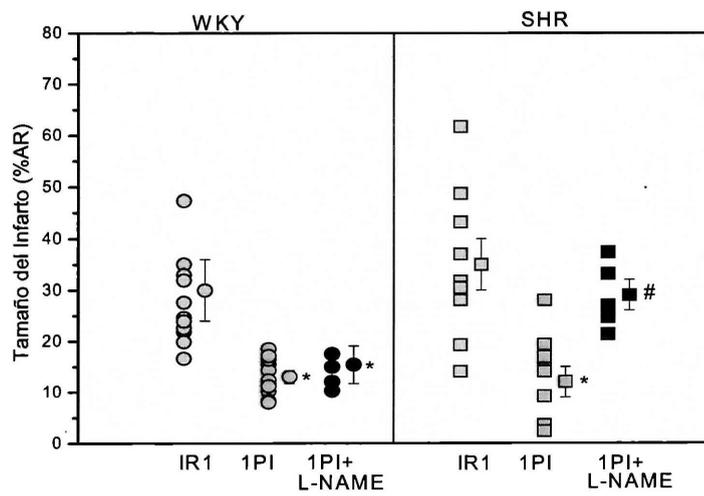
Para determinar la participación del NO en el preconditionamiento isquémico en los dos períodos de isquemia estudiados, se utilizó un bloqueante de la óxido nítrico sintasa, la N-Nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), que fue administrado durante 20 min. en una dosis de 1 mM antes del período de isquemia (ver protocolo 4.1, Sección Materiales y Métodos).

## -35 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL Y 1 PI EN PRESENCIA DE L-NAME

### Tamaño del Infarto:

La Fig 52 muestra los valores individuales y los promedios de los tamaños del infarto obtenidos en corazones de ratas WKY y SHR de los grupos IR1, 1PI y 1PI+L-NAME.

En las ratas WKY, el promedio de este parámetro en el grupo 1PI+L-NAME fue similar al obtenido en el grupo 1PI, dando valores de  $15 \pm 3 \%$  (n=6) vs  $13 \pm 1 \%$  y significativamente menor con respecto a IR1 ( $30 \pm 3 \%$ ).



**Figura 52:** Tamaño del infarto en ambas cepas luego de los protocolos IR1, 1PI y 1PI+L-NAME.\* p < 0,05 con respecto a IR1. # p < 0,05 con respecto a 1PI.

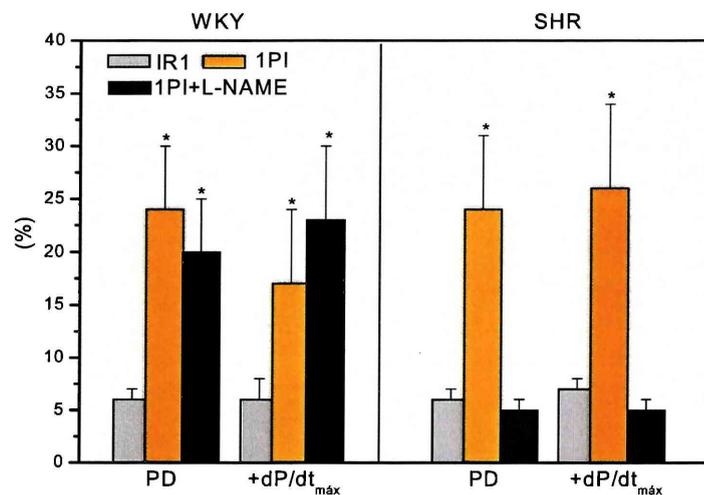
En la cepa SHR el grupo 1PI+L-NAME mostró un tamaño del infarto que fue significativamente mayor al obtenido en el grupo 1PI dando valores de  $29 \pm 3 \%$  (n=6) vs  $12 \pm 3 \%$ , aunque similar al de los corazones

### Función miocárdica:

#### *-Función Sistólica*

En el grupo de corazones 1PI+ L-NAME de la cepa WKY el porcentaje de la PD y la  $+dP/dt_{\text{máx}}$  fue similar al encontrado en 1PI y significativamente mayor a IR1 ( $20 \pm 5\%$  y  $23 \pm 7\%$  respectivamente).

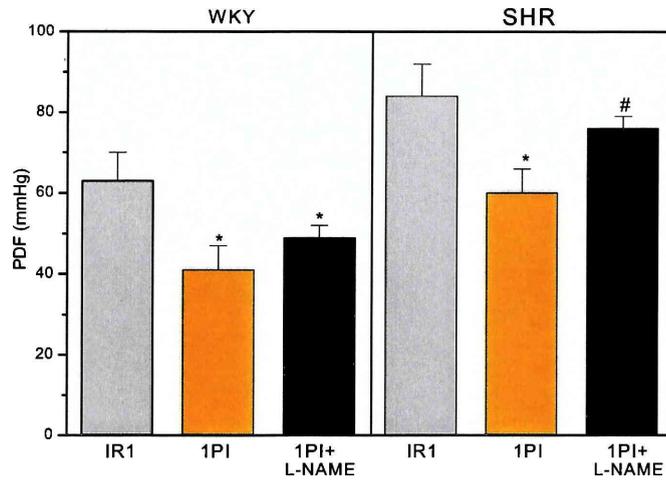
En las SHR la PD y la  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$  en el grupo 1PI+ L-NAME mostraron un patrón similar de recuperación, dando un valor de  $5 \pm 1 \%$  para ambos parámetros. Estos valores fueron significativamente menores que en el grupo 1PI y similares a los obtenidos en los corazones IR1 (Fig 53).



**Figura 53:** Presión desarrollada (PD) y máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{m\acute{a}x}$ ), expresadas como porcentaje de los valores preisquémicos, en corazones IR1, 1PI y 1PI+L-NAME en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1.

#### -Función Diastólica:

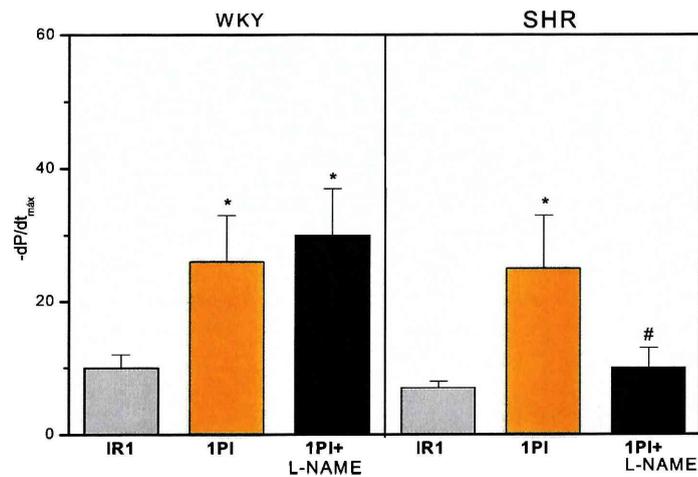
Al final de la reperfusión la PDF en los corazones del grupo 1PI+L-NAME de las ratas WKY fue similar a la obtenida en 1PI ( $49 \pm 3$  vs  $41 \pm 6$  mmHg), aunque fue significativamente menor a la observada en IR1 ( $63 \pm 7$  mmHg).



**Figura 54:** Valores de presión diastólica final (PDF) en mmHg en corazones IR1, 1PI y 1PI+L-NAME.\*  $p < 0.05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

En las SHR el grupo 1PI+L-NAME mostró valores de PDF mayores a los obtenidos en 1PI ( $76 \pm 3$  vs  $60 \pm 6$  mmHg) y similares a los observados en IR1 ( $81 \pm 8$  mmHg) (Fig 54).

Los valores de la  $-dP/dt_{m\acute{a}x}$ , en los grupos 1PI+L-NAME, 1PI e IR1 se muestran en la Fig 55.



**Figura 55:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{m\acute{a}x}$ ) en corazones del grupo IR1, 1PI y 1PI+L-NAME en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI

En las ratas WKY el valor de este parámetro en el grupo 1PI+L-NAME fue de  $30 \pm 7 \%$ , similar al obtenido en 1PI ( $26 \pm 7 \%$ ) y significativamente mayor al encontrado en el grupo IR1 ( $10 \pm 2 \%$ ). En cambio en la cepa SHR en los corazones 1PI+L-NAME este parámetro fue significativamente menor al obtenido en el grupo 1PI ( $10 \pm 3 \%$  vs  $25 \pm 8 \%$ ) y similar al encontrado en el grupo IR1 ( $7 \pm 1 \%$ ).

En el grupo 1PI+L-NAME, la presión de perfusión (PP) de ambas cepas cambió de manera similar. Al término de la reperfusión la PP fue de  $132 \pm 13$  mmHg en las ratas WKY y  $152 \pm 10$  mmHg en las SHR, valores que tendieron a ser mayores a los observados en el grupo 1PI pero no alcanzaron significación estadística.

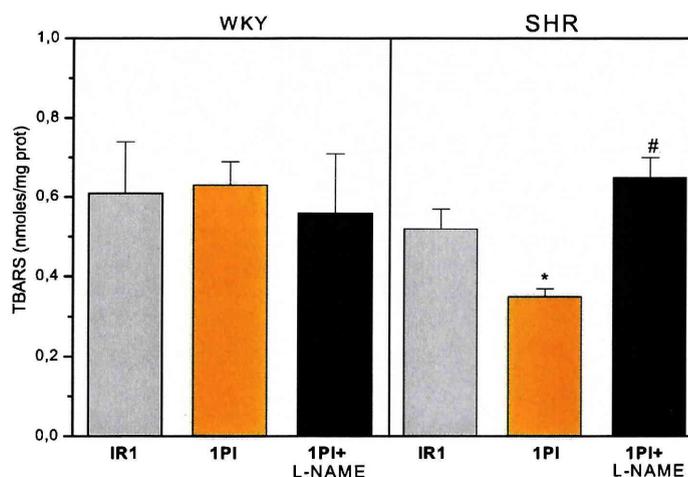
**Los resultados presentados demuestran que cuando se realizó el PI en presencia de L-NAME:**

**1- en las SHR, el tamaño del infarto y la recuperación postisquémica de la función miocárdica fueron similares a los valores obtenidos en los corazones IR1**

**2- en las WKY, el tamaño del infarto disminuyó y la recuperación post-isquémica de la función miocárdica mejoró respecto a lo observado en los corazones IR1.**

#### Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

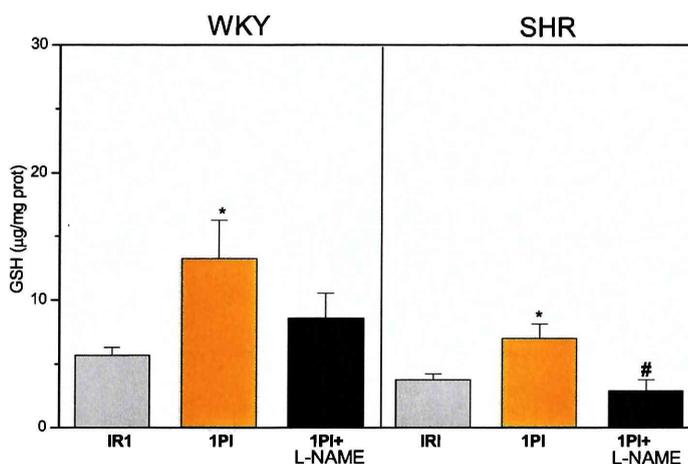


**Figura 56:** Concentración de TBARS, expresadas en nmoles por mg de proteína, en los grupos IR1, 1PI y 1PI+L-NAME. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1; #  $p < 0,05$  con respecto a IR1 y 1PI.

En los corazones del grupo 1PI+L-NAME de las ratas WKY, la concentración de TBARS fue de  $0,56 \pm 0,15$  nmoles/mg de prot (n=7), valor que no fue significativamente diferente del obtenido en los grupos 1PI e IRI. En las SHR las TBARS de los corazones 1PI+L-NAME el valor fue significativamente mayor que el obtenido en 1PI ( $0,65 \pm 0,05$  nmoles/mg de prot, n=6) (Fig 56).

*-Glutación reducido (GSH):*

En las WKY, el nivel de GSH fue ligeramente menor que el obtenido en 1PI sin alcanzar significación estadística ( $8,6 \pm 1,9$  vs  $13,2 \pm 3,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot). En las SHR del grupo 1PI+L-NAME el nivel de GSH fue de  $2,9 \pm 0,8$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot, valor significativamente menor que el observado en el grupo 1PI ( $7,0 \pm 1,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot) (Fig 57).

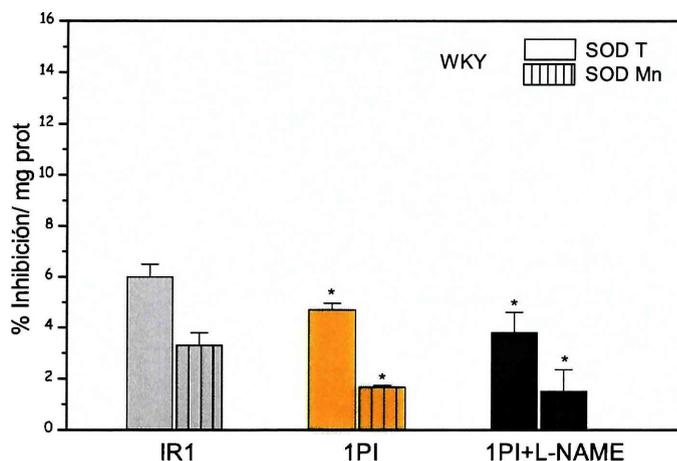


**Figura 57:** Contenido de glutación reducido (GSH) en las dos cepas de ratas luego de los protocolos IRI, 1PI y 1PI+L-NAME. \*  $p < 0.05$  con respecto a IRI; #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

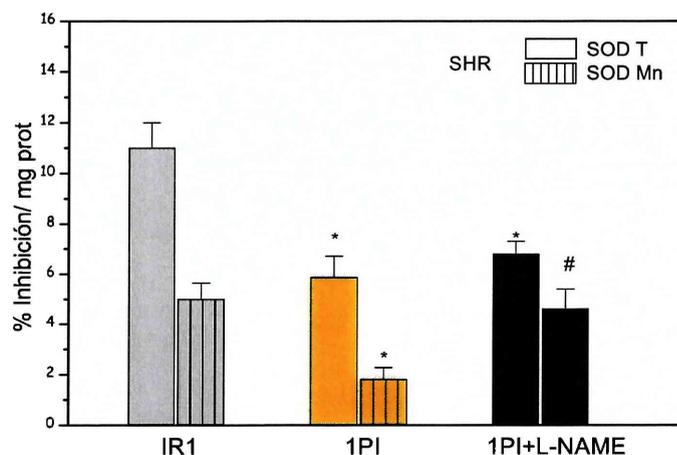
*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En las ratas WKY del grupo 1PI+L-NAME, la SODT fue de  $3,8 \pm 0,8$  %inh/mg prot y la SODMn de  $1,5 \pm 0,8$  %inh/mg prot. Estos valores fueron similares a los obtenidos en el grupo 1PI ( $4,7 \pm 0,3$  y  $1,7 \pm 0,1$  %inh/mg prot para SODT y SODMn, respectivamente) (Fig 58).

En las SHR del grupo 1PI+L-NAME, la actividad de la SODT fue similar ( $6,8 \pm 0,5$  %inh/mg prot) y la de SODMn fue mayor a los valores obtenidos en el grupo 1PI ( $4,6 \pm 0,8$  %inh/mg prot) (Fig 59).



**Figura 58:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, en corazones de los grupos IR1, 1PI y 1PI+L-NAME en ratas WKY. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1.



**Figura 59:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn en corazones de los grupos IR1, 1PI y 1PI+L-NAME en SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1; #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

De los resultados presentados sobre las determinaciones bioquímicas se puede resumir que sólo en SHR la aplicación del precondicionamiento isquémico en presencia de la inhibición de la NOS con L-NAME y 35 min de isquemia (1PI + L-NAME):

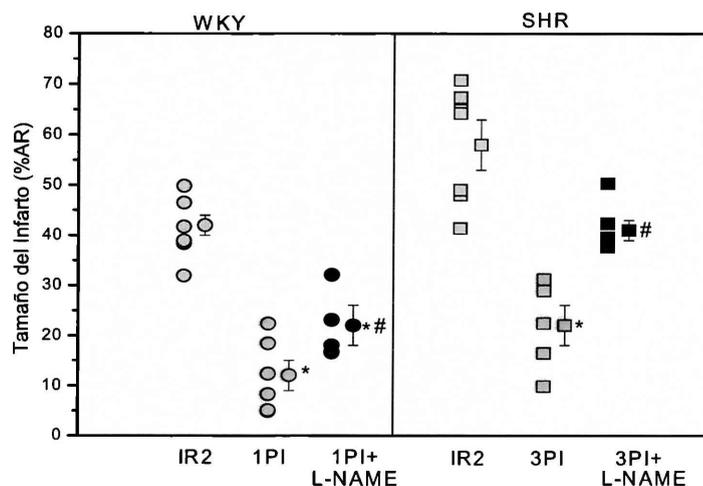
- 1- aumentó las TBARS
- 2- disminuyó el contenido de GSH
- 3- aumentó la actividad citosólica de la enzima SODMn.

En WKY estos parámetros no fueron modificados por el tratamiento con L-NAME.

### -50 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL: 1PI Y 3 PI EN PRESENCIA DE L-NAME

#### Tamaño del Infarto:

La Fig 60 muestra los valores individuales y los promedios de los tamaños del infarto en corazones de ratas WKY y SHR sometidos a isquemia global de 50 min y 2 hs de reperfusion (IR2), 1PI en ratas WKY y 3PI en SHR y ambos PI en presencia de L-NAME.



**Figura: 60** Tamaño del infarto en los grupos IR2; 1PI y 1PI+L-NAME en las ratas WKY; 3PI y 3PI+L-NAME en las SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2; #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI y 3PI.

En las ratas WKY del grupo 1PI+ L-NAME el tamaño del infarto fue de  $22 \pm 4$  % (n= 5). Este valor fue significativamente mayor que el obtenido con 1PI ( $12 \pm 3$  %). En las SHR el grupo 3PI+L-NAME el tamaño del infarto fue de  $41 \pm 2$  % (n=6), valor significativamente mayor al encontrado en los corazones del grupo 3PI ( $22 \pm 4$  %).

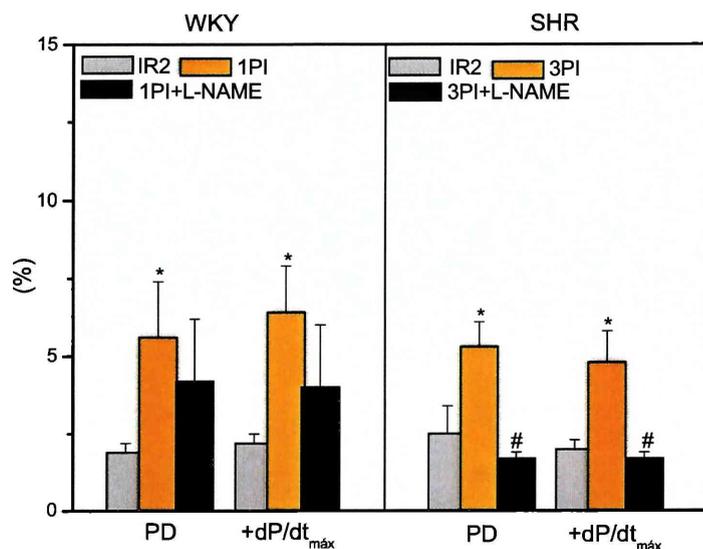
### Función miocárdica:

#### *-Función Sistólica*

La PD del grupo 1PI+L-NAME de las ratas WKY fue de  $4,2 \pm 2,0$  %, valor similar al encontrado en el grupo 1PI ( $5,6 \pm 1,8$  %).

En las SHR los corazones del grupo 3PI+L-NAME mostraron una PD de  $1,7 \pm 0,2$  % que fue significativamente menor a la obtenida en el grupo 3PI ( $5,3 \pm 0,8$  %).

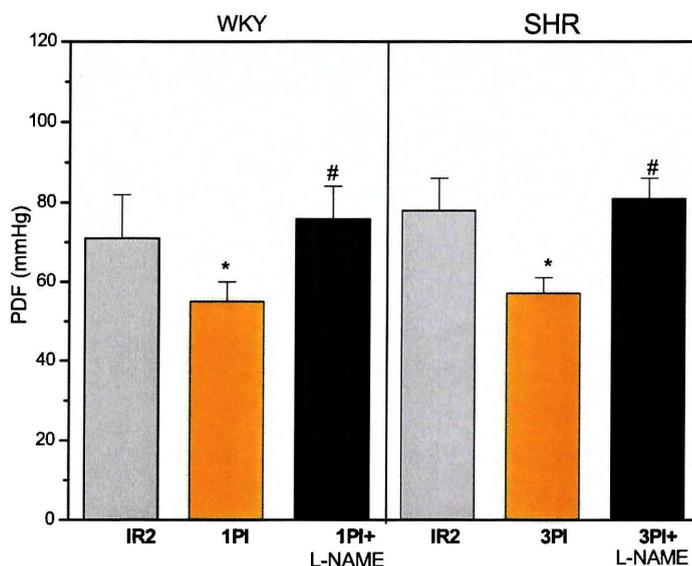
La  $+dP/dt_{\text{máx}}$  mostró un patrón de recuperación similar a la PD. En el grupo 1PI+L-NAME de las WKY este parámetro fue de  $4 \pm 2$  %, mostrándose similar al obtenido en el grupo 1PI ( $6,4 \pm 1,5$  %). En cambio, en las SHR en el grupo 3PI+L-NAME se obtuvieron valores significativamente menores a los obtenidos en el grupo 3PI ( $1,7 \pm 0,2$  vs  $4,8 \pm 1,0$  %) (Fig 61).



**Figura 61:** Presión desarrollada (PD) y máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo ( $+dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones IR2; 1PI y 1PI+L-NAME para ratas de la cepa WKY; 3PI y 3PI+ L-NAME para ratas de la cepa SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 3PI.

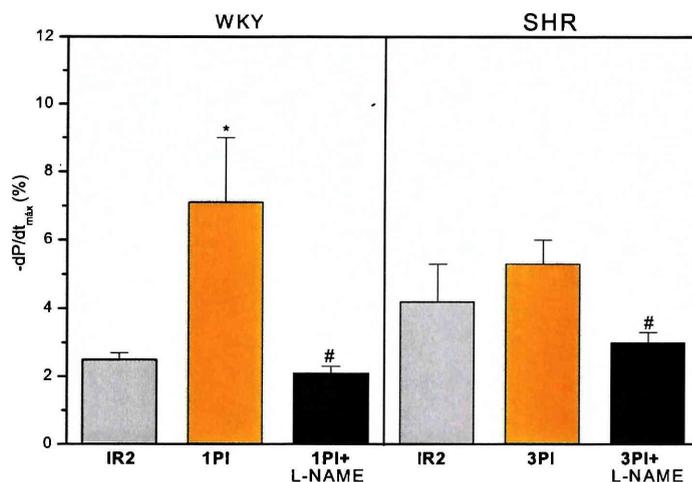
*-Función Diastólica:*

En ambas cepas de ratas la PDF al final de la reperfusión en el grupo 1PI+L-NAME alcanzó valores significativamente mayores que los obtenidos en el grupo 1PI ( $76 \pm 8$  vs  $55 \pm 5$  mmHg en WKY y  $81 \pm 5$  vs  $57 \pm 4$  mmHg en SHR) (Fig 62).



**Figura 62:** Valores de presión diastólica final (PDF) en corazones IR2; 1PI y 1PI+L-NAME de la cepa WKY; 3PI y 3PI+L-NAME de la cepa SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI o 3PI.

En los corazones preconditionados y tratados con L-NAME, los valores de la  $-dP/dt_{\text{máx}}$  fueron significativamente menores con respecto a 1PI en ambas cepas de ratas ( $2,1 \pm 0,2$  vs  $7,1 \pm 1,9$  % en ratas WKY y  $3,0 \pm 0,3$  vs  $5,3 \pm 0,7$  % en SHR) (Fig 63).



**Figura 63:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones IR2, 1PI y 1PI+L-NAME en ratas WKY y 3PI y 3PI+L-NAME en las SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI o 3PI.

En el grupo de corazones precondicionados tratados con L-NAME la presión de perfusión al final de las 2 hs de rperfusión, en ambas cepas, mostró valores significativamente mayores a los observados en los corazones precondicionados no tratados. Los valores fueron de  $136 \pm 9$  mmHg para las ratas WKY y de  $157 \pm 11$  mmHg para las SHR.

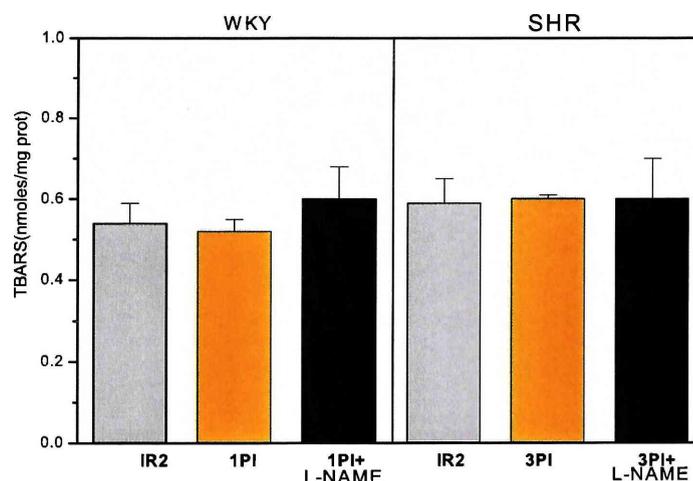
**Los resultados muestran que en ambas cepas, cuando se realizó el precondicionamiento isquémico en presencia de inhibición de las NOS con L-NAME y frente a un período de isquemia prolongado de 50 min:**

- 1- aumentó el tamaño del infarto**
- 2- disminuyó la recuperación postisquémica de la función miocárdica**

#### Determinaciones Bioquímicas:

##### *-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

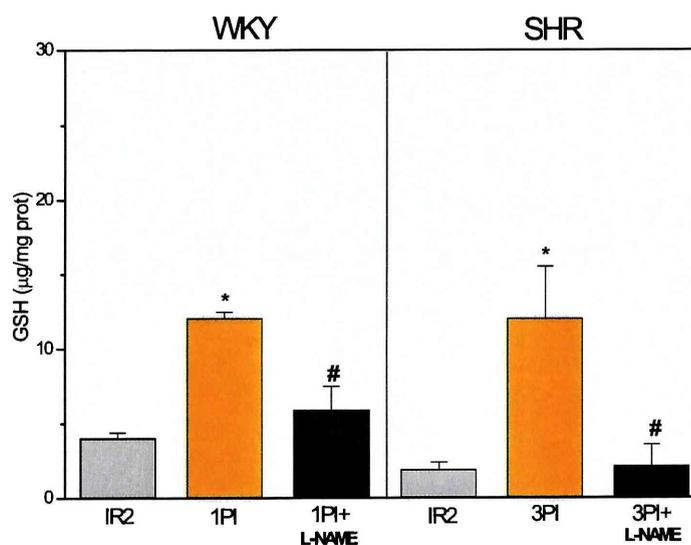
En ambas cepas de ratas el tratamiento con L-NAME no modificó los valores de TBARS siendo  $0,6 \pm 0,1$  nmoles/mg de prot (n=6) en las ratas WKY y  $0,6 \pm 0,1$  nmoles/mg de prot en SHR (n=8), (Fig 64).



**Figura 64:** Concentración de TBARS, expresadas en nmoles por mg de proteína, en los grupos IR2; 1PI y 1PI+L-NAME en WKY; 3PI y 3PI+L-NAME en SHR.

*-Glutación reducido (GSH):*

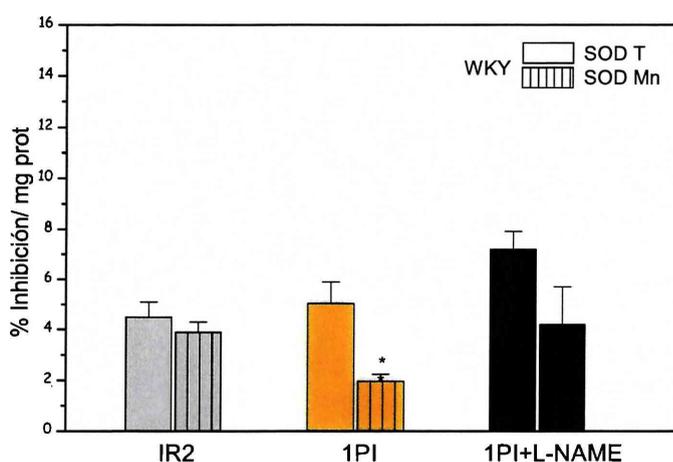
En ambas cepas la inhibición de las NOS con L-NAME, disminuyó el nivel de GSH con respecto al obtenido en los corazones precondicionados ( $5,9 \pm 1,6$  vs  $12,0 \pm 0,4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot en WKY y  $2,1 \pm 1,4$  vs  $12,0 \pm 3,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot en SHR) (Fig 65).



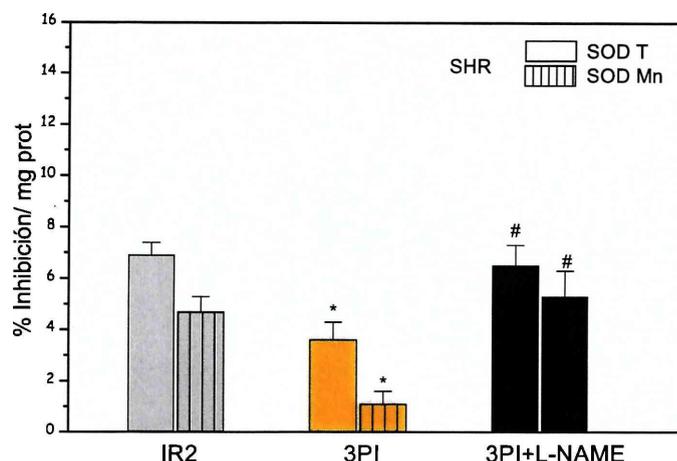
**Figura 65:** Contenido de glutación reducido (GSH) en los grupos IR2; 1PI y 1PI + L-NAME en WKY; 3PI y 3PI + L-NAME en las SHR. \* $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI y 3PI.

*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En los corazones de las ratas WKY del grupo 1PI+L-NAME la actividad citosólica de ambas enzimas fue de  $7,2 \pm 0,7$  y  $4,2 \pm 1,5$  %inh/mg prot para SODT y SODMn, respectivamente. Si bien estos valores fueron ligeramente mayores a los obtenidos en el grupo 1PI ( $5,0 \pm 0,9$  % y  $2,0 \pm 0,3$  %inh/mg prot) no alcanzaron significación estadística (Fig 66). En las SHR, el grupo 3PI+L-NAME mostró una actividad citosólica de SODT y SODMn de  $6,6 \pm 0,8$  y  $5,3 \pm 1,0$  %inh/mg prot, respectivamente. Estos valores fueron significativamente mayores a los obtenidos con 3PI ( $3,6 \pm 0,7$  y  $1,1 \pm 0,5$  %inh/mg prot) (Fig 67).



**Figura 66:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR2, 1PI y 1PI+L-NAME en ratas WKY. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.



**Figura 67:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR2, 3PI y 3PI+L-NAME en SHR.\* p < 0,05 con respecto a IR2 ; # p < 0,05 con respecto a 3PI.

**Los resultados de las determinaciones bioquímicas presentados muestran que la aplicación del preconditionamiento isquémico en presencia de la inhibición de la NOS con L-NAME y 50 min de isquemia :**

- 1- no modificó las TBARS**
- 2- disminuyó el contenido de GSH**
- 3- aumentó la actividad de las enzimas SODT y SODMn sólo en SHR.**

### **5-HIDROXIDECANOATO (5-HD): BLOQUEANTE DE LOS CANALES MITOCONDRIALES DE K<sup>+</sup> DEPENDIENTES DE ATP**

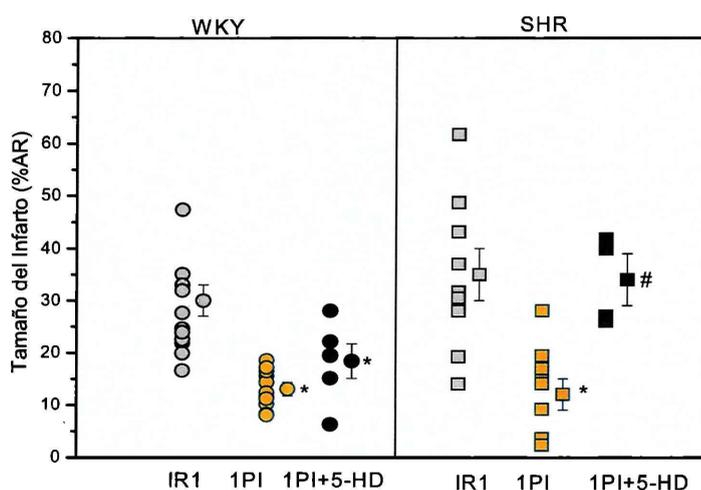
Para determinar la participación de los canales mitocondriales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP durante el preconditionamiento isquémico en los dos períodos de isquemia estudiados, se utilizó un bloqueante de dichos canales el 5-hidroxicanoato (5-HD) que fue administrado por un período de 20 min, en una dosis de 100 µM antes del período de isquemia más prolongado (ver Protocolos 4.2 y 4.4, Sección Materiales y Métodos).

## -35 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL Y 1 PI EN PRESENCIA DE 5-HD

### Tamaño del Infarto:

La Fig 68 muestra los valores individuales y los promedios del tamaño del infarto en corazones de ratas WKY y SHR pertenecientes a los grupos IR1, 1PI y 1PI tratados con 5-HD (1PI+5-HD).

En las ratas WKY, el tamaño del infarto del grupo 1PI + 5-HD no fue diferente de aquel obtenido en el grupo 1PI dando valores de  $18,4 \pm 3,3$  (n=6) vs  $13 \pm 1$  %. En cambio, en las SHR el tamaño del infarto promedio fue significativamente mayor al observado en el grupo 1PI ( $34 \pm 5$  % (n=6) vs  $12 \pm 3$  %) pero similar al obtenido en el grupo IR1 (Fig 68).



**Figura 68:** Tamaño del infarto en ambas cepas luego de los protocolos IR1, 1PI y 1PI+ 5-HD. \* p< 0,05 con respecto a IR1. # p<0,05 con respecto a 1PI.

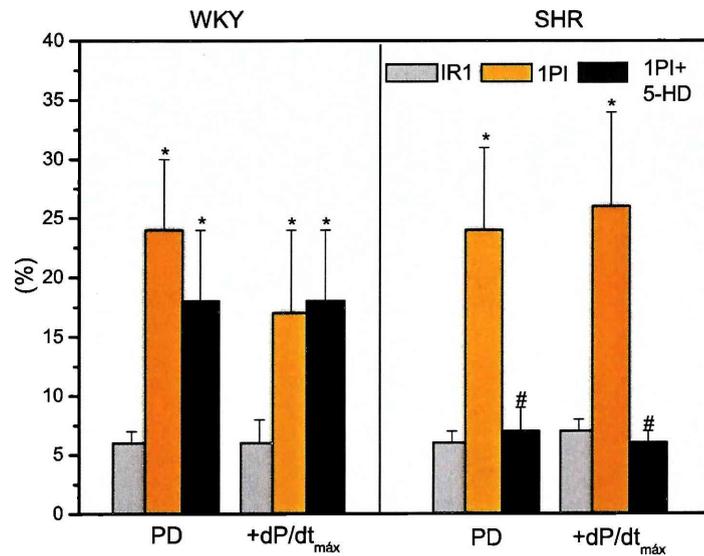
### Función miocárdica:

#### *-Función Sistólica*

En el grupo 1PI+5-HD de la cepa WKY la PD no tuvo diferencias significativas con respecto a la obtenida en el grupo 1PI ( $18 \pm 6$  % vs  $24 \pm 6$  %). En las SHR este parámetro fue de  $7 \pm 2$  %, valor significativamente menor al obtenido en 1PI ( $24 \pm 7$  %).

La  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$  mostró cambios similares a la PD. En el grupo 1PI+5-HD de la cepa WKY este parámetro fue similar ( $18 \pm 6$  % vs  $17 \pm 7$  %), mientras que en SHR fue

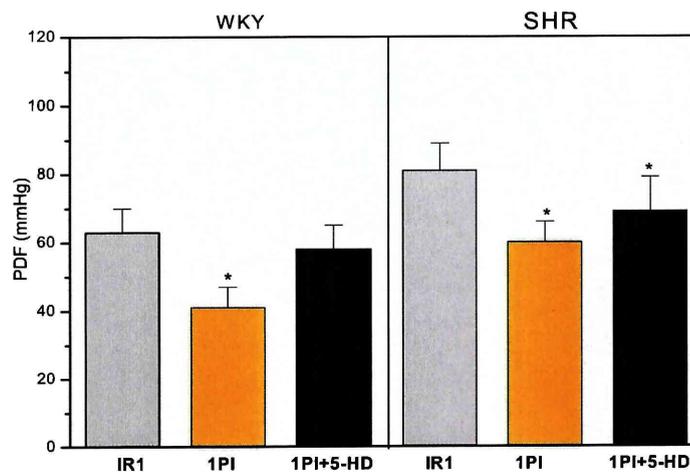
significativamente menor ( $6 \pm 1 \%$  vs  $26 \pm 8 \%$ ) comparados con los valores obtenidos en el grupo 1PI (Fig 69).



**Figura 69:** Presión desarrollada (PD) y +dP/dt<sub>máx</sub> expresadas como porcentaje de los valores preisquémicos en corazones IR1, 1PI y 1PI+ 5-HD.\* p < 0,05 con respecto a IR1. # p < 0,05 con respecto a 1PI.

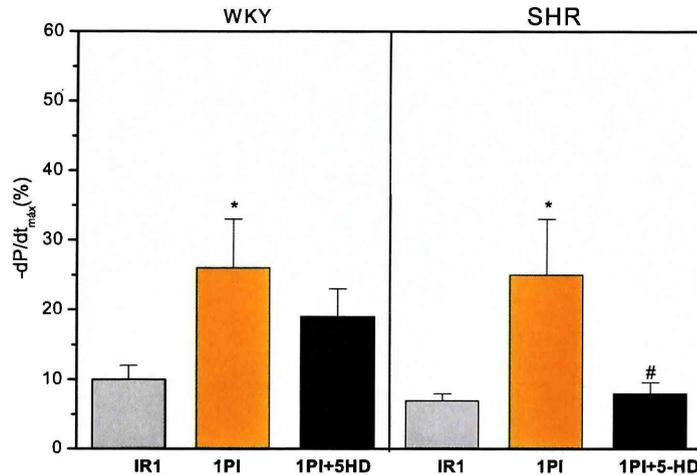
*-Función Diastólica:*

En los corazones de ambas cepas de ratas del grupo 1PI+5-HD, la PDF al final del período de reperfusión fue similar a la encontrada en el grupo 1PI ( $48 \pm 7$  vs  $41 \pm 6$  mmHg en WKY y  $69 \pm 9$  vs  $60 \pm 6$  mmHg en las SHR) (Fig 70).



**Figura 70 :** Valores de la presión diastólica final (PDF) en corazones IR1, 1PI y 1PI+5-HD. \* p < 0,05 con respecto a IR1.

La  $-dP/dt_{\text{máx}}$ , en los corazones 1PI+5-HD de las ratas WKY mostró valores similares a los del grupo 1PI ( $19 \pm 4 \%$  vs  $26 \pm 7 \%$ ), mientras que en las SHR los valores fueron significativamente menores ( $8,0 \pm 1.6 \%$  vs  $25 \pm 8 \%$ ) (Fig 71).



**Figura 71:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones del grupo IR1, 1PI y 1PI + 5-HD en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

En los corazones de ambas cepas preacondicionados y tratados con 5-HD, la presión de perfusión mostró una tendencia a aumentar con respecto a los valores obtenidos en corazones preacondicionados no tratados, pero no alcanzaron significación estadística. Al término de la reperfusión los valores fueron de  $122 \pm 13$  mmHg en las ratas WKY y de  $121 \pm 14$  mmHg en las SHR.

**Los resultados obtenidos muestran que cuando se realizó un período de isquemia global de 35 min y 2 hs de reperfusión, la aplicación del PI en presencia de la inhibición de los canales**

**mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP con 5-HD sólo en SHR:**

**1- aumentó el tamaño del infarto**

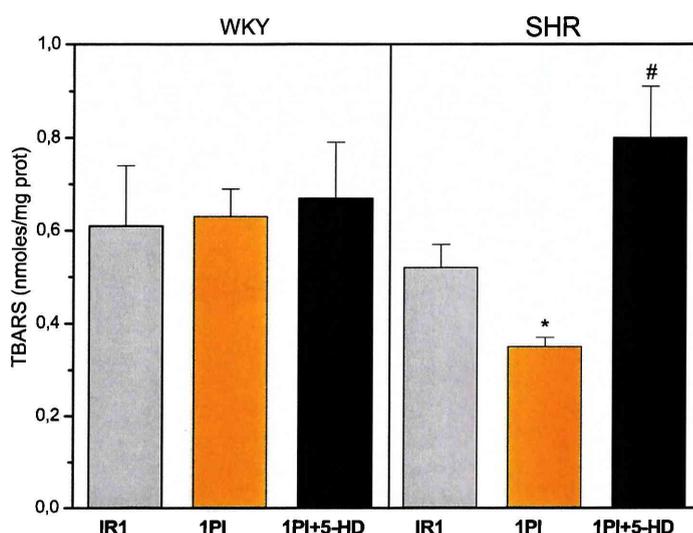
**2- empeoró la recuperación postisquémica de la función miocárdica.**

### Determinaciones Bioquímicas:

#### *-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

La concentración de TBARS en los corazones de las WKY del grupo 1PI+5-HD fue similar a la obtenida en los corazones 1PI dando valores de  $0,67 \pm 0,12$  (n=6) vs  $0,63 \pm 0,06$  nmoles/mg de prot.

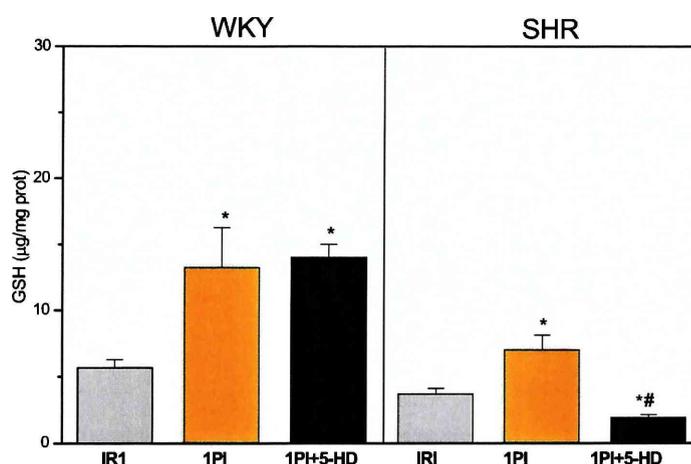
En las SHR la concentración de TBARS de los corazones 1PI+5-HD fue significativamente mayor a la obtenida en 1PI alcanzando valores de  $0,70 \pm 0,11$  (n=8) vs  $0,35 \pm 0,02$  nmoles/mg de prot, (Fig 72).



**Figura 72:** Concentración de TBARS, expresadas en nmoles por mg de proteína, de los grupos IR1, 1PI y 1PI+ 5-HD en ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR1. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

#### *-Glutación reducido (GSH):*

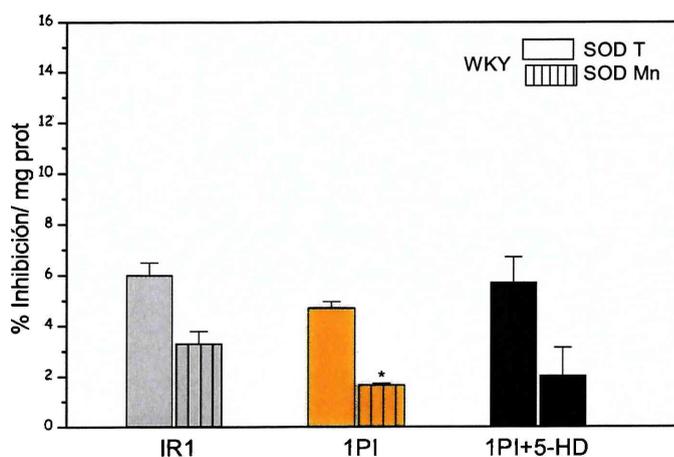
En la cepa WKY se observó que en el grupo de los corazones 1PI+5-HD los valores del GSH fueron similares a los obtenidos en el grupo 1PI ( $14,1 \pm 2,8$  vs  $13,2 \pm 3,0$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot). En la cepa SHR este parámetro fue significativamente menor al obtenido en el grupo 1PI ( $1,9 \pm 0,2$  vs  $7,0 \pm 1,1$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot) (Fig 73).



**Figura 73:** Contenido de glutatión reducido (GSH) en las dos cepas de ratas para los grupos IR1, 1 PI y 1PI+5-HD.\*p < 0,05 con respecto a IR1. # p < 0,05 con respecto a 1PI.

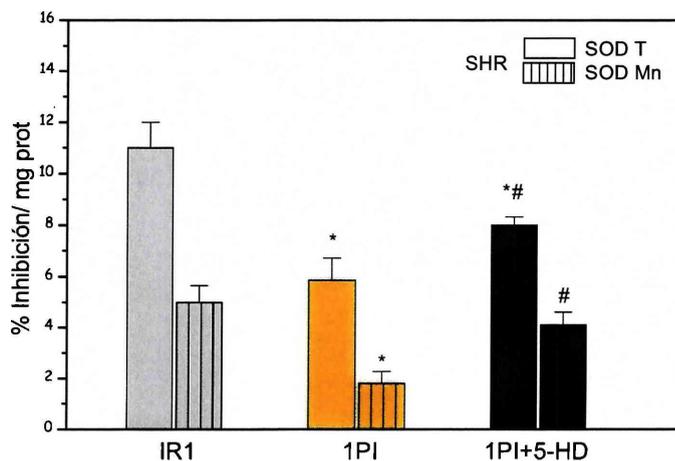
*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En los corazones de las ratas WKY del grupo 1PI+5-HD la actividad citosólica de SODT y SODMn fueron  $5,7 \pm 1,0$  %inh/mg prot y  $2,0 \pm 1,1$  %inh/mg prot, valores similares a



**Figura 74:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR1, 1PI y 1PI+5-HD en ratas WKY.\* p < 0,05 con respecto a IR1.

los obtenidos en el grupo 1P (Fig 74). En cambio en las SHR, los valores fueron significativamente mayores a los obtenidos en el grupo 1PI ( $8,0 \pm 0,3$  %inh/mg prot para la SODT y  $4,1 \pm 0,5$  %inh/mg prot para la SODMn) (Fig 75).



**Figura 75:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR1, 1PI y 1PI+ 5-HD en SHR.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR1; #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI.

**Los resultados presentados sobre las determinaciones bioquímicas indican que sólo en SHR la aplicación del PI en presencia de la inhibición de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP con 5-HD**

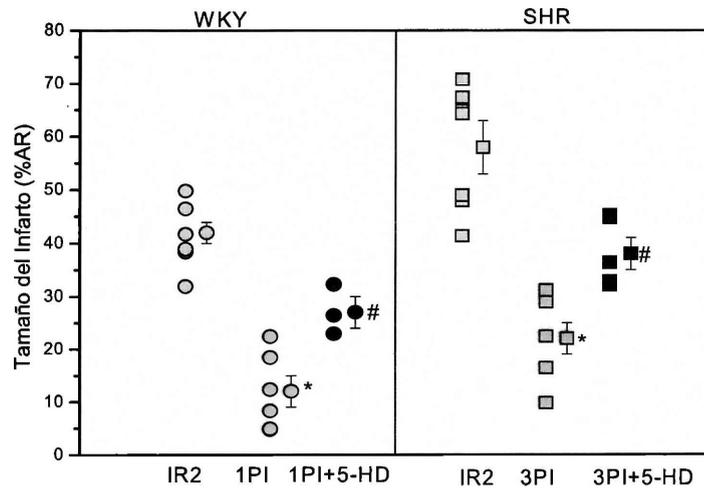
- 1- aumentó las TBARS**
- 2- disminuyó el contenido de GSH**
- 3- aumentó la actividad citosólica de las enzimas SODT y SODMn.**

### **-50 MIN DE ISQUEMIA GLOBAL: 1Y 3 PI EN PRESENCIA DE 5-HD**

#### Tamaño del Infarto:

La Fig 76 muestra los valores individuales y los promedios del tamaño del infarto en corazones de ratas WKY y SHR pertenecientes a los grupos IR2, 1PI en ratas WKY, 3PI en SHR y ambos PI tratados con 5-HD.

En ambas cepas, el tratamiento con 5-HD aumentó significativamente el tamaño del infarto obtenido en corazones precondicionados y los valores obtenidos fueron  $27 \pm 3$  (n=5) vs  $12 \pm 3$  % en WKY y  $38 \pm 3$  (n=7) vs  $22 \pm 4$  % en SHR.

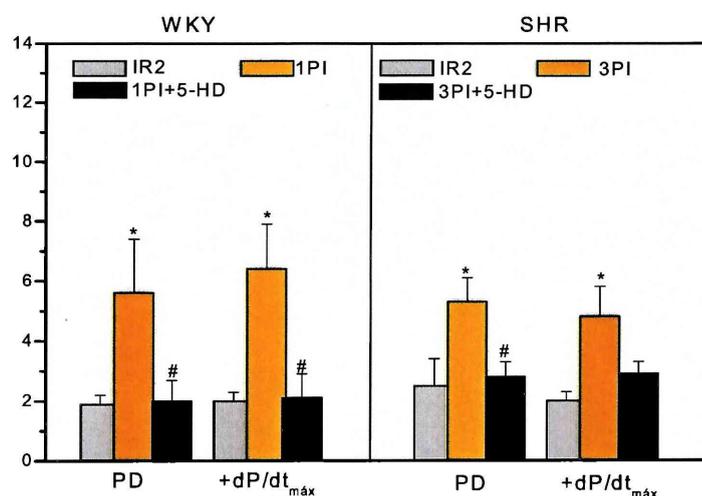


**Figura 76:** Tamaño del infarto en los grupos IR2, 1PI y 1PI+ 5-HD en las ratas WKY y 3PI y 3PI+ 5-HD en las SHR. \* p< 0,05 con respecto a IR2. # p< 0,05 con respecto a 1PI y 3PI.

### Función miocárdica:

#### *-Función Sistólica*

La recuperación de la contractilidad en presencia del inhibidor de los canales mitocondriales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP, disminuyó significativamente con respecto a la obtenida en corazones precondicionados, en ambas cepas estudiadas (Fig 77).

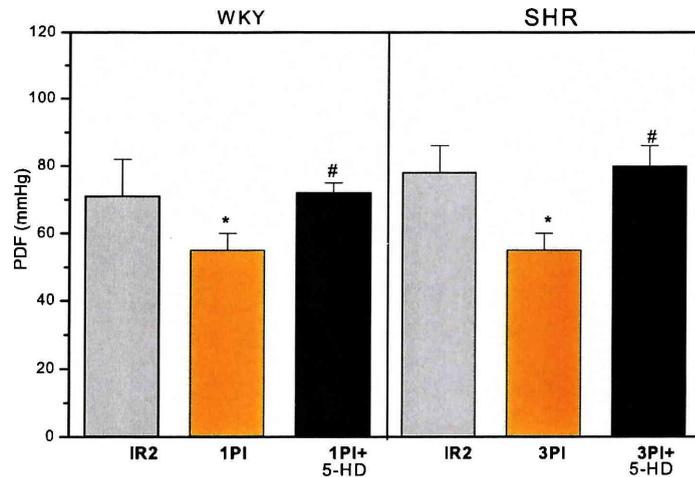


**Figura 77:** Presión desarrollada (PD) y  $+dP/dt_{máx}$  expresadas como porcentaje de los valores preisquémicos en corazones IR2, 1PI y 1PI+ 5-HD en ratas WKY; IR2, 3PI y 3PI+ 5-HD en SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 1PI y 3PI.

Los valores de PD y  $+dP/dt_{máx}$ , al final de la reperfusión fueron de  $2,0 \pm 0,7$  % y  $2,1 \pm 0,8$  % para WKY y de  $2,8 \pm 0,5$  % y  $2,9 \pm 0,4$  % para SHR (Fig 77).

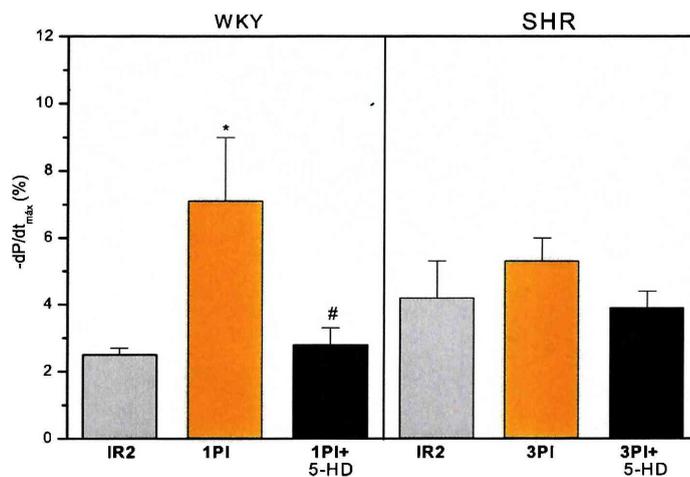
**-Función Diastólica:**

La PDF medida al final de la reperfusión en los corazones de ratas WKY del grupo 1PI+5-HD fue de  $72 \pm 3$  mmHg, valor significativamente mayor al observado en el grupo 1PI ( $55 \pm 5$  mmHg). En las SHR el patrón fue similar. La PDF en el grupo 3PI+5-HD alcanzó un valor significativamente mayor que el obtenido con 3PI ( $80 \pm 6$  vs  $57 \pm 4$  mmHg) (Fig 78).



**Figura 78:** Valores de presión diastólica final (PDF) en corazones de los grupos IR2, 1PI y 1PI + 5-HD en ratas WKY y corazones IR2, 3PI y 3PI+ 5-HD en las SHR. \* p< 0,05 con respecto a IR2. # p< 0,05 con respecto a 1PI y 3PI.

La  $-dP/dt_{\text{máx}}$  en el grupo 1PI+5-HD de las ratas WKY mostró valores significativamente menores que los observados en el grupo 1PI ( $2,8 \pm 0,5 \%$  vs  $7,1 \pm 1,9 \%$ ). En SHR, este parámetro mostró una tendencia a disminuir pero no alcanzó significación estadística ( $3,9 \pm 0,5$  vs  $5,3 \pm 0,7 \%$ ) (Fig 79).



**Figura 79:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones de los grupos IR2, 1PI y 1PI + 5-HD en ratas WKY y de IR2, 3PI y 3PI + 5-HD en ratas SHR. \* p< 0,05 con respecto a IR2. # p< 0,05 con respecto a 1PI o 3PI.

En ambas cepas de ratas, la presión de perfusión (PP) en el grupo tratado con 5-HD mostró una tendencia a aumentar con respecto a lo observado en el grupo preacondicionado sin tratamiento, pero este cambio no alcanzó significación estadística. Al final de la reperfusión los valores de la PP fueron de  $126 \pm 10$  mmHg en las ratas WKY y de  $138 \pm 10$  mmHg en las SHR.

**En ambas cepas cuando se realizó un período de isquemia global de 50 min y 2 hs dereperfusión, en ambas cepas la aplicación del PI en presencia de la inhibición de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP con 5-HD:**

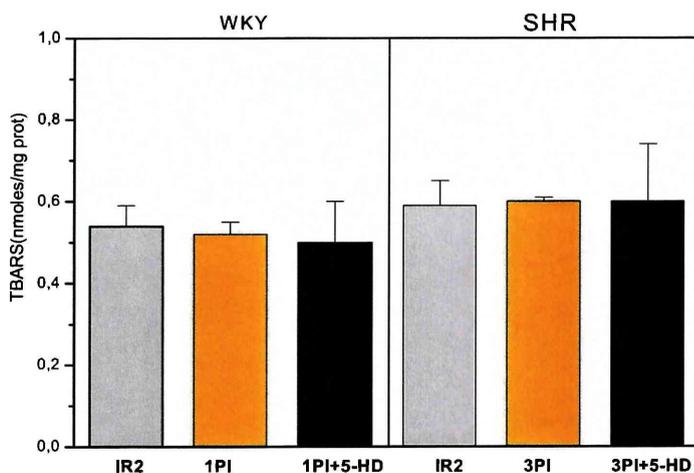
**1- aumentó el tamaño del infarto**

**2- disminuyó la recuperación postisquémica de la función miocárdica.**

#### Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

La concentración de TBARS del grupo 1PI+5-HD de las ratas WKY fue de  $0,50 \pm 0,10$  nmoles/mg de prot (n=7), valor similar al obtenido en el grupo 1PI ( $0,52 \pm 0,03$  nmoles/mg de prot) (Fig 80).

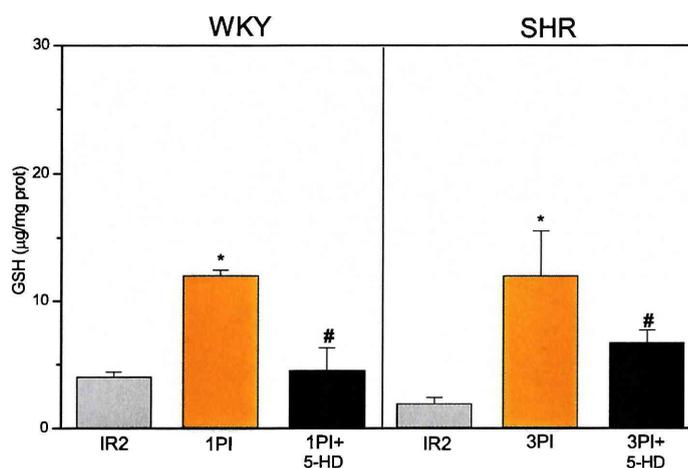


**Figura 80:** Concentración de TBARS, expresadas en nmoles por mg de proteína, en los grupos IR2, 1PI y 1PI + 5-HD en las ratas WKY; IR2, 3PI y 3PI+ 5-HD en las SHR.

En las SHR las TBARS de los corazones 3PI+5-HD tampoco mostraron diferencias significativas con respecto a los valores obtenidos en el grupo 3PI alcanzando valores de  $0,6 \pm 0,11$  (n=8) vs  $0,6 \pm 0,1$  nmoles/mg de prot, (Fig 80).

*-Glutación reducido (GSH):*

En ambas cepas de ratas, la presencia de 5-Hd en el preacocondicionamiento, disminuyó significativamente la concentración de GSH respecto a los corazones preacondicionados.



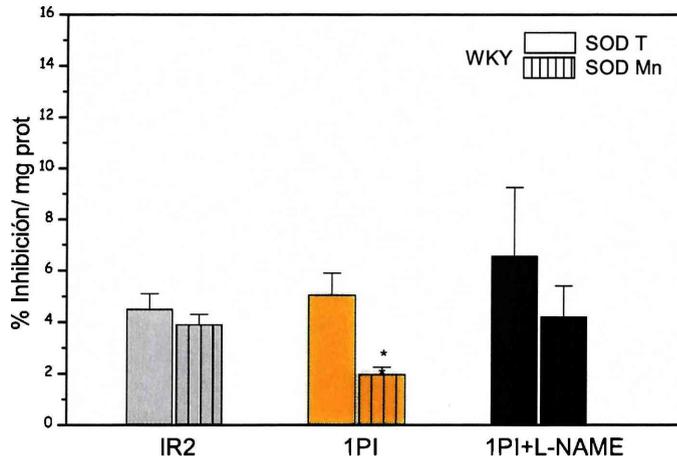
**Figura 81:** Contenido de glutación reducido (GSH) en los grupos IR2, 1 PI y 1PI+ 5-HD en las ratas WKY; IR2, 3PI y 3PI+ 5-HD en las SHR. \* p < 0,05 con respecto a IR2. # p < 0,05 con respecto a 1PI y 3PI.

Los niveles observados fueron  $4,5 \pm 1,8$  µg/mg prot en las WKY y  $6,7 \pm 1,0$  µg/mg prot en SHR (Fig 81).

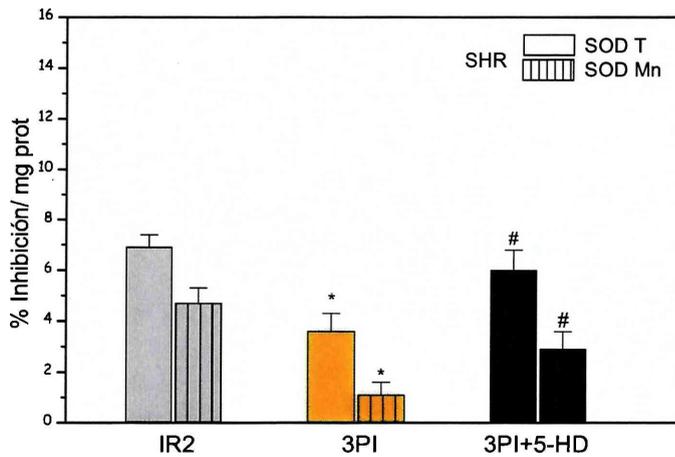
*-Enzima superóxido dismutasa (SOD):*

En las ratas WKY del grupo 1PI+ 5-HD la actividad citosólica de SODT y SODMn tendieron a aumentar con respecto a los valores obtenidos en el grupo 1PI pero no alcanzaron significación estadística. Los valores fueron de  $6,5 \pm 2,7$  y  $4,2 \pm 1,2$  %inh/mg prot para SODT y SODMn respectivamente (Fig 82).

En los corazones 3PI+5-HD de las SHR la actividad citosólica de SODT y SODMn fue de  $6,0 \pm 0,8$  y  $2,9 \pm 0,7$  %inh/mg prot, valores que fueron significativamente mayores a los obtenidos en el grupo 3PI ( $3,6 \pm 0,7$  y  $1,1 \pm 0,5$  %inh/mg prot) (Fig 83).



**Figura 82:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR2, 1PI y 1PI+ 5-HD en ratas WKY.\*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.



**Figura 83:** Actividad citosólica de SOD total (SODT) y de SODMn, expresadas como porcentaje de inhibición por mg de proteína, en corazones de los grupos IR2, 3PI y 3PI+ 5-HD en SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  con respecto a 3PI.

Los resultados de las determinaciones bioquímicas indican que la aplicación del PI en presencia de la inhibición de los canales mitocondriales de K<sup>+</sup> dependientes de ATP con 5-HD:

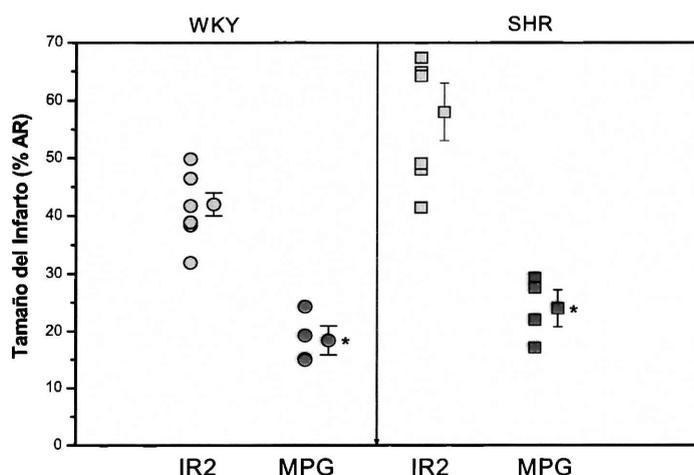
- 1- no modificó las TBARS en ambas cepas
- 2- disminuyó el contenido de GSH en ambas cepas
- 3- aumentó la actividad citosólica de SODT y SODMn sólo en SHR.

### N-(2-MERCAPTOPROPIONIL) GLICINA (MPG): ATRAPANTE DE ROS.

Para determinar la participación de ROS en el proceso de isquemia-reperfusión se utilizó el tratamiento con MPG en una dosis de 2 mM 10 min antes de comenzar el período de isquemia de 50 min y durante los primeros 10 min de la reperfusión.

#### Tamaño del Infarto:

La Fig 84 muestra los valores individuales y los promedios de los tamaños del infarto en corazones de ratas WKY y SHR tratados con MPG y sometidos a isquemia global de 50 min y 2 hs de reperfusión (IR2). En ambas cepas este parámetro disminuyó significativamente con respecto a los grupos IR2, siendo en las WKY  $18 \pm 2 \%$  (n=5) vs  $42 \pm 2 \%$  y en las SHR de  $24 \pm 3 \%$  (n=6) vs  $58 \pm 5 \%$ .

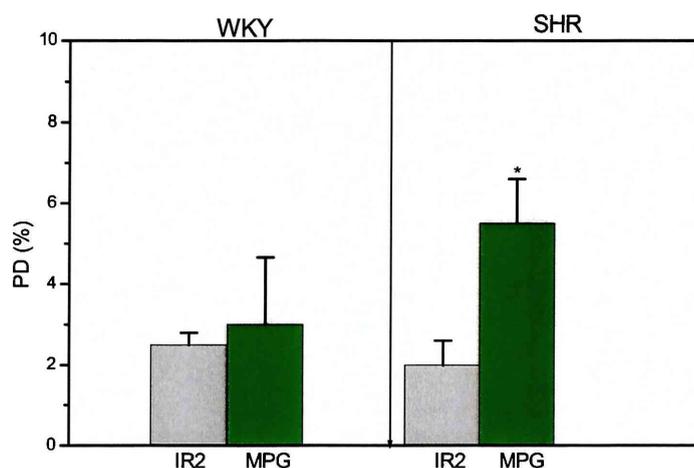


**Figura 84:** Tamaño del infarto en los grupos IR2 y tratados con MPG en las ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

## Función miocárdica

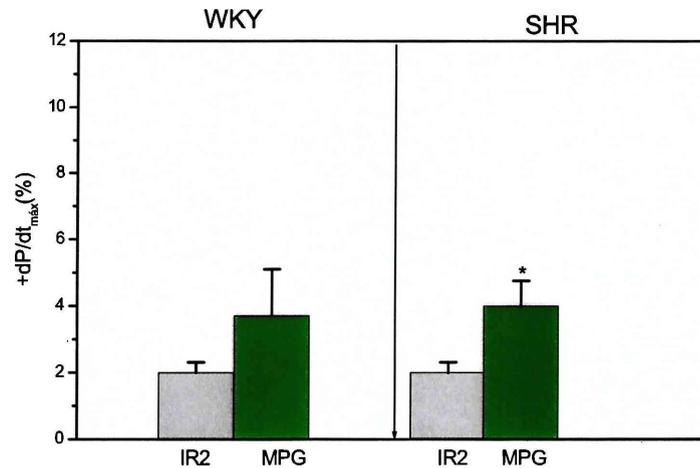
### *-Función Sistólica*

La PD del grupo tratado con MPG en las ratas WKY fue de  $3,0 \pm 1,6$  %, valor similar al encontrado en el grupo IR2 ( $1,9 \pm 0,3$  %). En cambio, en las SHR los corazones mostraron una PD que fue significativamente mayor a la obtenida en el grupo IR2, ( $5,5 \pm 1,0$  % vs  $2,5 \pm 0,9$  %) (Fig 85).



**Figura: 85:** Presión desarrollada (PD) en corazones IR2 y tratados con MPG. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

En el grupo MPG la  $+dP/dt_{m\acute{a}x}$  de las WKY fue de  $3,7 \pm 1,4$  %, valor ligeramente mayor pero no significativamente diferente al obtenido en el grupo IR2 ( $2,0 \pm 0,3$  %).



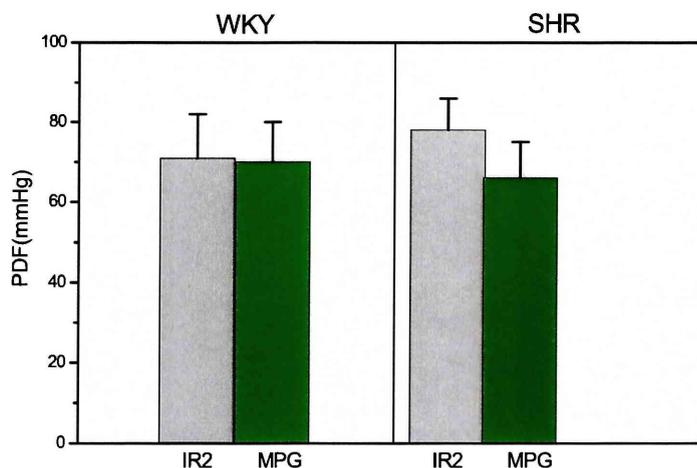
**Figura 86:** Valores de la máxima velocidad de desarrollo de la presión del ventrículo izquierdo (+dP/dt<sub>máx</sub>) en corazones IR2 y tratados con MPG. \* p < 0,05 con respecto a IR2.

En cambio, en las SHR se obtuvieron valores significativamente mayores a los obtenidos en el grupo IR2 (3,9 ± 0,7 vs 2,0 ± 0,3 %) (Fig 86).

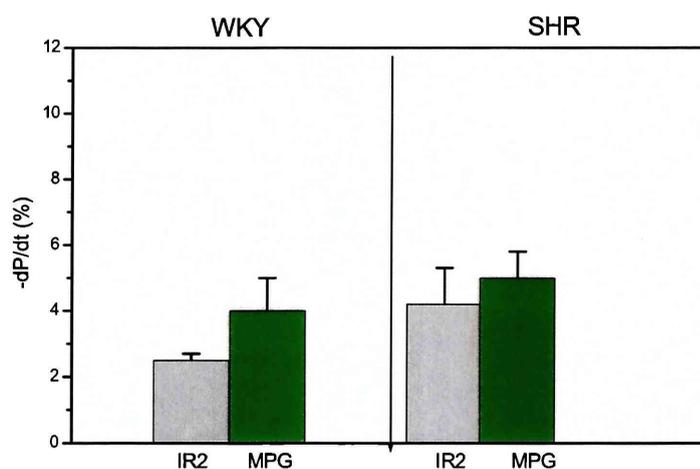
**-Función Diastólica:**

La PDF al final de la reperfusión en los grupos MPG de ambas cepas de ratas fue similar a IR2, siendo en las WKY de 70 ± 10 mmHg y en las SHR de 66 ± 9 mmHg. (Fig 87).

En los corazones tratados con MPG, los valores de la -dP/dt<sub>máx</sub> fueron similares con respecto a los valores obtenidos en los grupos IR2 en ambas cepas de ratas (4,0 ± 1,0 vs 2,5 ± 0,2 % en WKY y 4,9 ± 0,8 vs 4,2 ± 1,1 % en SHR) (Fig 88).



**Figura 87:** Valores de presión diastólica final (PDF) en ambas cepas estudiadas de corazones IR2 y tratados con MPG.



**Figura 88:** Máxima velocidad de caída de la presión ( $-dP/dt_{\text{máx}}$ ) en corazones IR2 y tratados con MPG en ratas WKY y SHR.

En el grupo de corazones tratados con MPG la presión de perfusión (PP) al final de las 2 hs de reperfusión, mostró en las ratas WKY valores significativamente mayores a los observados en los corazones IR2 ( $125 \pm 18$  mmHg). Sin embargo, en las SHR la PP tendió a ser menor pero no alcanzó significación estadística ( $122 \pm 16$  vs  $139 \pm 13$  mmHg en IR2).

**Cuando se realizó el tratamiento con MPG en presencia de isquemia global de 50 min:**

**1- disminuyó el tamaño del infarto en ambas cepas**

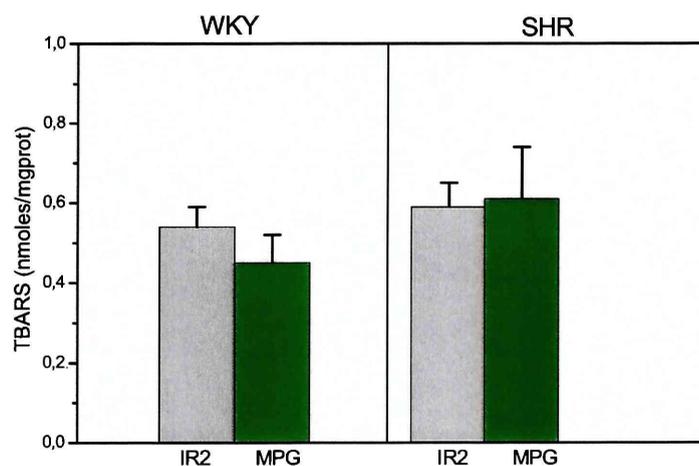
**2- aumentó la función sistólica en las SHR**

**3- no cambió la función distólica en ambas cepas.**

#### Determinaciones Bioquímicas:

*-Sustancias reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS):*

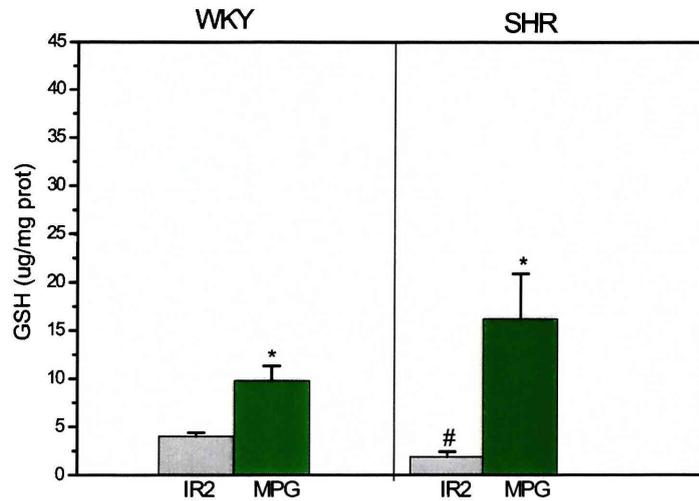
La concentración de las TBARS del grupo tratado con MPG en ambas cepas fue similar a la encontrada en los respectivos grupos IR2. En las ratas WKY fue de  $0,45 \pm 0,07$  nmoles/mg de prot (n=7) y en las SHR de  $0,61 \pm 0,13$  nmoles/mg de prot (n=7), (Fig 89).



**Figura 89:** Concentración de TBARS, expresadas en nmoles por mg de proteína, en los grupos IR2 y tratados con MPG en las ratas WKY y SHR.

*-Glutación reducido (GSH):*

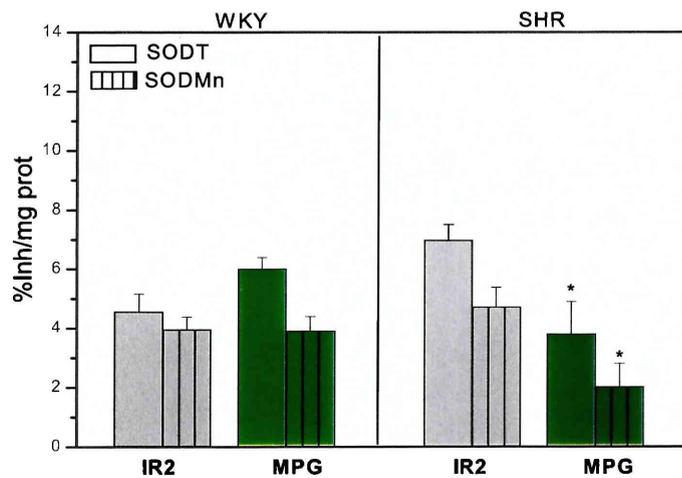
Los valores de GSH obtenidos en el grupo MPG de ambas cepas de ratas fueron significativamente mayores a los observados en los grupos IR2 (Fig 90). En las ratas WKY fueron de  $9,8 \pm 1,5$  vs  $4,0 \pm 0,4$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot y en las SHR  $16,2 \pm 4,7$  vs  $1,9 \pm 0,5$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  prot.



**Figura 90:** Contenido de glutatión reducido (GSH), expresado en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  de proteína, en WKY y SHR de los grupos IR2 y MPG. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2. #  $p < 0,05$  SHR vs WKY.

**-Enzima superóxido dismutasa (SOD):**

En las ratas WKY la actividad citosólica de SODT y SODMn fue similar a la obtenida en el grupo IR2 ( $6,0 \pm 0,4$  y  $3,9 \pm 0,5$  %inh/mg prot), mientras que en las SHR los valores



**Figura 91:** Actividad citosólica de las enzimas SOD total (SODT) y SODMn en los grupos IR2 y MPG en las ratas WKY y SHR. \*  $p < 0,05$  con respecto a IR2.

de ambas enzimas fueron significativamente menores a los obtenidos en el grupo IR2 ( $3,8 \pm 1,1$  y  $2,0 \pm 0,8$  %inh/mg prot para SODT y SODMn, respectivamente) (Fig 91).

---

**Los resultados presentados sobre las determinaciones bioquímicas muestran que el tratamiento con MPG y 50 min de isquemia global:**

**1- no modificó las TBARS en ninguna de las cepas**

**2- aumentó el contenido de GSH en ambas cepas**

**3- disminuyó la actividad citosólica de SODT y SODMn sólo en SHR.**

---

## DISCUSIÓN

Aunque la restauración del flujo sanguíneo es un requisito para salvar a la célula miocárdica, la reperfusión en sí misma puede acelerar o adicionar injuria a la ya generada por la isquemia. Esto es lo que se conoce como "injuria por reperfusión", caracterizada por la presencia de arritmias, disminución transitoria de la contractilidad (injuria reversible: atontamiento) e infarto miocárdico (injuria irreversible). En los estudios realizados tendientes a analizar el comportamiento de corazones hipertróficos frente a la isquemia y reperfusión, se observa una marcada disparidad en los modelos utilizados y en los resultados obtenidos. La mayor parte de ellos, basados en el comportamiento del miocardio descompensado (animales seniles), muestran una aumentada susceptibilidad al daño por isquemia y/o reperfusión (Snoeckx y col, 1986; Snoeckx y col, 1993; Allard y col, 1994; Wexler, 1998). Los resultados no son tan concluyentes cuando son estudiados corazones con moderada hipertrofia (animales adultos), encontrándose en algunos casos disminuída (Grover y col, 1996; Haneda y col, 1986) y en otros una similar (Hoffmeister y col, 1998) recuperación postisquémica con respecto a corazones de ratas normotróficas. Sin embargo, existen muy pocos estudios en los cuales se evalúa el tamaño del infarto como punto final de daño por isquemia-reperfusión en corazones hipertróficos. En dichos estudios se observa un tamaño de infarto mayor en animales hipertróficos, no quedando claro si es el aumento de presión ó la hipertrofia el factor determinate de la injuria irreversible (Koyanagi y col, 1982; Inou y col, 1987). Existen estudios en modelos de infarto "ex vivo" (Ebrahim y col, 2007) e "in vivo" (Speechly-Dick y col, 1994) en los cuales el tamaño del infarto fue similar entre ratas hipertensas DOCA-sal y normotensas. En nuestras condiciones experimentales y usando ratas hipertensas espontáneas (SHR), los resultados obtenidos están de acuerdo con las investigaciones mencionadas, aparentemente contradictorias. Por ello es que el primer hallazgo de este trabajo es la demostración que la respuesta de las SHR adultas jóvenes a la isquemia-reperfusión depende de la duración de la isquemia. Es así que se observa que frente a un período de isquemia global de 35 min el tamaño del infarto y la recuperación postisquémica de la función miocárdica fueron similares a las observadas en las ratas normotensas de la misma edad. En cambio, cuando el período isquémico se prolongó a 50 min, el tamaño del

---

infarto de las SHR fue significativamente mayor que el obtenido en ratas normotensas. En cuanto a la función miocárdica la recuperación postisquémica de la contractilidad fue escasa con valores muy cercanos a cero y similar en las dos cepas.

La abrupta producción de las ROS que ocurre en los primeros minutos de la reperfusión es uno de los factores involucrados en los daños ocasionados por la isquemia y reperfusión (Bolli y col, 1989; Zweier y col, 1987; Ambrosio y col, 1991). Si bien los mecanismos responsables de la injuria por las ROS no se conocen claramente, trabajos recientes focalizan la acción a nivel mitocondrial siendo las ROS uno de los principales responsables de la formación y apertura del mPTP (Kanno y col, 2004). Recordemos que a través de este poro tiene lugar la liberación hacia el citosol de sustancias contenidas en la matriz mitocondrial. Es así que la detección de actividad en el citosol de una de las enzimas intramitocondriales, la SODMn, puede ser usada como indicador de la apertura del mPTP (Jin y col, 2005). Datos obtenidos en este trabajo muestran que luego de la isquemia-reperfusión la actividad citosólica de SODMn aumentó, sugiriendo que en nuestras condiciones experimentales tiene lugar la formación del mPTP. Es importante resaltar que este aumento fue significativamente mayor en los corazones hipertróficos de las SHR que en WKY con la isquemia de 35 min, mostrando una escasa diferencia cuando la isquemia se extendió a 50 min.

No menos importante es el aumento de la actividad de la SODT que en SHR y en los dos períodos de isquemia estudiados, fue mayor en comparación con los valores obtenidos en WKY. El incremento mayor de este parámetro obtenido en la isquemia de 35 min estaría indicando la participación activa de la enzima citosólica SODCu/Zn además de la SODMn. En nuestro caso la activación de estas enzimas actuarían como mecanismo de defensa de la célula miocárdica para atenuar el estrés oxidativo consecuente a la probable mayor producción de las ROS.

Con respecto al sistema antioxidante GSH, nuestros datos muestran que los corazones controles (no sometidos a isquemia-reperfusión) de las SHR presentan un menor contenido de GSH en comparación con los corazones de ratas normotensas. Estos resultados ponen en evidencia el mayor estrés oxidativo presente en los corazones hipertróficos y están de acuerdo con investigaciones previas (Schackenberg y Wilcox, 1999; Sawyer y col, 2002). Cuando ambas cepas fueron sometidas a isquemia-reperfusión

---

los niveles de GSH de las SHR también fueron menores a los hallados en WKY y esta diferencia se mantuvo cuando el período de isquemia se prolongó. Este resultado se correlaciona con el mayor tamaño del infarto obtenido en SHR con la isquemia de 50 min. O sea, que la disminución del GSH en SHR con la isquemia sugiere una mayor producción de las ROS en las SHR como causa de la muerte celular estando avalada esta hipótesis por mayor peroxidación lipídica obtenida en los corazones hipertróficos. Esta relación no es siempre clara ya que en trabajos previos se mostró que la sobreexpresión de enzimas antioxidantes no mejora el daño miocárdico por isquemia-reperfusión (Jones y col, 2003).

En WKY también el GSH disminuyó y esta deficiencia puede ser la causa del daño obtenido en esta cepa, estando de acuerdo con estudios previos (Leichtweis y Ji, 2001). El mecanismo de protección endógena, conocido con el nombre de "preacondicionamiento isquémico" ejerció un efecto beneficioso en ambas cepas de ratas pero con algunas consideraciones. Cuando la isquemia prolongada fue de 35 min la aplicación de un sólo ciclo preacondicionante fue suficiente para disminuir el daño miocárdico producido por la isquemia-reperfusión tanto en WKY como en SHR. Los corazones preacondicionados presentaron un tamaño del infarto menor y una recuperación postisquémica de la función miocárdica mayor que lo observado en corazones no preacondicionados. Sin embargo, lo que resultó un hallazgo interesante de nuestro estudio fue que un sólo ciclo de isquemia-reperfusión no fue suficiente para proteger al miocardio hipertrófico de las SHR cuando el período isquémico se prolongó hasta 50 min. En estas condiciones fue necesaria la aplicación de 3 ciclos para lograr efecto protector. En cambio, en las WKY un sólo ciclo preacondicionante alcanzó para disminuir el tamaño del infarto y mejorar la función miocárdica postisquémica cuando las isquemias fueron de 35 y 50 min. Es de hacer notar también que la aplicación de 1 ó 3 ciclos preacondicionantes otorgó similar protección en la cepa normotensa. Nuestros resultados están de acuerdo con estudios previos que muestran que los corazones con hipertrofia ventricular izquierda pueden ser preacondicionados (Speechly-Dick y col, 1994; Pantos y col, 1996; Butler y col, 1999; Randall y col, 1997; Boutros y Wang, 1995; Rajesh y col, 2004; Ebrahim y col, 2007). Sin embargo, en algunos de estos estudios se encuentran discrepancias asociadas a la edad de los animales usados. Existen datos que avalan la pérdida (Ebrahim y col, 2007) y la conservación del PI con el envejecimiento (Dai y col. 2009). En este trabajo de tesis no

---

evaluamos el factor edad pero aún así encontramos que, en animales adultos jóvenes, la duración de la isquemia aparece como un factor capaz de modificar la respuesta del miocardio hipertrófico al PI.

Los mecanismos involucrados en la protección otorgada por el PI no están totalmente aclarados. Trabajos recientes proponen una teoría del PI que comienza con la fase llamada "trigger" que ocurre en los ciclos precondicionantes de isquemia-reperfusión y que consiste en la aparición de ligandos cardioprotectores. La interacción de dichos ligandos con receptores de membrana lleva a la activación de distintas quinasas, entre las cuales la PKC cumple un rol importante (Liu y col, 1994; Yellon y col, 1998). Si bien en este trabajo no examinamos el papel de la PKC sobre el tamaño del infarto, en resultados de nuestro laboratorio recientemente publicados demostramos que el bloqueo de la PKC anula el efecto protector del PI en las ratas WKY y SHR (Fantinelli y Mosca, 2007a).

Las distintas quinasas activadas por el PI promueven la activación de vías de señalización que involucran al NO (Rakhit y col, 1999) y a los canales de K<sup>+</sup>-dependientes de ATP del sarcolema (Sukhodub y col, 2007) y de la mitocondria (Matejíková y col, 2009). Según trabajos recientes el efector final de la protección sería el mPTP, disminuyendo su formación durante el PI (Clarke y col, 2008; Hausenloy y col, 2004).

Un hallazgo importante de este trabajo es que los corazones precondicionados de ambas cepas de ratas (SHR y WKY) mostraron una menor actividad citosólica de SODMn en ambos períodos isquémicos comparado con los corazones no precondicionados. Estos resultados sugieren que el efecto protector del PI estaría asociado a una menor apertura del mPTP. Similares resultados fueron hallados recientemente en animales normotensos, en los cuales la liberación de SODMn producida por la isquemia-reperfusión fue prevenida por el PI y también por la administración de ciclosporina A, un inhibidor de la formación del mPTP (Jin y col, 2005).

¿Qué sucede con el estrés oxidativo en corazones precondicionados?. En ambas cepas y en los dos períodos de isquemia utilizados, los corazones precondicionados presentaron contenidos de GSH mayores a los obtenidos en los no precondicionados. Sin embargo, el PI provocó una disminución significativa de la peroxidación lipídica sólo en los corazones hipertróficos cuando la isquemia aplicada fue de 35 min. Esto significa que el aumento del sistema antioxidante GSH fue suficiente en las SHR para contrarrestar la

---

producción de las ROS durante la reperfusión y disminuir así el estrés oxidativo. Por lo tanto, la protección dada por el PI en los corazones hipertróficos se correlaciona con un menor daño oxidativo, el cual podría estar asociado a una menor apertura del mPTP, coincidente con lo observado en animales normotensos por Clarke y col (2008). La misma correlación se daría en las ratas WKY, a pesar de que las TBARS no disminuyeron significativamente. Esta aparente discrepancia podría explicarse recordando que el estrés oxidativo depende del balance entre producción y remoción de las ROS. Asumiendo una similar producción de las ROS en ambas cepas de ratas y teniendo los corazones preacondicionados de las ratas WKY un mayor contenido de GSH, el daño oxidativo podría mantenerse igual o ser aún menor que en los corazones no preacondicionados. Por lo tanto, la atenuación del estrés oxidativo es un factor que contribuye a la protección del PI en ambas cepas de ratas.

El papel del NO en la injuria por isquemia-reperfusión es todavía confuso. Trabajos recientes muestran que el NO ejerce una acción cardioprotectora (Jugdutt, 2002; Yan y col, 2001; Cohen y col, 2006) mientras que otros señalan que contribuye a un aumento del daño miocárdico (Kojda y Harrison, 1999; O'Donnell y Freeman, 2001). Aún en un mismo modelo experimental, el rol del NO en mediar los efectos cardioprotectores es controvertido. Por ej. se observó que la disminución del tamaño del infarto inducida por el preacondicionamiento farmacológico con bradiquinina era independiente de NO (Goto y col, 1995) y según otros autores el efecto era dependiente del NO (Oldenburg y col, 2004). En animales hipertensos se ha descrito que el miocardio desarrolla una mayor actividad de la óxido nítrico sintetasa (NOS) constitutiva comparado con los normotensos (Nava y col, 1995). Esto indica que el miocardio es capaz de generar mayores niveles de NO. Paralelamente se ha demostrado que en animales hipertróficos la vía del NO-GMPc podría estar alterada (Tetsuji y col, 2007). Por lo tanto, la biodisponibilidad de NO sería menor, quizás por la oxidación de dicha molécula por el anión superóxido.

En este trabajo demostramos que en las SHR, el bloqueo de la la NOS anula los efectos beneficiosos del PI en ambos protocolos de isquemia-reperfusión, observándose un aumento del tamaño del infarto y de la SODT y una disminución de GSH. Resultados similares fueron obtenidos en las ratas WKY cuando la isquemia fue de mayor duración.

---

Es decir, que el PI logra modificar el balance NO-ROS a favor del NO, lográndose los efectos beneficiosos de esta molécula.

La participación del NO también se observó en la actividad citosólica de SODMn que mostró valores elevados cuando se realizó el PI en presencia de L-NAME. Nuevamente este efecto se observó en las ratas WKY en la isquemia de mayor duración. Estos resultados indican que el NO está actuando de manera directa ó indirecta sobre el mPTP atenuando su formación y están de acuerdo con recientes investigaciones (Kim y col, 2004).

Es importante destacar que de acuerdo a nuestros resultados el NO cumpliría un papel clave como mediador del PI en corazones hipertróficos ya que aparece involucrado independientemente de la duración del período isquémico.

El bloqueo de los mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> también anuló los efectos cardioprotectores del PI en las SHR en ambos períodos isquémicos y en las WKY en el período isquémico de 50 min. Es decir, que de manera similar al NO estos canales mitocondriales parecen desempeñar un rol más importante en la protección dada por el PI a corazones hipertróficos. En lo que respecta a la reducción del tamaño del infarto, nuestros resultados están de acuerdo a lo observado en distintos modelos experimentales en animales normotensos en los cuales se destaca la participación de los mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> en el efecto cardioprotector del PI (Matejíková y col, 2009; Nishida y col, 2009; Wang y col, 2001; Yellon y col, 1998). En cuanto al estrés oxidativo, una investigación reciente realizada en conejos propone que los mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> participan activamente en el estrés oxidativo que acompaña a la injuria miocárdica postisquémica (Das y Sarkar, 2005). Nuestros datos también permiten establecer dicha relación ya que el bloqueo de los mismos provocó una disminución del GSH y un aumento de la SOD, cambios que fueron más evidentes en la cepa hipertensa. Estos resultados, junto con los obtenidos al bloquear la producción de NO nos indican que ambas entidades estarían participando de la cascada de eventos que conducen a la protección en los corazones hipertróficos. Esta hipótesis estaría de acuerdo con reconocidos efectos directos e indirectos del NO sobre el mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> descrito previamente en ratas normotensas (Ljubkovic y col, 2007).

---

¿Cuál sería el mecanismo por el cual la apertura del mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> lleva a la protección?. Se ha demostrado que la apertura de estos canales promueve la entrada de K<sup>+</sup> a la mitocondria, la cual disminuye el ingreso del Ca<sup>2+</sup> a la organela (Holmuhamedov y col, 1999; Murata y col, 2001; Wang y col, 2001) e inhibe la formación del mPTP (Javadov y col, 2003). Teniendo en cuenta estos trabajos podríamos decir que en los corazones de las SHR el NO sería el que promueve la apertura de los mitoK<sup>+</sup><sub>ATP</sub> y esto llevaría a una menor sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> de la mitocondria y a la consecuente menor apertura del mPTP. Esta hipótesis está avalada por la menor actividad de SODMn en el citosol observada en los corazones hipertróficos preacondicionados. En cambio, en las WKY esos dos intermediarios se convertirían en claves para la protección del PI en períodos isquémicos de mayor duración.

A pesar de que las ROS actúan como segundos mensajeros cuando están en bajas concentraciones como la que ocurre en los períodos cortos de isquemia de los protocolos de PI (Cohen y col, 2001; Baines y col, 1997; Facundo y col, 2006; Pain y col, 2000), a altas concentraciones son tóxicas y pueden inducir daño celular (Ambrosio y col, 1991; Kilgore y col, 1994; Kevin y col, 2003). Si bien una pequeña cantidad de dichas especies es generada durante la isquemia (Becker y col, 1999; Kevin y col, 2003), la producción mayor tiene lugar en los primeros minutos de la reperfusión (Becker, 2004; Zweier y col, 1987; Ambrosio y col, 1991).

El papel perjudicial de las ROS en isquemia-reperfusión miocárdico ha motivado la búsqueda de antioxidantes como posibles agentes terapéuticos (Bandyopadhyay y col, 2004). En muchos estudios experimentales la administración de sustancias antioxidantes resultaron ser efectivas para disminuir los daños ocasionados por isquemia-reperfusión (Ozer y col, 2005; Kutala y col, 2006; Andreadou y col, 2002; Hangaishi y col, 2001, Onogi y col, 2006; Singla y col, 2007). Recientemente Ahmet y col (2009) demostraron que una dieta enriquecida en arándanos que poseen una alta capacidad antioxidante reduce el tamaño del infarto de ratas normotensas en las cuales la lesión isquémica fue producida por ligadura coronaria. En este trabajo también se muestra que la sobrevivencia aumentada de los cardiocitos aislados de dichas ratas se debe a que el umbral de apertura del mPTP disminuyó por el tratamiento antioxidante.

---

En corazones hipertróficos de ratas con coartación de aorta abdominal previamente se demostró que el agregado de SOD y catalasa al medio de perfusión atenuó la injuria por isquemia-reperfusión en una manera similar a la obtenida en corazones controles (Kirshenbaum y Singal, 1993). Recientemente en nuestro laboratorio demostramos que el tratamiento agudo con un extracto no-alcohólico de vino tinto disminuyó el tamaño del infarto obtenido en ratas SHR (Fantinelli y Mosca, 2007b). En esta misma cepa de ratas Potenza y col (2007) demostraron que el tratamiento crónico con polifenoles con reconocida actividad antioxidante era capaz de proteger al miocardio contra la injuria postisquémica.

En esta tesis, utilizando al MPG como "scavenger" de las ROS, el tamaño del infarto en ambas cepas fue menor. Estos resultados están de acuerdo con estudios previos en los cuales se muestra que el tratamiento de animales normotensos con MPG reduce el tamaño del infarto (Beyersdorf y col, 1989; Koerner y col, 1991) y aumenta la recuperación contráctil (Myers y col, 1986). El efecto beneficioso del MPG también se tradujo en un aumento de los niveles de GSH tanto en SHR como en WKY, mientras que la SOD (SODT y SODMn) sólo disminuyó en SHR, parámetros que están indicando la menor concentración de las ROS en estas condiciones experimentales. Recordemos que aunque las NADPoxidasas, la NOS y la xantina oxidasa contribuyen a la generación de las ROS, la mitocondria es el sitio principal de producción de dichas especies. Por lo tanto, la menor concentración de ROS en el citosol sería la consecuencia y/o la causa de la menor apertura del mPTP. Estos resultados están de acuerdo con experimentos recientes realizados en animales normotensos que muestran que los efectos beneficiosos del MPG se vinculan con la preservación de la función mitocondrial (Tanonaka y col, 2003).

Es interesante destacar que en ambas cepas de ratas la protección obtenida con el MPG fue similar a la observada con el PI, por lo que podemos concluir que la atenuación del estrés oxidativo y consecuentemente la menor apertura del mPTP son un mecanismo importante para disminuir las alteraciones por isquemia-reperfusión.

---

## CONCLUSIONES

Las principales conclusiones que derivan del presente trabajo de tesis se resumen a continuación:

-La respuesta del miocardio de las ratas hipertensas espontáneas (SHR) adultas jóvenes comparada a la observada en ratas normotensas Wistar Kyoto (WKY) de la misma edad cambia según la duración de la isquemia. Cuando la isquemia fue de 35 min el tamaño del infarto de ambas cepas fue similar (aproximadamente 30-35%). Sin embargo, cuando la isquemia se prolongó hasta 50 min el tamaño del infarto en las SHR fue superior al observado en las WKY (58% vs 42%). Es decir, se puso en evidencia que las SHR adultas jóvenes presentan una tolerancia menor y consecuentemente un daño miocárdico mayor que las ratas WKY cuando el período de isquemia se prolongó.

-El daño oxidativo provocado por la isquemia-reperfusión fue mayor en las SHR, evidenciado por el aumento de la peroxidación lipídica (TBARS) en los corazones hipertróficos comparado con los corazones de las ratas WKY. Podemos entonces decir que, en las SHR, a pesar de que la actividad de SOD aumentó y el GSH disminuyó, estos cambios no fueron suficientes para impedir el daño oxidativo. En cambio en las ratas WKY la modificación de dichos sistemas antioxidantes (que fueron menores que en las SHR) pudieron compensar la producción de las ROS y evitar el daño oxidativo.

-Si bien en ambos protocolos de isquemia-reperfusión y en las dos cepas (WKY y SHR) la actividad citosólica de la enzima SODMn aumentó, estos aumentos fueron mayores en la cepa SHR. Estos resultados sugieren que en los corazones hipertróficos la perfusión produce una mayor proporción de mitocondrias con formación o apertura del poro de permeabilidad transitoria (mPTP).

-El preacondicionamiento isquémico (PI) ejerció un efecto protector frente a las dos isquemias realizadas (35 y 50 min) en ambas cepas de ratas, evidenciado por un tamaño de infarto menor y una mayor recuperación postisquémica de la función cardíaca. En este sentido, un hallazgo novedoso de este trabajo fue que en los corazones hipertróficos de las SHR fue necesaria la aplicación de un mayor número de ciclos preacondicionantes (en nuestro caso 3) cuando la isquemia fue de mayor duración.

-El PI preservó el contenido de GSH y disminuyó la actividad de la enzima SODT en ambas cepas, sugiriendo una menor producción de las ROS en corazones

---

preacondicionados con respecto a los no preacondicionados. Sin embargo, la peroxidación lipídica disminuyó sólo en las SHR. Esto estaría indicando que los cambios de los sistemas antioxidantes en las SHR fueron suficientes para evitar el daño oxidativo y que esto no fue así en las WKY.

-El aumento de la actividad de la SODMn observado durante la isquemia-reperfusión disminuyó en los corazones preacondicionados, lo que sugiere que en estos corazones la cantidad de mitocondrias con permeabilidad aumentada (mPTP abiertos) fue menor.

-En corazones hipertróficos la disminución del tamaño del infarto obtenido con el PI frente a períodos isquémicos de 35 y 50 min fue atenuado por el bloqueo de la óxido nítrico sintetasa y por la inhibición de la apertura de los canales mitocondriales de  $K^+$  dependientes de ATP (mito $K^+$ -ATP). Estos resultados indican que el NO y los mito $K^+$ -ATP participan en la vía intracelular de cardioprotección del PI. En cambio, en los corazones normotróficos de las WKY, el NO y los mito $K^+$ -ATP aparecen involucrados en el PI sólo cuando la isquemia fue de 50 min.

-Los cambios de los sistemas GSH y SODT producidos por el PI también fueron anulados en presencia de los bloqueantes L-NAME y 5-HD, indicando la participación del NO y los mito $K^+$ -ATP en dichos efectos. En forma similar a lo detallado anteriormente dichos mediadores participan del PI en la preservación de los sistemas antioxidantes frente a las dos isquemias en las SHR y sólo en la de 50 min en las ratas WKY.

-Los cambios de la actividad citosólica de SODMn fueron similares a los de los parámetros mencionados anteriormente. La disminución de la actividad de la enzima obtenida con el PI en ambas isquemias y en SHR fue dependiente de la producción de NO y de la apertura de los mito $K^+$ -ATP. Esto indica que ambos participan en la menor apertura del mPTP producida por el PI. En cambio esa dependencia sólo fue evidente en las WKY cuando el período de isquemia fue de 50 min.

-En ambas cepas, WKY y SHR, el tratamiento con MPG (atrapante de las ROS) ejerció un efecto cardioprotector disminuyendo el tamaño del infarto y preservando los sistemas antioxidantes. La menor actividad citosólica de SODMn con este tratamiento sugiere que la apertura del mPTP fue menor.

---

Por lo tanto, concluimos que los corazones de las SHR comparado con el de las ratas normotensas WKY presentan mayor daño miocárdico cuando la isquemia es de mayor duración. Aún en estas condiciones el preconditionamiento isquémico (PI) es capaz de protegerlos disminuyendo la muerte celular y preservando los sistemas antioxidantes. Este efecto cardioprotector del PI en ambas cepas y frente a isquemias más prolongadas involucra la participación del NO y de los mitoK<sup>+</sup>-ATP cuya apertura llevaría a la disminución de la formación y/o apertura del poro de permeabilidad transitoria de la mitocondria. Por otra parte, el efecto cardioprotector del MPG, que fue similar al obtenido con el PI, coloca a las ROS como determinantes de la pérdida de la integridad mitocondrial y de las alteraciones observadas en nuestro modelo de isquemia-reperfusión.

---

## BIBLIOGRAFÍA CITADA

- Aceto JF, Condrescu M, Kroupis C, Nelson H, Nelson N, Nicoll D, Philipson KD y Reeves JP. Cloning and expression of the bovine cardiac sodium-calcium exchanger. *Biochem Biophys*, 1992; 298(2): 553-560.
- Ahmet I, Spangler E, Shukitt-Hale B, Juhaszova M, Sollott SJ, Joseph JA, Ingram DK, Talan M. Blueberry-enriched diet protects rat heart from ischemic damage. *PLoS One*, 2009; 4(6): 5954.
- Akhter SA, Luttrell LM, Rockman HA, Iaccarino G, Lefkowitz RJ, Koch WJ. Targeting the receptor-Gq interface to inhibit in vivo pressure overload myocardial hypertrophy. *Science*, 1998; 280(5363): 574-577.
- Allard MF, Schönekeess BO, Henning SL, English DR, Lopaschuk GD. Contribution of oxidative metabolism and glycolysis to ATP production in hypertrophied hearts. *Am J Physiol*, 1994; 267 (Heart Circ Physiol 36): 742-750.
- Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation. *Free Radic Biol Med*, 2000; 28(3): 463-499.
- Ambrosio G, Flaherty JT, Duilio C, Tritto I, Santoro G, Elia PP, Condorelli M, Chiariello M. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J Clin Invest*, 1991; 87: 2056-2206.
- Andreadou I, Tasouli A, Iliodromitis E, Tsantili-Kakoulidou A, Papalois A, Siatra T, Kremastinos DT. Reduction of myocardial infarct size in rabbits by a novel indole derivative with antioxidant and free radical scavenging properties. *Eur J Pharmacol*, 2002; 453(2-3): 271-277.
- Andreadou I, Iliodromitis EK, Farmakis D, Kremastinos DT. To prevent, protect and save the ischemic heart: antioxidants revisited. *Expert Opin Ther Targets*, 2009; 13(8): 945-956.
- Anderson SE, Murphy E, Steenbergen C, London Rey Cala PM. Na-H exchange in myocardium: effects of hypoxia and acidification on Na and Ca. *Am J Physiol*, 1990; 259 (Pt 1): 940-948.
- Ardehali H, O'Rourke B. Mitochondrial K(ATP) channels in cell survival and death. *J Mol Cell Cardiol*, 2005; 39(1): 7-16.
- Arroyo CM, Kramer JH, Dickens BF y Weglicki WB. Identification of free radicals in myocardial ischemia/reperfusion by spin trapping with nitron DMPO. *FEBS Lett*, 1987; 221: 101-104.
- Asimakis GK, Lick S y Patterson C. Postischemic recovery of contractile function is impaired in SOD2 (+/-) mouse hearts. *Circulation*, 2002; 105(8): 981-986.
- Baines CP, Goto M, Downey JM. Oxygen radicals released during ischemic preconditioning contribute to cardioprotection in the rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1997; 29: 207-216.
- Baines CP, Liu GS, Birincioglu M, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Ischemic preconditioning depends on interaction between mitochondrial KATP channels and actin cytoskeleton. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 1999; 276: 1361-1368.
- Bandyopadhyay D, Chattopadhyay A, Ghosh G, Datta AG. Oxidative stress-induced ischemic heart disease: protection by antioxidants. *Curr Med Chem*, 2004; 11: 369-387.

- 
- Becker LB, Vanden Hoek TL, Shao Z-H, Li C-Q y Schumacker PT. Generation of superoxide in cardiomyocytes during ischemia before reperfusion. *Am J Physiol*, 1999; 277: 2240-2246.
- Becker LB. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovasc Res*, 2004; 61: 461-470.
- Beuchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971; 44(1): 276-287.
- Belichard P, Pruneau D, Rochette L. Influence of spontaneous hypertension and cardiac hypertrophy on the severity of ischemic arrhythmias in the rat. *Basic Res Cardiol*, 1988; 83(5): 560-566.
- Beyersdorf F, Fuchs J, Eberhardt B, Stauder M, Satter P, Zimmer G. Myocardial protection by 2-mercaptopropionylglycine during global ischemia in dogs. *Arzneimittelforschung*, 1989; 39: 46-49.
- Bolli R, Patel BS, Jeroudi MO, Lai EK, Mc Cay PB. Demonstration of free radicals generation in "stunned" myocardium of intact dogs with the use of the spin trap alpha-phenyl N-tert-butyl nitron. *J Clin Invest*, 1988; 82: 476-485.
- Bolli R, Jeroudi MO, Patel BS, Hartley CJ, Thornby JI, Roberts R. Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog. *Proc Natl Acad Sci*, 1989; 86: 4695-4699.
- Bolli R. Mechanism of myocardial stunning. *Circ*, 1990; 82(3):723-738.
- Bolli R. Cardioprotective function of inducible nitric oxide synthase and role of nitric oxide in myocardial ischemia and preconditioning: an overview of a decade of research. *J Mol Cell Cardiol*, 2001; 33(11):1897-1918.
- Boutros A, Wang J. Ischemic preconditioning, adenosine and bethanecol protect spontaneously hypertensive isolated rat hearts. *J Pharmacol Exp Ther*, 1995; 275: 1148-1156.
- Braunwald E, Kloner RA. The stunned myocardium: prolonged, postischemic ventricular dysfunction. *Circulation*, 1982; 66(6): 1146-1149.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976; 72: 248-254.
- Buege JA y Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol*, 1978; 52: 302-309.
- Butler KL, Huang AH, Gwathmey JK. AT1-receptor blockade enhances ischemic preconditioning in hypertrophied rat myocardium. *Am J Physiol*, 1999; 277(6 Pt 2): 2482-2487.
- Byrom FB, Wilson C. A plethysmographic method for measuring systolic blood pressure in the intact rat. *J Physiol*. 1938;93(3):301-304.
- Carafoli E, Stauffer T. The plasma membrane calcium pump: functional domains, regulation of the activity, and tissue specificity of isoform expression. *J Neurobiol*, 1994; 25(3): 312-324.
- Chien KR. Stress pathways and heart failure. *Cell*, 1999; 98: 555-558.
- Clarke SJ, Khaliulin I, Das M, Parker JE, Heesom KJ, Halestrap AP. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening by ischemic preconditioning is probably mediated by reduction of oxidative stress rather than mitochondrial protein phosphorylation. *Circ Res*, 2008; 102(9): 1082-1090.

- 
- Cohen MV, Yang XM, Liu GS, Heusch G, Downey JM. Acetylcholine, bradykinin, opioids, and phenylephrine, but not adenosine, trigger preconditioning by generating free radicals and opening mitochondrial KATP channels. *Circ Res*, 2001; 89: 273-278.
- Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies. *Cardiovasc Res*, 2006; 70(2): 231-239.
- Conrad CH, Brooks WW, Hayes JA, Sen S, Robinson KG, Bing OH. Myocardial fibrosis and stiffness with hypertrophy and heart failure in the spontaneously hypertensive rat. *Circulation*, 1995; 91: 161-170.
- Costa AD, Jakob R, Costa CL, Andrukiv K, West IC, Garlid KD. The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel opening and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol Chem*, 2006; 281(30): 20801-20808.
- Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S. Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol*, 1997; 29(1): 55-65.
- Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J*, 1988; 1; 255(1): 357-360.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J*, 1999; 341: 233-249.
- Dai W, Simkhovich BZ, Kloner RA. Ischemic preconditioning maintains cardioprotection in aging normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Exp Gerontol*, 2009; 44(5): 344-349.
- Das DK y Maulik N. Conversion of death signal into survival signal by redox signaling. *Biochemistry (Mosc)*, 2004; 69(1): 10-17.
- Das B, Sarkar C. Is the sarcolemmal or mitochondrial K(ATP) channel activation important in the antiarrhythmic and cardioprotective effects during acute ischemia/reperfusion in the intact anesthetized rabbit model?. *Life Sci*, 2005; 77(11): 1226-1248.
- Depre C, L. Fierain L, Hue L. Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc. Res*, 1997; 33:82-87.
- Di Lisa F, Menabó R, Canton M, Barile M, Bernardi P. Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD<sup>+</sup> and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem*, 2001; 26; 276(4): 2571-2575.
- Downey JM, Cohen MV. Reducing infarct size in the setting of acute myocardial infarction. *Prog Cardiovasc Dis*, 2006; 48(5): 363-371.
- Duchen MR, McGuinness O, Brown LA, Crompton M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*, 1993 ; 27(10): 1790-1794.
- Ebrahim Z, Yellon DM, Baxter GF. Ischemic preconditioning is lost in aging hypertensive rat heart: independent effects of aging and longstanding hypertension. *Exp Gerontol*, 2007; 42(8): 807-814.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C. Biochemistry of mitochondrial nitric-oxide synthase. *J Biol Chem*, 2002; 277: 38079-38086.
- Esposito G, Rapacciuolo A, Naga Prasad SV, Takaoka H, Thomas SA, Koch WJ, Rockman HA. Genetic alterations that inhibit in vivo pressure-overload hypertrophy

- 
- prevent cardiac dysfunction despite increased wall stress. *Circulation*, 2002; 105(1): 85-92.
- Facundo HT, Carreira RS, de Paula JG, Santos CC, Ferranti R, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K<sup>+</sup> channel activity. *Free Radic Biol Med*, 2006; 40: 469-479.
- Fantinelli JC, Mosca SM. Comparative effects of ischemic pre and postconditioning on ischemia-reperfusion injury in spontaneously hypertensive rats (SHR). *Mol Cell Biochem*, 2007a; 296: 45-51.
- Fantinelli JC, Mosca SM. Cardioprotective effects of a non-alcoholic extract of red wine during ischaemia and reperfusion in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2007b; 34(3):166-169.
- Feldman AM, Weinberg EO, Ray PE, Lorell BH. Selective change in cardiac gene expression during compensated hypertrophy and the transition to cardiac decompensation in rats with chronic aortic banding. *Circ Res*, 1993; 73: 284-292.
- Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite in myocardial ischemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol*. 2003; 138(4): 532-543.
- Ferdinandy P, Schulz R, Baxter G. Interaction of Cardiovascular Risk Factors with Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury, Preconditioning, and Postconditioning. *Pharmacol Rev*, 2007; 59: 418-458.
- Frey N, Katus HA, Olson EN, Hill JA. Hypertrophy of the heart: a new therapeutic target?. *Circulation*, 2004; 109: 1580-1589.
- Frey N, Olson EN. Cardiac hypertrophy: the good, the bad and the ugly. *Annu Rev Physiol*, 2004; 65: 45-79.
- Friehs I, del Nido PJ. Increased susceptibility of hypertrophied hearts to ischemic injury. *Ann Thorac Surg*, 2003; 75(2): 678-684.
- Fritz M, Rinaldi G. Influence of nitric oxide-mediated vasodilation on the blood pressure measured with the tail-cuff method in the rat. *J Biomed Sci*. 2007; 14(6): 757-765.
- Gaasch WH, Zile MR, Hoshino PK, Weinberg EO, Rhodes DR, Apstein CS. Tolerance of the hypertrophic heart to ischemia. Studies in compensated and failing dog hearts with pressure overload hypertrophy. *Circulation*, 1990; 81(5): 1644-1653.
- Gao WS, Atar D, Liu Y, Pérez NG, Murphy AM, Marban E. Role of troponin I proteolysis in the pathogenesis of stunned myocardium. *Circ Res*, 1997; 80(3): 393-399.
- Garlick PB, Davies MJ, Hearse DJ, Slater TF. Direct detection of free radicals in the reperfused rat heart using electron spin resonance spectroscopy. *Circ Res*, 1987; 61(5): 757-760.
- Garlid KD, Paucek P, Yarov-Yarovoy V, Murray HN, Darbenzio RB, D'Alonzo AJ, Lodge NJ, Smith MA, Grover GJ. Cardioprotective effect of Diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K<sup>+</sup> channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circulation Research*, 1997; 81: 1072-1082.
- Gewaltig MT, Kojda G. Vasoprotection by nitric oxide: mechanisms and therapeutic potential. Activation of nitric oxide synthase by ischaemia in the perfused heart. *Cardiovasc Res*, 2001; 55: 250-260.
- Giulivi C, Poderoso JJ, Boveris A. Production of nitric oxide by mitochondria. *J Biol Chem*, 1998; 273(18): 11038-11043.

- 
- Goto M, Liu Y, Yang XM, Ardell JL, Cohen MV, Downey JM. Role of bradykinin in protection of ischemic preconditioning in rabbit hearts. *Circ Res*, 1995; 77(3): 611-621
- Grover GJ, Dzwonczyk S, Monticello TM. Comparative cardioprotective effects of cromakalim and diltiazem in ischemic hypertrophied rat hearts. *Am J Physiol*, 1996; 270: 174-182.
- Grover GJ, Garlid KD. ATP-sensitive potassium channels: a review of their cardioprotective pharmacology. *J Mol Cell Cardiol*, 2000; 32: 677-695.
- Haendeler J, Tischler V, Hoffmann J, Zeiher AM, Dimmeler S. Low doses of reactive oxygen species protect endothelial cells from apoptosis by increasing thioredoxin-1 expression. *FEBS Lett*, 2004; 577(3): 427-433.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfield KY. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta*, 1998; 1366(1-2): 79-94.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov SA. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion—a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res*, 2004; 61(3): 372-385.
- Haneda T, Ichihara K, Abiko Y, Onodera S. Functional and metabolic response to ischemia in the perfused heart isolated from normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J*, 1986; 50: 607-613.
- Hangaishi M, Nakajima H, Taguchi J, Igarashi R, Hoshino J, Kurokawa K, Kimura S, Nagai R, Ohno M. Lecithinized Cu, Zn-superoxide dismutase limits the infarct size following ischemia-reperfusion injury in rat hearts in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001; 285(5): 1220-1225.
- Hanley PJ, Daut J. K-ATP channels and preconditioning: a re-examination of the role of mitochondrial K-ATP channels and an overview of alternative mechanisms. *J Mol Cell Cardiol*, 2005; 39:17-50.
- Hausenloy DJ, Mocanu MM, Yellon DM. Cross-talk between the survival kinases during early reperfusion: its contribution to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 2004a; 63 (2): 305-312.
- Hausenloy DJ, Yellon DM, Mani-Babu S, Duchon MR. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2004b; 287: 841-849.
- Herrlich P y Böhmer FD. Redox regulation of signal transduction in mammalian cells. *Biochem Pharmacol*, 2000; 59(1): 35-41.
- Heusch G. Postconditioning: old wine in a new bottle?. *J Am Coll Cardiol*, 2004; 44(5): 1111-1112.
- Heyndrickx GR, Millard RW, McRitchie RJ, Maroko PR, Vatner SF. Regional myocardial functional and electrophysiological alterations after brief coronary artery occlusion in conscious dogs. *J Clin Invest*, 1975; 56(4):978-985.
- Hoffmeister HM, Ströbele M, Beyer ME, Kazmaier S, Fisher M, Bäßler A, Seipel L. Inotropic response of stunned hypertrophied myocardium: responsiveness of hypertrophied and normal postischemic isolated rat hearts to calcium and dopamine stimulation. *Cardiovasc Res*, 1998; 38: 149-157.
- Holmuhamedov EL, Wang L, Terzic A. ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers prevent Ca<sup>2+</sup> overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol*, 1999; 519: 347-360.

- 
- Ikonomidis JS, Tumiati LC, Weisel RD, Mickle DA y Li RK. Preconditioning human ventricular cardiomyocytes with brief periods of simulated ischaemia. *Cardiovasc Res*, 1994; 28(8): 1285-1291.
- Inou T, Lamberth WC Jr, Koyanagi S, Harrison DG, Eastham CL, Marcus ML. Relative importance of hypertension after coronary occlusion in chronic hypertensive dogs with LVH. *Am J Physiol* 1987, 253: 1148-1158.
- Ito N, Bartunek J, Spitzer KW, Lorell BH. Effects of the nitric oxide donor sodium nitroprusside on intracellular pH and contraction in hypertrophied myocytes. *Circulation*, 1997; 95(9): 2303-2311.
- Javadov SA, Clarke S, Das M, Griffiths EJ, Lim KHH, Halestrap AP. Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol*, 2003; 549 (Pt 2): 513-524.
- Jin ZQ, Zhou HZ, Cecchini G, Gray MO, Karliner JS. MnSOD in mouse heart: acute responses to ischemic preconditioning and ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005; 288(6): 2986-2994.
- Johnatty SE, Dyck JR, Michael LH, Olson EN, Abdellatif M. Identification of gene regulated during mechanical load-induced cardiac hypertrophy. *J Mol Cell Cardiol*, 2000; 32: 805-815.
- Jones SP, Hffmeyer MR, Sharp BR, Ho Ys, Lefer Dj. Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284(1): 277-282.
- Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol*, 2006; 40(1): 16-23.
- Jugdutt BI. Nitric oxide and cardioprotection during ischemia-reperfusion. *Heart Fail Rev*, 2002; 7(4): 391-405.
- Kanno T, Sato EE, Muranaka S, Fujita H, Fujiwara T, Utsumi T, Inoue M y Utsumi K. Oxidative stress underlies the mechanism for Ca(2+)-induced permeability transition of mitochondria. *Free Radic Res*, 2004; 38(1): 27-35.
- Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol*, 2002; 3: 221-227.
- Kevin LG, Camara AK, Ries ML, Novalija E, Stowe DF. Ischemic preconditioning alters real-time measure of O<sub>2</sub> radicals in intact hearts with ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003; 284: 566-574.
- Kilgore KS, Friedrichs GS, Jhonson CR, Scasteen CS, Riley DP, Weiss RH, Ryan U, Lucchesi BR. Protective effects of the SOD-mimetic SC-52608 against ischemia/reperfusion damage in the rabbit isolated heart. *J Mol Cell Cardiol*, 1994; 26: 995-1006.
- Kim JS, Ohshima S, Padiaditais P, Lemasters J. Nitric oxide: a signaling molecule agaist mitochondrial permeability transition - and pH dependent cell death alter reperfusion. *Free Radic Biol Med*, 2004; 37(12): 1943-1950.
- Kinnula VL, Crapo JD. Superoxide dismutases in malignant cells and human tumors. *Free Radic Biol Med*, 2004; 36(6): 718-744.
- Kirshenbaum LA, Singal PK. Increase in endogenous antioxidant enzymes protects hearts against reperfusion injury. *Am J Physiol*, 1993; 265 (Pt 2): 484-493.
- Klaunig JE, Kamendulis LM. The role of oxidative stress in carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2004; 44: 239-267.

- 
- Klem M, Feelisch M, Krebber T, Deussen A, Motz W, Strauer BE. Role of nitric oxide in the regulation of coronary vascular tone in heart from hypertensive rats. Maintenance of nitric oxide-forming capacity and increased basal production of nitric oxide. *Hypertension*, 1995; 25: 186-193.
- Kloner RA, Yellon D. Does ischemic preconditioning occur in patients?. *J Am Coll Cardiol*. 1994; 24(4):1133-1142.
- Kloner RA, Bolli R, Marban E, Reinlib L, Braunwald E. Medical and cellular implications of stunning, hibernation, and preconditioning: an NHLBI workshop. *Circulation*, 1998; 97(18):1848-1867.
- Kobara M, Tatsumi T, Takeda M, Mano A, Yamanaka S, Shiraishi J, Keira N, Matoba S, Asayama J, Nakagawa M. The dual effects of nitric oxide synthase inhibitors on ischemia-reperfusion injury in rat hearts. *Basic Res Cardiol*, 2003; 98(5): 319-328.
- Koerner JE, Anderson BA y Dage RC. Protection against postischemic myocardial dysfunction in anesthetized rabbits with scavengers of oxygen-derived free radicals: superoxide dismutase plus catalase, N-2-mercaptopyrionyl glycine and captopril. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1991; 17: 185–191.
- Kojda G, Harrison DG. Interactions between NO and reactive oxygen species: Pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc Res*, 1999; 43: 562-571.
- Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, Sligh JE, Cai J, Jones DP, MacGregor GR, Wallace DC. The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature*, 2004; 427(6973): 461-465.
- Koyanagi S, Eastham CL, Harrison DG, Marcus ML. Increased size of myocardial infarction in dogs with chronic hypertension and left ventricular hypertrophy. *Circ Res*, 1982; 50: 55-62.
- Kutala VK, Khan M, Mandal R, Potaraju V, Colantuono G, Kumbala D, Kuppusamy P. Prevention of postischemic myocardial reperfusion injury by the combined treatment of NCX-4016 and Tempol. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2006; 48(3): 79-87.
- Laskey WK. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2005;65: 361-367.
- Leichtweis S, Ji LL. Glutathione deficiency intensifies ischaemia-reperfusion induced cardiac dysfunction and oxidative stress. *Aca Physiol Scan*, 2001; 172(1): 1-10.
- Lemasters JJ, Nieminen AL, Qian T, Trost LC, Herman B. The mitochondrial permeability transition in toxic, hypoxic and reperfusion injury. *Mol Cell Biochem*, 1997; 174 (1-2): 159-165.
- Liu YG, Sato T, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-dependent potassium channels: novel effectors of cardioprotection?. *Circulation*, 1998; 97: 2463-2469.
- Liu GS, Thornton J, Van Winkle DM, Stanley AW, Olsson RA, Downey JM. Protection against infarction afforded by preconditioning is mediated by A1 adenosine receptors in rabbit heart. *Circulation*, 1991; 84(1): 350-356.
- Liu Y, Ytrehus K, Downey JM. Evidence that translocation of protein kinase C is a key event during ischemic preconditioning of rabbit myocardium. *J Mol Cell Cardiol*, 1994; 26: 661-668.
- Ljubkovic M, Shi Y, Cheng Q, Bosnjak Z, Jiang MT. Cardiac mitochondrial ATP-sensitive potassium channel is activated by nitric oxide in vitro. *FEBS Lett*, 2007; 4; 581(22): 4255-4259.

- 
- Lorell BH, Carabello BA. Left ventricular hypertrophy: pathogenesis, detection, and prognosis. *Circulation*, 2000; 102: 470-479.
- Loscalzo J y Welch G. Nitric oxide and its role in the cardiovascular system. *Prog Cardiovasc Dis*, 1995; 38: 87-104.
- MacLellan WR, Schneider MD. Success in failure: modeling cardiac decompensation in transgenic mice. *Circulation*, 1998; 97: 1433-1435.
- Massoudy P, Becker BF, Gerlach E. Nitric oxide accounts for postischemic cardioprotection resulting from angiotensin-converting enzyme inhibition: indirect evidence for a radical scavenger effect in isolated guinea pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1995; 25(3): 440-447.
- Mathew J, Sleight P, Lonn E, Johnstone D, Pogue J, Yi Q, Bosch J, Sussex B, Probstfield J, Yusuf S. Heart Outcomes Prevention Evaluation (HOPE) Investigators. Reduction of cardiovascular risk by regression of electrocardiographic markers of left ventricular hypertrophy by the angiotensin-converting enzyme inhibitor ramipril. *Circulation*, 2001; 104: 1615-1621.
- Matejíková J, Kucharská J, Pintérová M, Pancza D, Ravingerová T. Protection against ischemia-induced ventricular arrhythmias and myocardial dysfunction conferred by preconditioning in the rat heart: involvement of mitochondrial KATP channels and reactive oxygen species. *Physiol Res*, 2009; 58: 9-19.
- McKinsey TA, Olson EN. Cardiac hypertrophy: sorting out the circuitry. *Curr Opin Genet Dev*, 1999; 9: 267-274.
- Merkle S, Frantz S, Schon MP, Bauersachs J, Buitrago M, Frost RJ, Schmitteckert EM, Lohse MJ, Engelhardt S. A role for caspase-1 in heart failure. *Circ Res*, 2007; 100: 645-653.
- Mocanu MM, Baxter GF, Yue Y, Critz SD, Yellon DM. The p38 MAPK inhibitor, SB203580, abrogates ischaemic preconditioning in rat heart but timing of administration is critical. *Basic Res Cardiol*, 2000; 95(6): 472-478.
- Mocanu MM, Yellon DM. PTEN, the Achilles' heel of myocardial ischaemia/reperfusion injury?. *Br J Pharmacol*, 2007; 150(7): 833-838.
- Murata M, Akao M, O'Rourke B, Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels attenuate matrix Ca(2+) overload during simulated ischemia and reperfusion: possible mechanism of cardioprotection. *Circ Res*, 2001; 89: 891-898.
- Murphy E y Cross H, Steenbergen C. Sodium regulation during ischemia versus reperfusion and its role in injury. *Circ Res*, 1999; 84: 1469-1470.
- Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986; 74(5): 1124-1136.
- Myers ML, Bolli R, Lekich RF, Hartley CJ, Roberts R. N-2-Mercaptopropionylglycine improves recovery of myocardial function after reversible regional ischemia. *J Am Coll Cardiol*, 1986; 8: 1161-1168.
- Nakagawa C, Asayama J, Katamura M, Matoba S, Keira N, Kawahara A, Tsuruyama K, Tanaka T, Kobara M, Akashi K, Ohta B, Tatsumi T, Nakagawa M. Myocardial stretch induced by increased left ventricular diastolic pressure preconditions isolated perfused hearts of normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Basic Res Cardiol*, 1997; 92: 410-416.
- Nava E, Noll G, Lüscher TF. Increased activity of constitutive nitric oxide synthase in hearts from spontaneously hypertensive rats. *Circulation*, 1995; 91: 2310-2313.

- 
- Nava E, Farré A, Moreno C, Casado S, Moreau Pierre, Cosentino F, Lüscher T F. Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens*, 1998; 16: 609-615.
- Nawada R, Murakami T, Iwase T, Nagai K, Morita Y, Kouchi I, Akao M, Sasayama S. Inhibition of sarcolemmal Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>ATPase activity reduces the infarct size-limiting effect of preconditioning in rabbit hearts. *Circulation*, 1997; 96(2): 599-604.
- Newmeyer DD, Ferguson-Miller S. Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death. *Cell* 112 ,2003; 481-490.
- Noma A. ATP-regulated K<sup>+</sup> channels in cardiac muscle. *Nature*, 1983;305:147-148.
- Nicoll DA, Longoni S, Philipson KD. Molecular cloning and functional expression of the cardiac sarcolemmal Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchanger. *Science*, 1990; 250 (4980): 562-565.
- Nishida H, Sato T, Ogura T, Nakaya H. New aspects for the treatment of cardiac diseases based on the diversity of functional controls on cardiac muscles: mitochondrial ion channels and cardioprotection. *J Pharmacol Sci*, 2009; 109: 341-347.
- Nisoli E, Falcone S, Tonello C, Cozzi V, Palomba L, Fiorani M. Mitochondrial biogenesis by NO yields functionally active mitochondria in mammals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 16507-16512.
- Nuss HB, Houser SR. Sodium-calcium exchange-mediated contractions in feline ventricular myocytes. *Am J Physiol*, 1992; 263 ( Pt 2): 1161-1169.
- O'Donnell VB, Freeman BA. Interactions between nitric oxide and lipid oxidation pathways-Implications for vascular disease. *Circ Res*, 2001; 88: 12-21.
- Okamoto AK. Development of a strain of spontaneously hypertensive rat. *Jap Circ J*, 1963; 27: 282-293.
- Oldenburg O, Cohen MV, Downey JM. Mitochondrial K-ATP channels in preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 2003; 35: 569-575.
- Oldenburg O, Qin Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, Critz SD, Cohen MV, Downey JM. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG, and mitoKATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 286(1):468-476.
- Onogi H, Minatoguchi S, Chen XH, Bao N, Kobayashi H, Misao Y, Yasuda S, Yamaki T, Maruyama R, Uno Y, Arai M, Takemura G, Fujiwara H. Edaravone reduces myocardial infarct size and improves cardiac function and remodelling in rabbits. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2006; 33(11): 1035-1041.
- Ozer MK, Parlakpınar H, Cigremis Y, Ucar M, Vardi N, Acet A. Ischemia-reperfusion leads to depletion of glutathione content and augmentation of malondialdehyde production in the rat heart from overproduction of oxidants: can caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protect the heart? *Mol Cell Biochem*, 2005; 273(1-2): 169-175.
- Padma VV, Devi CS, Ramkumar KM. Modulatory effect of fish oil on the myocardial antioxidant defense system in isoproterenol-induced myocardial infarction. *J Basic Clin Physiol Pharmacol*, 2006;17(1): 1-15.
- Pain T, Yang X-M, Critz SD, Yue Y, Nakano A, Liu GS, Heusch G, Cohen MV, Downey JM. Opening of mitochondrial KATP channels triggers the preconditioned state by generating free radicals. *Circ Res*, 2000; 87: 460-466.
- Pantos CI, Davos CH, Carageorgiou HC, Varonos DV, Cokkinos DV. Ischaemic preconditioning protects against myocardial dysfunction caused by ischaemia in isolated hypertrophied rat hearts. *Basic Res Cardiol*, 1996; 91(6): 444-449.

- 
- Peyton RB, Van Trigt P, Pellom GL, Jones RN, Sink JD, Wechsler AS. Improved tolerance to ischemia in hypertrophied myocardium by preischemic enhancement of adenosine triphosphate. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1982 ; 84(1): 11-15.
- Pinto YM, Paul M, Ganten D. Lessons from rat models of hypertension: from Goldblatt to genetic engineering. *Cardiovascular Res*, 1998, 39: 77-88.
- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2007; 292(5): 1378-1387.
- Rajesh KG, Sasaguri S, Suzuki R, Xing Y, Maeda H. Ischemic preconditioning prevents reperfusion heart injury in cardiac hypertrophy by activation of mitochondrial KATP channels. *Int J Cardiol*, 2004; 96(1): 41-49.
- Rakhit RD, Edwards RJ, Marber MS. Nitric oxide, nitrates and ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res*, 1999; 43: 621-627.
- Randall MD, Gardiner SM, Bennett T. Enhanced cardiac preconditioning in the isolated heart of the transgenic (mREN-2) 27) hypertensive rat. *Cardiovasc Res*, 1997; 33(2): 400-409.
- Sadoshima J, Izumo S. The cellular and molecular response of cardiac myocytes to mechanical stress. *Annu Rev Physiol*, 1997; 59: 551– 571.
- Sastre J, Pallardó FV, García de la Asunción J, Viña J. Mitochondria, oxidative stress and aging. *Free Radic Res*, 2000; 32(3):189-198.
- Sawyer DB, Siwik DA, Xiao L, Pimentel DR, Singh K, Colucci WS. Role of oxidative stress in myocardial hypertrophy and failure. *J Mol Cell Cardiol*, 2002; 34: 379-388.
- Saupe KW, Lim CC, Ingwall JS, Apstein CS, Eberli FR. Comparison of hearts with 2 types of pressure-overload left ventricular hypertrophy. *Hypertension*, 2000; 35(5): 1167-1172.
- Schnackenberg CG, Welch WJ, Wilcox CS. Normalization of blood pressure and renal vascular resistance in SHR with a membrane-permeable superoxide dismutase mimetic: role of nitric oxide. *Hypertension*, 1998; 32: 59-64.
- Schnackenberg CG, Wilcox CS. Two-week administration of tempol attenuates both hypertension and renal excretion of 8-isoprostaglandin F 2 $\alpha$ . *Hypertension*, 1999; 33: 424-428.
- Sedlak J, Lindsay R. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's Reagent. *Anal Biochem*, 1958; 25: 192-205.
- Simoons ML, Boersma E, Maas AC, Deckers JW. Management of myocardial infarction: the proper priorities. *Eur Heart J*, 1997; (6): 896-899.
- Singla DK, Kaur K, Sharma AK, Dhingra S, Singal PK. Probucol promotes endogenous antioxidant reserve and confers protection against reperfusion injury. *Can J Physiol Pharmacol*, 2007; 85(3-4): 439-443.
- Snoeckx LH, van der Vusse GJ, Coumans WA, Willemsen PH, van der Nagel T, Reneman RS. Myocardial function in normal and spontaneously hypertensive rats during reperfusion after a period of global ischemia. *Cardiovasc Res*, 1986; 20: 67-75.
- Snoeckx LH, van der Vusse GJ, van der Veen FH, Coumans WA y Reneman RS. Recovery of hypertrophied rat hearts after global ischemia and reperfusion at different perfusion pressures. *Pflügers Arch*, 1989; 413(3): 303-312.

- 
- Snoeckx LH, van der Vusse GJ, Coumans WA, Reneman RS. The effects of global ischemia and reperfusion on compensated hypertrophied rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1990; 22(12): 1439-1452.
- Snoeckx LH, van der Vusse GJ, Coumans WA, Willemsen PH, Reneman RS. Differences in ischaemia tolerance between hypertrophied hearts of adult and aged spontaneously hypertensive hearts. *Cardiovasc Res*, 1993; 27: 874-881.
- Speechly-Dick ME, Baxter GF, Yellon DM. Ischaemic preconditioning protects hypertrophied myocardium. *Cardiovasc Res*, 1994; 28(7): 1025-1029.
- Stamler JS, Singel DJ, Loscalzo J. Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms. *Science*, 1992; 258: 1898-1902.
- Steiner AA, Carnio EC, Branco LG. Role of neuronal nitric oxide synthase in hypoxia-induced anapnoea in rats. *J Appl Physiol*, 2000; 89(3): 1131-1136.
- Sukhodub A, Jovanović S, Du Q, Budas G, Clelland AK, Shen M, Sakamoto K, Tian R, Jovanović A. AMP-activated protein kinase mediates preconditioning in cardiomyocytes by regulating activity and trafficking of sarcolemmal ATP-sensitive K(+) channels. *J Cell Physiol*, 2007; 210(1): 224-236.
- Takano H, Tang XL, Bolli R. Differential role of KATP channels in late preconditioning against myocardial stunning and infarction in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2000; 279: 2350-2359.
- Tani M, Noely JR. Role of intracellular Na<sup>+</sup> in Ca<sup>2+</sup> overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts: possible involvement of H<sup>+</sup>-Na<sup>+</sup> and Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange. *Circ Res*, 1989; 65: 1045-1056.
- Tanonaka K, Iwai T, Motegi K y Takeo S. Effects of N-(2-mercaptopropionyl)-glycine on mitochondrial function in ischemic-reperfused heart". *Cardiovasc Res*, 2003; 57(2): 416-425.
- Tetsuji I, Masao H, Kohji A. Differential regulation of the nitric oxide-cGMP pathway exacerbates postchaemic heart injury in stroke-prone hypertensive rats. *Exp Physiol*, 2007; 92 (1): 147-159.
- Tong H, Imahashi K, Steenbergen C, Murphy E. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3beta during preconditioning through a phosphatidylinositol-3-kinase--dependent pathway is cardioprotective. *Circ Res*. 2002; 90(4): 377-379.
- van Deel ED, Lu Z, Xu X, Zhu G, Hu X, Oury TD, Bache RJ, Duncker DJ, Chen Y. Extracellular superoxide dismutase protects the heart against oxidative stress and hypertrophy after myocardial infarction. *Free Radic. Biol. Med*, 2008; *Free Radic Biol Med*, 2008; 44(7): 1305-1313.
- Van Emous, JG, Schreur JH, Ruigrok TJ, Van Echteld CJ. Both Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup> ATPase and Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchanger are immediately active upon post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*, 1998; 30(2): 337-348.
- van Empel VP, De Windt LJ. Myocyte hypertrophy and apoptosis: a balancing act. *Cardiovasc Res*, 2004; 63(3): 487-499.
- Van Eyk JE, Powers F, Law W, Larue C, Hodges RS, Solaro RJ. Breakdown and release of myofilament proteins during ischemia and ischemia/reperfusion in rat hearts: identification and degradation products and effects on the pCa-force relation. *Circ Res*, 1998; 82(2): 261-271.
- Vaquero EC, Edderkaoui M, Pandol SJ, Gukovsky I y Gukovskaya AS. Reactive oxygen species produced by NAD(P)H oxidase inhibit apoptosis in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem*, 2004; 279(33): 34643-34654.

- Venardos KM, Perkins A, Headrick J, Kaye DM. Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems, and selenium: a review. *Curr Med Chem*, 2007; 14(14): 1539-1549.
- Verdecchia P, Schillaci G, Borgioni C, Ciucci A, Gattobigio R, Zampi I, Reboldi G, Porcellati C. Prognostic significance of serial changes in left ventricular mass in essential hypertension. *Circulation*, 1998; 97: 48-54.
- Wang LG, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, Schaefer S. Preconditioning limits mitochondrial  $Ca^{2+}$  during ischemia in rats hearts: role of K-ATP channels. *Am J Physiol*, 2001; 280: 2321-2328.
- Wettschureck N, Rutten H, Zywietz A, Gehring D, Wilkie TM, Chen J, Chien KR, Offermanns S. Absence of pressure overload induced myocardial hypertrophy after conditional inactivation of Gαq/Gα11 in cardiomyocytes. *Nat Med*, 2001; 7(11): 1236-1240.
- Wexler LF, Lorell BH, Momomura S, Weinberg EO, Ingwall JS, Apstein CS. Enhanced sensitivity to hypoxia-induced diastolic dysfunction in pressure-overload left ventricular hypertrophy in the rat: role of high-energy phosphate depletion. *Circ Res*, 1988; 62: 766-775.
- Yan Y, Davani S, Chocron S, Kantelip B, Muret P, Kantelip JP. Effects of L-arginine administration before cardioplegic arrest on ischemia-reperfusion injury. *Ann Thorac Surg*, 2001; 72(6): 1985-1990.
- Yellon DM, Baxter GF, Garcia-Dorado D, Heusch G, Sumeray MS. Ischaemic preconditioning: present position and future directions. *Cardiovasc Res*, 1998; 37(1): 21-33.
- Yellon DM, Baxter GF. Protecting the ischaemic and reperfused myocardium in acute myocardial infarction: distant dream or near reality?. *Heart*, 2000; 83(4): 381-387.
- Yellon DM, Downey JM. Preconditioning the myocardium: from cellular physiology to clinical cardiology. *Physiol Rev*, 2003; 83(4): 1113-1151.
- Yellon DM, Hausenloy DJ. Myocardial reperfusion injury. *N Engl J Med*, 2007; 357: 1121-1135.
- Ylitalo KV, AlaRami A, Liimatta EV, Peuhkurien KJ, Hänsäen IE. Intracellular free calcium and mitochondrial membrane potential in ischemia/reperfusion and preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*, 2000; 32: 1223-1238.
- Ytrehus K, Liu Y, Tsuchida A, Miura T, Liu GS, Yang XM, Herbert D, Cohen MV, Downey JM. Rat and rabbit heart infarction: effects of anesthesia, perfusate, risk zone, and method of infarct sizing. *Am J Physiol*, 1994; 267(6 Pt 2): 2383-2390.
- Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001; 2(1): 67-71.
- Zaobornyj T, Valdez LB, La Padula P, Costa LE y Boveris A. Effect of sustained hypobaric hypoxia during maturation and aging on rat myocardium II. mtNOS activity. *J Appl Physiol*, 2005; 98: 2370-2375.
- Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML. Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1987; 84: 1404-1407.
- Zweier JL. Measurement of superoxide-derived free radicals in the reperfusion heart. Evidence for a free radical mechanism of reperfusion injury. *J Biol Chem*, 1988; 263: 1353-1357

