

142
2c3



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

PROTECCION POR KETOROLAC EN EL DAÑO
INDUCIDO POR ISQUEMIA Y REPERFUSION
MIOCARDICA

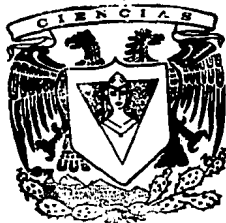
T E S I S

Que para obtener el Título de

B I O L O G O

presenta

JULIETA PICHARDO VELAZQUEZ



DIRECTOR DE TESIS
DR. EDMUNDO CHAVEZ COSSIO

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGIA
"IGNACIO CHAVEZ"

México, D. F.

1993

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

UNAM



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

INDICE

Resumen

Introducción

Hipótesis de la paradoja del calcio

Hipótesis de la paradoja del oxígeno

Antecedentes

Ketorolac

Hipótesis

Objetivos

Material y Métodos

Preparación de mitocondrias de riñon de rata

Movimientos de calcio en la mitocondria

Respiración mitocondrial

Preparación de liposomas

**Ensayo de captación de calcio en vesículas de
fosfolípidos**

**Determinación del potencial transmembranal en
mitocondrias**

Ensayo de la acción ionofórica del Ketorolac

**Ensayo del efecto del Ketorolac durante la reperfusión
miocárdica**

Quantificación de enzimas en el suero sanguíneo

Análisis Histológico

Análisis Estadístico

Resultados

**Efecto del Ketorolac en algunas funciones
mitocondriales**

**Experimentos de transporte de calcio a través de fases
orgánicas**

**Efecto del Ketorolac en el daño inducido por isquemia y
reperusión miocárdica**

Discusión

Efecto del Ketorolac en la funciones mitocondriales

**Acción del Ketorolac en solventes hidrofóbicos y bicapas
lipídicas**

Efecto del Ketorolac en el daño por reperusión

Conclusiones

Perspectivas

Bibliografía

RESUMEN

El daño al miocardio producido por la reperfusión después de un periodo de isquemia, ha sido bien estudiado. Actualmente se tienen dos hipótesis para explicar este fenómeno, la paradoja del oxígeno y la paradoja del calcio.

Basándonos en los datos que reportan el daño producido por la sobrecarga de calcio, se hicieron estudios para demostrar que el Ketorolac tiene propiedades ionofóricas para el calcio, debido a estas propiedades puede prevenir del daño miocárdico inducido por isquemia y reperfusión.

El Ketorolac es un fármaco sintetizado para llevar a cabo acciones anti-inflamatorias y analgésicas. Su estructura química es similar al anti-inflamatorio Tolectin. El Ketorolac induce su efecto terapéutico inhibiendo la síntesis de prostaglandinas. En este trabajo, se analiza a este anti-inflamatorio no esteroideo, como un compuesto con propiedades ionofóricas para los iones de calcio, mostrando que el Ketorolac induce la salida de calcio de la mitocondria. Este efecto no depende de una acción desacoplante, ya que la droga no modifica el potencial transmembranal, ni afecta la fosforilación oxidativa. Además, se muestra que este compuesto moviliza a los iones de calcio hacia el interior de liposomas que forman potencial transmembranal.

Para evaluar el efecto de este ionóforo para calcio, en un modelo de reperfusión, se utilizaron ratas macho, a las que se les tomaron registros de

electrocardiograma y presión arterial. El compuesto se administró por vía intravenosa, a una dosis de 1 mg/kg de peso.

Pasados 30 minutos, se localizó la arteria coronaria descendente anterior izquierda, la cual se ocluyó, a los 4 minutos y medio de oclusión, se retiró la ligadura comenzando la reperfusión.

Al momento de la reperfusión, en las ratas tratadas se desarrollaron arritmias cardíacas las cuales al minuto 8 desaparecieron regresando a ritmo sinusal, en las ratas no tratadas, las arritmias persistieron.

Se hizo la cuantificación de las enzimas creatina cinasa y lactato deshidrogenasa, las cuales disminuyeron en las ratas tratadas en comparación con las no tratadas.

Se hizo el estudio histológico del miocardio de las ratas de ambos grupos. En el grupo no tratado, se observaron las alteraciones características de este tipo de daño. En contraste en el grupo tratado con Ketorolac, no encontramos evidencias importantes de daño.

Debido a las propiedades ionofóricas que presenta el Ketorolac, este medicamento fue capaz de evitar el desarrollo de arritmias, la pérdida de las enzimas y el daño histológico.

INTRODUCCION

La oclusión aguda de una arteria coronaria debido a una enfermedad aterosclerótica o a la presencia de un trombo, origina isquemia miocárdica que trae como resultado un infarto agudo del miocardio (1).

La isquemia miocárdica se define como un estado en el cual el flujo sanguíneo al miocardio no es suficiente para proveer de oxígeno a las células, pasando de una respiración aeróbica a una glicólisis anaeróbica para producir energía. La ausencia de flujo colateral en la isquemia severa, impide el aporte de substratos metabólicos, así como favorece la acumulación de catabolitos en el tejido afectado (2).

Al momento que se elimina la obstrucción coronaria, hay una entrada abrupta de sangre que lleva oxígeno y nutrientes al tejido. A esta entrada de sangre al miocardio después de un periodo de isquemia, es a lo que denominamos reperfusión.

Debido al incremento en la disponibilidad de agentes trombolíticos y angioplastias coronarias la reperfusión temprana por medio de un globo para una revascularización de emergencia, ha llegado a ser una realidad práctica para muchos pacientes con infarto agudo del miocardio (3). Como

consecuencia de esta reperfusión, los pacientes desarrollan necrosis miocárdica con liberación de las enzimas creatina cinasa (CK) y lactato deshidrogenasa (LDH) (4) debido al estado de anaerobiosis de la células y a la permeabilidad de las membranas plasmáticas. Además, en el daño mediado por la reperfusión de corazones isquémicos, existen diversos eventos fisiológicos asociados entre los que destacan:

- 1) Arritmias.
- 2) Liberación marcada de enzimas hacia el torrente circulatorio.
- 3) Edema.
- 4) Contractura muscular.
- 5) Depleción de ATP.
- 6) Hinchamiento mitocondrial con presencia de gránulos electrodensos, posiblemente de fosfato de calcio.

La vulnerabilidad del corazón hacia los eventos antes mencionados debidos a la reperfusión, es favorecida por varios factores (5,6), incluyendo la formación de radicales libres derivados del oxígeno (7,8) y la sobrecarga de calcio (9). A partir del estudio de estos factores, se han planteado dos hipótesis para explicar los procesos celulares involucrados en el daño por reperfusión, la paradoja del oxígeno y la paradoja del calcio (fig. 1).

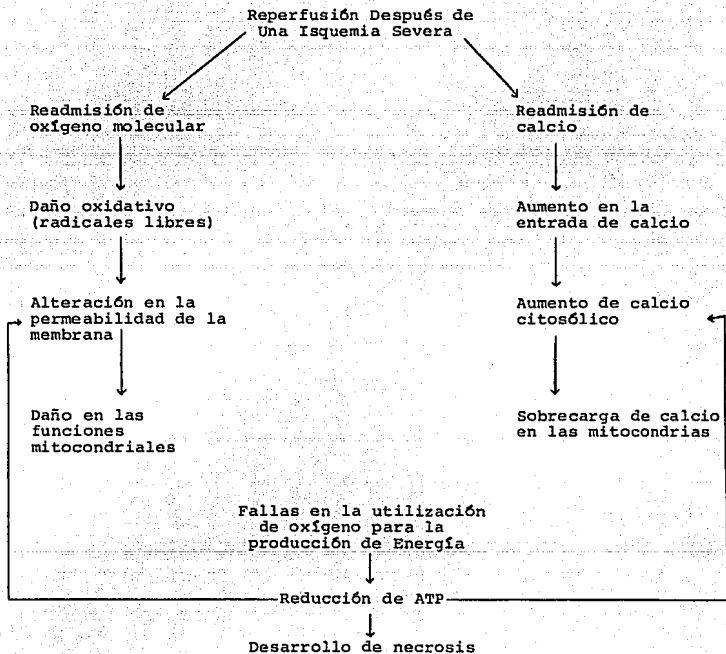


Fig. 1 Representación esquemática de los eventos moleculares que ocurren durante la reperusión post-isquémica. (En: Ferrari, R., et. al. 1986. Intracellular effects of myocardial ischaemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. *European Heart Journal* 7(Suppl. A)N3-12).

HIPOTESIS DE LA PARADOJA DEL OXIGENO

En esta hipótesis se propone que la repentina introducción del oxígeno, provoca daño por la formación de radicales libres derivados del oxígeno (fig. 2).

Los radicales libres ($\text{OH}\cdot$, $\text{O}\cdot^-$, O_2^-) se forman como producto de una variedad de reacciones normales que involucran la auto-oxidación y las reacciones catalíticas de varios sistemas enzimáticos, además de la agregación plaquetaria y la actividad fagocítica de los leucocitos (10,11).

Normalmente la acumulación de estos radicales libres es prevenida por la acción de varias enzimas atrapadoras de radicales libres (12,13,14). En diversos estados patológicos, la falta o el mal funcionamiento de los antioxidantes permiten la acumulación de metabolitos aberrantes del oxígeno. Los superóxidos (O_2^-), peróxidos de hidrógeno (H_2O_2), radicales hidroxilo ($\text{OH}\cdot$) y átomos de oxígeno ($\text{O}\cdot^-$), en exceso pueden combinarse con precursores peroxídicos [predominantemente ácidos grasos poli-insaturados, pero también carbohidratos, amino ácidos y DNA (15)] lo que provoca un daño biológico irreversible.

Debido al aumento en la permeabilidad de la membrana producida por la reperfusión, en las células hay una importante pérdida de glutatión, glutatión peroxidasa y superóxido dismutasa, elementos del sistema antioxidante que normalmente protegen de los efectos de la formación de radicales libres (11,16). Por lo anterior, se crean las condiciones por las cuales se forman el peróxido de hidrógeno y el altamente reactivo radical hidroxilo (17). El siguiente evento crucial desde el punto de vista de la

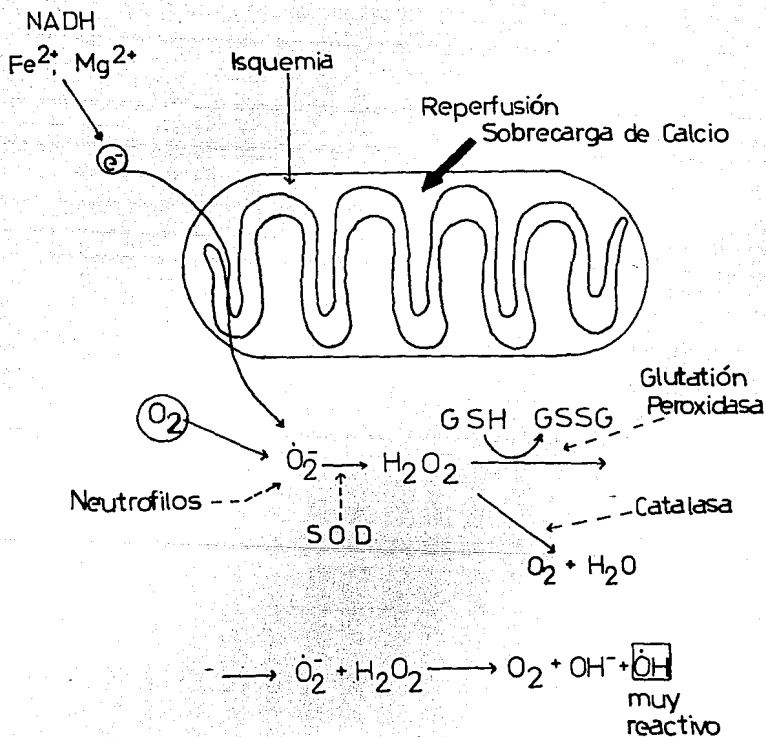


Fig. 2 Mecanismos de formación de radicales libres. Superóxido dismutasa (SOD), Glutathion reducido (GSH), Glutathion oxidado (GSSG). (En: Opie, L.H. 1989. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. Circulation 80 (4):1049-1062)

paradoja del oxígeno, es la lipoperoxidación. Este proceso daña el funcionamiento de las membranas, induciendo un estado de permeabilidad inespecífica a diversos elementos, entre los cuales se encuentra el calcio, provocando una sobrecarga del mismo (17).

HIPOTESIS DE LA PARADOJA DEL CALCIO

En esta hipótesis se postula una pérdida del control intracelular de la homeostasis del calcio, dando como resultado una sobrecarga de este ión dentro de la mitocondria. Esta acumulación de calcio produce daños membranales, y eventualmente muerte celular (Fig. 3).

El incremento en la concentración de calcio intramitocondrial se relaciona con una baja en la capacidad de generar ATP durante la reperfusión (18). Esto parece ser debido a que la actividad de algunas deshidrogenasas que regulan la producción energética aeróbica del metabolismo, son estrictamente dependientes de un estrecho margen de concentraciones de calcio intramitocondrial (19).

Como se propone en la hipótesis de la paradoja del calcio, durante la reperfusión se produce un marcado incremento en el calcio celular, principalmente en las mitocondrias y en el retículo sarcoplásmico (20); al mismo tiempo, el calcio citosólico disminuye. Esto implica, que las células intentan mantener su concentración de calcio citosólico incrementando su entrada desde el compartimiento extracelular. Se ha postulado que esta gran cantidad de calcio que entra a la célula durante la reperfusión es secuestrado por el retículo sarcoplásmico o por la mitocondria (20).

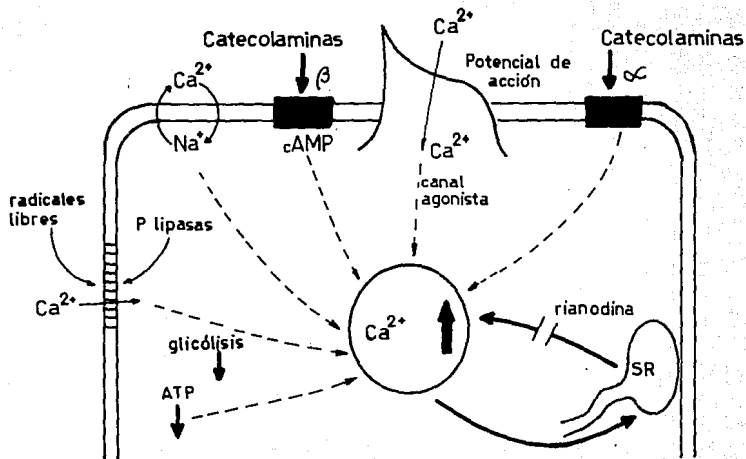


Fig. 3 Posibles mecanismo que explican la entrada masiva de calcio durante el periodo de reperfusión. (En: Opie, L.H. 1989. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. Circulation. 80(4):1049-1062)

La concentración de calcio en la célula, se eleva a niveles mucho mas altos durante la sístole, este grado de elevación del calcio, permite el desarrollo de contractura muscular por alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción.

Se ha propuesto un mecanismo para explicar la entrada de calcio a las células durante la reperfusión (fig. 3). El calcio puede entrar de una manera controlada a través de un canal de calcio o por un intercambiador sodio-calcio (16). La estimulación alfa o beta-adrenérgica también puede contribuir al aumento del calcio citosólico. Una entrada no controlada de calcio podría ser debida al resultado de alteraciones en el sacolema, ya sea por la actividad de fosfolipasas (P-lipasa) o bien por la acción de radicales libres.

Una propuesta para el desarrollo de arritmias debidas a la reperfusión es un aumento en el ciclo de entrada y una disminución importante en el ciclo de salida del calcio en las células (16).

En general, está bien aceptado que la sobrecarga de calcio, y el daño oxidativo, son los factores más importantes en el desarrollo del daño por reperfusión. Esto ha sugerido que la apertura de poros específicos o inespecíficos en las mitocondrias, además de la generación de radicales libres, puede ser reelevante para el establecimiento de este daño.

ANTECEDENTES

Se ha tratado de dilucidar lo que ocurre durante la reperfusión de un corazón isquémico, encontrándose que durante la reperfusión existe la formación de radicales libres de oxígeno, así como también sobrecarga de calcio intramitocondrial.

En los últimos años se han hecho diversos estudios tendientes a evaluar los efectos miocárdicos de atrapadores de radicales libres en modelos de corazón aislado y modelos de corazón *in vivo*. También se han ensayado diversas condiciones por medio de las cuales se pretende mantener la homeostasis del calcio durante los periodos de isquemia y reperfusión.

En el caso de los atrapadores de radicales libres, se ha reportado que estos no tienen efectos antifibrilatorios (3,16,21). Entre los atrapadores de radicales libres se reporta a la superóxido dismutasa (SOD), que aunque no es capaz de revertir el efecto arrítmico, sí puede reducir el tamaño del infarto (22). Sin embargo, la pérdida de creatina cinasa (CK), como indicador de daño miocárdico, no es reducida por SOD, ya que el contenido de CK en el miocardio al final de la reperfusión es casi el mismo en experimentos realizados con y sin SOD (21). También se ha evaluado el efecto de fármacos atrapadores de radicales libres. La administración de alopurinol como pre-tratamiento o durante la oclusión arterial en perros, reduce el tamaño del infarto (23), en otros estudios se han administrado Dimetilgliourea, Desferrioxame, Mercaptopropionil glicina, N-Acetilcisteina, etc., fármacos que han mejorado la función mecánica del miocardio (24), el

flujo sanguíneo, medido con Doppler (25), además de la microvasculatura endocárdica (26).

Por otra parte, también se han realizado varios estudios tendientes a conservar la concentración intracelular del calcio durante la reperfusión miocárdica. Estudios hechos por el grupo de Mitsuru Osada (3), reportaron que la reperfusión, en condiciones de hipocalcemia, no tiene efecto sobre la génesis de la fibrilación ventricular, sin embargo, si puede revertirla a un ritmo sinusal. Al evaluar los efectos de los antagonistas de calcio, por ejemplo, el D-600 en un modelo de corazón aislado de conejo, se observó que disminuye la salida de la enzima creatina fosfocinasa (CPK) durante la reperfusión. El consumo de oxígeno y la capacidad generadora de ATP por las mitocondrias, se mantuvieron en niveles normales. Por otro lado, la concentración de calcio y el almacenamiento del ATP endógeno se conservaron cerca de sus valores normales (27).

En un estudio realizado por Arteaga et al. (28), se introdujo al inmunosupresor Ciclosporina A (CSA) como una droga cardioprotectora. En tal estudio se analizó el efecto de la ciclosporina A (CSA) sobre la vulnerabilidad del corazón de rata a la taquicardia ventricular y las arritmias, durante la reperfusión que sigue a un periodo transitorio de isquemia. Cuando se administra 30 minutos antes de la oclusión de la arteria coronaria, la CSA disminuye significativamente la incidencia de arritmias ventriculares.

La protección por CSA contra el desarrollo de inestabilidad eléctrica en el corazón de rata en fase de reperfusión se relaciona con los bajos niveles de lactato deshidrogenasa y creatina cinasa encontrados en el plasma de las ratas tratadas con CSA. Debido a que durante la reperfusión hay una

marcada salida de estas enzimas, del tejido dañado al torrente circulatorio, estos experimentos indican que la CSA protege al tejido cardiaco del desarrollo del daño inducido por isquemia y reperfusión.

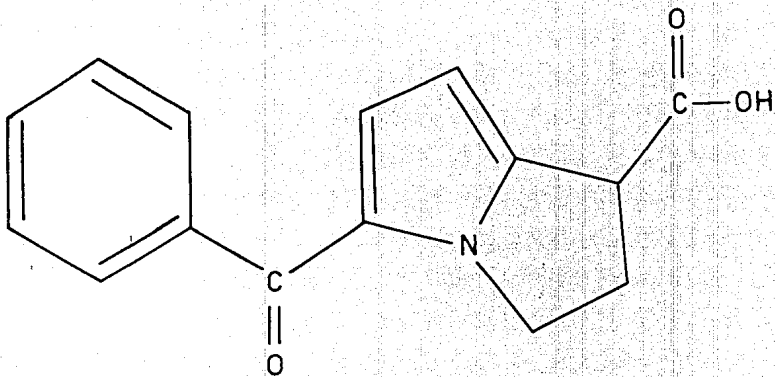
Se ha reportado que la CSA previene del daño inducido por sobrecarga de calcio en mitocondrias (28).

El daño celular letal producido por la reperfusión de un corazón isquémico puede ser mediado por la sobrecarga de calcio (16), como lo demuestran los experimentos realizados con la ciclosporina A (28). Basándonos en este y otros trabajos (18,19,27) en los que se apoya que el calcio juega un papel importante en la generación del daño inducido por la reperfusión, en este trabajo decidimos evaluar el efecto de otro compuesto capaz de evitar la sobrecarga del catión.

KETOROLAC

El Ketorolac, es una droga sintética que se emplea como anti-inflamatorio y analgésico (fig. 4), el cual induce su efecto terapéutico inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (29). Se sabe que el incremento de prostaglandinas circulantes causa hiperalgesia, por ejemplo, sensibilizando nociceptores para estimulación química o mecánica. Por esto, la terapia para atenuar el dolor producto de procesos inflamatorios, está dirigida hacia la inhibición de la síntesis y liberación de prostaglandinas, bloqueando la actividad de la enzima ciclo-oxigenasa. Recientemente se ha considerado que el calcio tiene un papel central en el fenómeno de la hiperalgesia (30), debido a que los iones de calcio estimulan la actividad de la fosfolipasa A₂, la cual provee al sustrato para que se lleve a cabo la síntesis de prostaglandinas. Además, también se ha establecido que el incremento en la sensibilización de los nociceptores, está asociado con la activación del AMPc, con el consecuente aumento en la concentración intracelular de calcio libre (30).

Reportes previos han demostrado que varios anti-inflamatorios no esteroideos (AINES) inducen movimientos de calcio a través de las membranas celulares (31).



(Ketorolac)

Fig. 4 Estructura química del Ketorolac.

HIPOTESIS

Si el Ketorolac es una droga que posee un grupo carboxilo, entonces el calcio podría unirse a este grupo para formar un complejo neutro, probablemente soluble en las membranas.

El pK del grupo carboxilo es 3.46, por lo que a pH fisiológico, la alta concentración de Ketorolac desprotonado permitiría un incremento en la unión del calcio.

Por la característica antes mencionada, el Ketorolac podría presentar propiedades ionofóricas para calcio y entonces podría evitar el daño producido por la isquemia y la reperfusión miocárdica, ya que se sabe que el daño por reperfusión es inducido por una sobrecarga de calcio en las mitocondrias.

OBJETIVOS

Estudiar al analgésico Ketorolac como una droga ionófora para calcio, en mitocondrias de riñón de rata, solventes hidrofóbicos y bicapas lipídicas.

Evaluar el efecto de este fármaco, en base a la generación y persistencia de las arritmias inducidas por la reperfusión de corazones isquémicos de rata, así como también su capacidad para mantener, aún después de un periodo de isquemia y posterior reperfusión, la integridad del corazón.

Introducir al analgésico Ketorolac en ratas normales a las que se induce oclusión y reperfusión de la arteria coronaria descendente anterior izquierda experimentalmente y analizar si se comporta como una droga ionófora para calcio, que previene del daño miocárdico inducido por la isquemia y la reperfusión.

MATERIAL Y METODOS

PREPARACION DE MITOCONDRIAS DE RIÑON DE RATA.

Se sacrificaron 21 ratas Wistar por dislocación cervical para extraerse los riñones, a los cuales se les separó la médula.

Las mitocondrias se prepararon según la técnica de Chávez et al. (32), por homogeneización del tejido cortical en 0.25 M sacarosa + 1mM EDTA (ácido etilendiamino tetraacético), ajustando a pH 7.3 con base Tris [Tris(hidroximetil)aminometano]. El homogenado se centrifugó a 800 g por 10 min, el sobrenadante se centrifugó nuevamente a 12,000 g por 10 min, el botón resultante se lavó en el medio de sacarosa, omitiendo el EDTA.

MOVIMIENTOS DE CALCIO EN LA MITOCONDRIA.

Se utilizó el indicador metalocrómico Arsenazo III para seguir los movimientos de calcio espectrofotométricamente a 685-675 nm (33). A un medio que contenía sacarosa 150 mM; KCL 50 mM; HEPES 10 mM; succinato 10 mM; ADP 200 μ M; $CaCl_2$ 100 μ M; Arsenazo III 100 μ M; rotenona 5 μ g, y oligomicina 5 μ g, se le agregaron 2 mg de proteína mitocondrial (n=3).

El contenido de calcio mitocondrial se analizó incubando a las mitocondrias con $^{45}CaCl_2$ (act. esp. 1300 cpm/nmol), después de 6 min de incubación, una alícuota de 0.2 ml se filtró a través de un filtro Millipore con

un diámetro de poro de 0.45 μm , la radioactividad retenida después del lavado y secado de los filtros fue medida en un contador de centelleo, los experimentos se hicieron por triplicado. La $K_{0.5}$ para el Ketorolac fue calculada por regresión lineal ($r=0.997$, ecuación: $Y= 0.0076769(X) + 0.0148634$).

RESPIRACION MITOCONDRIAL.

El análisis de la velocidad de respiración fue llevado a cabo polarográficamente con un electrodo tipo Clark acoplado a un registrador. La concentración de oxígeno disuelto en el medio de incubación (2 ml) fue estimado en 400 natomos/ml a 25°C, a la altitud de la Cd. de México (2240 m). A un medio de incubación que contenía sacarosa 250 mM; fosfato 1 mM; HEPES 10 mM; malato 10 mM y glutamato 10 mM, se le añadieron 2 mg de proteína mitocondrial. A este medio con la proteína se le añadieron ADP 0.5 mM y Ketorolac 264 μM . Los experimentos se hicieron por triplicado.

PREPARACION DE LIPOSOMAS.

Los liposomas fueron obtenidos utilizando asolectina extraída con acetona (34). Los lípidos secos fueron dispersados en un buffer acuoso, de 50 mM fosfato de trietanolamina, pH 7.0, a una concentración final de fosfolípidos de 30 mg/ml, y fueron sonicados hasta la claridad. La enzima citocromo oxidasa fue purificada de acuerdo a la técnica de Ramírez et al. (35) y se añadió a una concentración final de 0.25 mg/ml. La incorporación

de la enzima se llevó a cabo después de una sonicada suave de 10 seg. La suspensión fue dializada durante la noche a 4°C contra 250 volúmenes de 50 mM de fosfato, pH 7.0, y se pasó a través de una columna de Sefadex G-50 pre-equilibrada con 50 mM fosfato, 0.8% colato de sodio, 0.5% asolectina, pH 7.0. Las vesículas fueron colectadas por centrifugación a 100,000 g por una hora y luego resuspendidas en un buffer de diálisis.

ENSAYO DE CAPTACION DE CALCIO EN VESICULAS DE FOSFOLIPIDOS.

Los liposomas (1 mg) fueron incubados durante 5min en un medio que contenía 50 mM fosfato de potasio, pH 7.0, mas ascorbato 7.5 mM, TMPD(N,N,N',N'-tetrafenilmetilenediamina) 0.75 mM y 150 μ M de citocromo C. Además el medio contenía $^{45}\text{CaCl}_2$ 500 μ M (act. esp. 695cpm/nmol). En la reacción de captación, la reacción fue iniciada añadiendo 264 μ M de Ketorolac ó 0.5 μ M del ionóforo A23187. La determinación del calcio acumulado fue analizada utilizando la técnica de agregación por protamina y filtración (36), de la siguiente manera: después del tiempo de incubación se añadió 0.2 ml de una solución de protamina (4 mg/ml) para precipitar las vesículas, la muestra fue inmediatamente filtrada a través de un filtro millipore con un tamaño de poro de 0.45 μ m de diámetro. La radioactividad contenida después del lavado y secado de los filtros se midió en un contador de centelleo. Los experimentos se hicieron por triplicado.

DETERMINACION DEL POTENCIAL TRANSMEMBRANAL EN MITOCONDRIAS.

Cambios en el potencial transmembranal fueron seguidos espectrofotométricamente utilizando safranina a 533-511 nm (37). La calibración de la señal se llevó a cabo usando valinomicina-K⁺, el volumen intramitocondrial (1.1 µl/mg) fue determinado por un marcado doble con [³H]-H₂O y [¹⁴C]-carboxinulina. A un medio que contenía sacarosa 150 mM; KCl 50 mM; HEPES 10 mM; succinato 10 mM ADP 200 µM; CaCl₂ 100 µM; safranina 10 µM; EGTA 10 µM; rotenona 5 µg y oligomicina 5 µM, se le añadieron 2 mg de proteína mitocondrial. Al medio con la proteína se le agregó Ketorolac 264 µM, CCP 4 µM, Ca²⁺ 100 µM; Mg²⁺ 5mM o rojo de rubenio 0.16 µM. Los experimentos se hicieron por triplicado.

ENSAYO DE LA ACCION IONOFORICA DEL KETOROLAC.

Volúmenes equivalentes de fases orgánica y acuosa (1ml cada una) fueron agitados en un vórtex y centrifugados a 2500 rpm durante 10 min, la fase orgánica estaba formada de 55% tolueno y 45% n-butanol. La fase acuosa contenía HEPES 10 mM pH 7.3, además de diferentes concentraciones de ⁴⁵CaCl₂ y Ketorolac. La cantidad del catión transferido de la fase acuosa a la fase orgánica fue determinada midiendo la radioactividad contenida en alícuotas (0.05 ml) obtenidas de la fase orgánica.

En experimentos realizados utilizando un tubo-"U" (fig. 5), la fase orgánica contenía 5 ml de 60% cloroformo y 40% n-butanol, la solución se agitó lentamente con una barra magnética. En el brazo izquierdo, sobre la

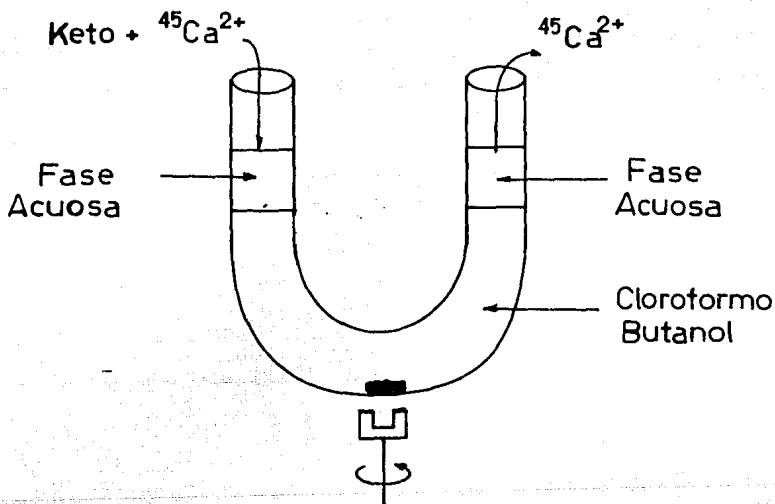


Fig. 5 Transporte de calcio por Ketorolac (Keto) a través de una fase orgánica.

fase orgánica, se agregó 1 ml de una solución que contenía Ketorolac 16mM y 600 μ M de $^{45}\text{CaCl}_2$ (act. esp. 1000 cpm/nmol). En el brazo derecho del tubo-"U", sobre la fase orgánica se colocó una solución acuosa que contenía EGTA 1 mM pH 7.3. La transferencia del catión de la fase acuosa del lado izquierdo, a la fase acuosa del lado derecho fue estimada midiendo la radiactividad en alícuotas de 0.05 ml.

ENSAYO DEL EFECTO DEL KETOROLAC DURANTE LA REPERFUSION MIOCARDICA.

40 ratas macho Wistar, aproximadamente de 300 g de peso, fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (55mg/kg vía intraperitoneal). Las ratas fueron mantenidas con respiración asistida por medio de una traqueotomía a razón de 2 cc de aire ambiental por cada 100 g de peso, a través de una bomba tipo Palmer para especies menores. Registros electrocardiográficos DII de superficie fueron tomados para monitorear la frecuencia cardíaca y sus cambios por medio de un polígrafo tipo Grass, modelo 79D, además se obtuvieron registros de presión sanguínea en una de las arterias femorales por medio de un transductor de presión Gould Statham. El Ketorolac obtenido de Syntex S.A. de C.V. de México, fue administrado 30 minutos antes de abrir el tórax, vía intravenosa a una dosis de 1 mg/kg peso (n=21). La droga se disolvió en solución salina (NaCl 0.9%). El grupo de ratas no tratadas (n=19) únicamente recibió solución salina (NaCl 0.9%). Pasados 30 minutos se abrió el tórax por una toracotomía del lado izquierdo, se localizó la arteria coronaria descendente anterior izquierda, la cual se ligó con una seda negra trenzada calibre 6-0

montada en una aguja atraumática. La arteria se ocluyó anudando la seda sobre un tubo de plástico de aproximadamente 1cm de largo para evitar desgarrar la arteria con la seda, el periodo de isquemia permaneció durante cuatro minutos y medio, al término del cual se retiró la oclusión, comenzando la reperfusión (28).

CUANTIFICACION DE ENZIMAS EN EL SUERO SANGUINEO.

Al final del experimento se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de las ratas no tratadas (n=4) y tratadas con Ketorolac (n=4) para la cuantificación de las enzimas lactato deshidrogenasa (LDH) y creatina cinasa (CK). Además, se obtuvieron muestras de suero sanguíneo de ratas a las que sólo se les practicó la operación sin provocar isquemia (n=3), para comparar los resultados obtenidos en los sueros problema con valores basales. La cuantificación de LDH se llevo a cabo siguiendo la reducción de NAD⁺ (8.6 mM) espectrofotométricamente a 340nm utilizando 50 mM de lactato como sustrato (38). La actividad de la creatina cinasa fue medida en un medio que contenía esencialmente, además del suero sanguíneo, 20 mM glucosa, 30 mM creatinfosfato, 2 mM ADP, 2 mM NADP, 6-U-hexoquinasa y 6-U glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. la cinética enzimática fue seguida espectrofotométricamente a 340 nm (38).

ANALISIS HISTOLOGICO.

Para el estudio histológico se utilizaron corazones de ratas no tratadas (n=6) y tratadas con Ketorolac (n=6). El tejido fue fijado en un

buffer de formol 10% durante 24 horas, pasado el tiempo de fijación, el tejido se deshidrató con diferentes concentraciones graduales de alcohol etílico, ya deshidratado se aclaró con xilol, se hicieron cortes de 3-4 μm y se tiñeron utilizando la técnica tricrómica de Masson para su observación posterior en el microscopio óptico.

ANALISIS ESTADISTICO.

Para comparar los resultados estadísticamente entre los diferentes grupos experimentales, se utilizó la prueba de t-student. Los valores se expresan como media + E. S. Los valores de $p < 0.05$ se consideraron significativos.

RESULTADOS

EFFECTO DEL KETOROLAC EN ALGUNAS FUNCIONES MITOCONDRIALES.

Se analizó el efecto del Ketorolac en el contenido de calcio mitocondrial, y los resultados se muestran en la fig. 6. La adición de Ketorolac a una concentración de 264 μM , a mitocondrias que contenían 125 nmol Ca^{2+} /mg proteína causó una rápida salida de calcio ($13.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). Cabe señalar que el medio de incubación no contenía fosfato. Sin embargo, cuando se añadió 1 mM fosfato al medio de incubación, aunque se acumuló una mayor cantidad de calcio ($\sim 150 \text{ nmol/mg}$), la adición, de Ketorolac solo indujo una salida parcial del catión, a una velocidad de $6.6 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. El incremento en la velocidad de liberación del calcio ($13 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), se alcanzó después de la adición de 20 μM de mersalil (Mers), que inhibe la acumulación de fosfato dentro de la mitocondria (39). El trazo C muestra que cuando el Ketorolac es añadido al medio de incubación antes de la adición de las mitocondrias, estos organelos acumulan calcio en menor cantidad, 60 nmol.mg. Sin embargo, la adición de 1 mM fosfato indujo un incremento transitorio en la entrada de calcio, seguida de una salida rápida del catión. En el trazo D (línea punteada) se muestra que la adición de 0.160 μM de rojo de rutenio que es un inhibidor del uniportador de calcio, no inhibe la salida de calcio inducida por Ketorolac. Esto indica que la salida de calcio no se llevó a cabo por un

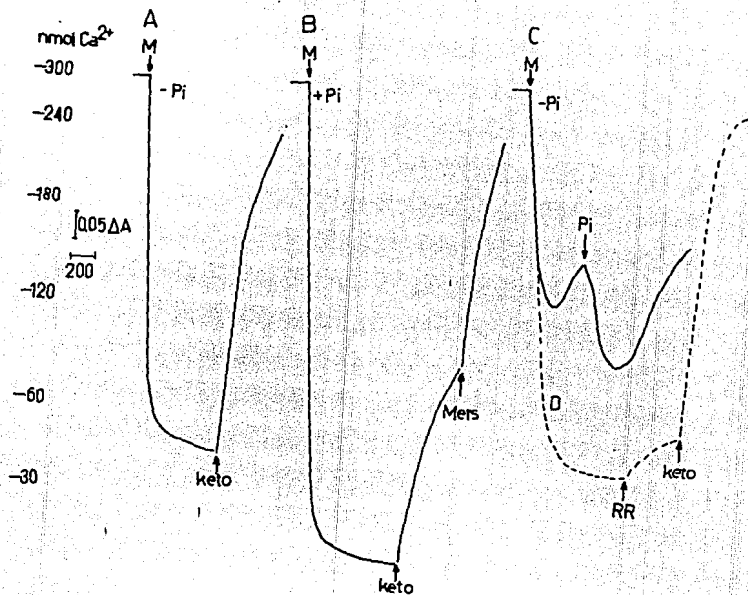


Fig. 6 Efecto del Ketorolac en el contenido de calcio mitocondrial de células corticales de riñón de rata. Mitochondrias (M), Fosfato (Pi), Ketorolac (Keto), Mersalil (Mers), Rojo de Rutenio (RR).

mecanismo reverso a través del uniportador de calcio en la membrana interna el cual es sensible al rojo de rutenio (40).

En el experimento de la figura 7, se observa (panel A), que cuando las mitocondrias fueron incubadas en la presencia de concentraciones crecientes de Ketorolac, de 66 a 528 μM , el calcio mitocondrial fue liberado de una manera dosis dependiente. La velocidad máxima de salida de calcio, $36 \pm 2.2 \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, fue lograda con 528 μM de la droga. En el panel B se describen los datos anteriores en forma de doble recíproca donde se determinó que la $K_{0.5}$ del Ketorolac para la salida mitocondrial de calcio, fue de 500 μM .

El efecto del Ketorolac en el contenido de calcio mitocondrial pudo ser causado por una acción tipo desacoplante de la droga, similar al efecto descrito para otros AINES (31,41). Para conocer si el Ketorolac actúa como un desacoplante, se realizaron los experimentos mostrados en la fig. 8, en el trazo B de esta figura, muestra que la adición de 264 μM de la droga a las mitocondrias no estimula la velocidad respiratoria ($12 \text{ nAo} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$), como en el control (Trazo A), y tampoco interfiere con la respuesta a la adición de ADP ($30 \text{ nAo} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$). El control respiratorio permanece similar al valor obtenido después de la adición del Ketorolac (2.5). Por lo tanto, la salida de calcio por efecto de la droga no fue debida a un corto circuito de protones a través de la membrana interna, como ocurre con los desacoplantes clásicos (42). Además, es importante señalar que el Ketorolac no inhibe el transporte de electrones en la cadena respiratoria.

En la fig. 9A se ilustra que la droga no induce el colapso del potencial negativo interno de la membrana, el cual tiene un valor de 200 mV. El (potencial transmembranal) bajó rápidamente después de la adición del

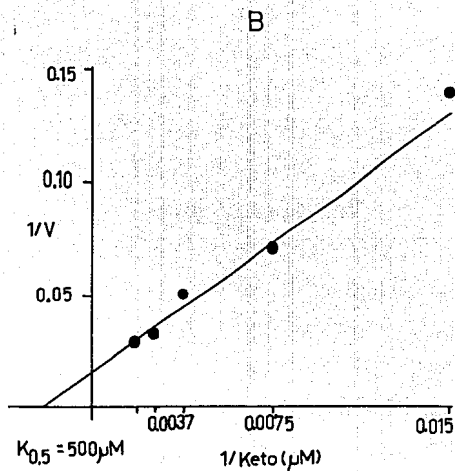
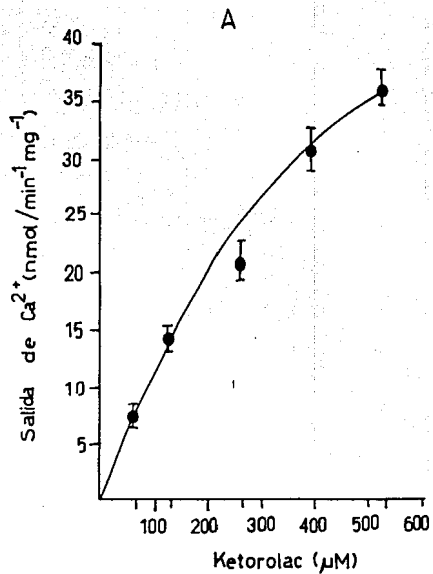


Fig. 7 Representación gráfica de la salida de calcio mitocondrial inducida por Ketorolac a diferentes dosis.

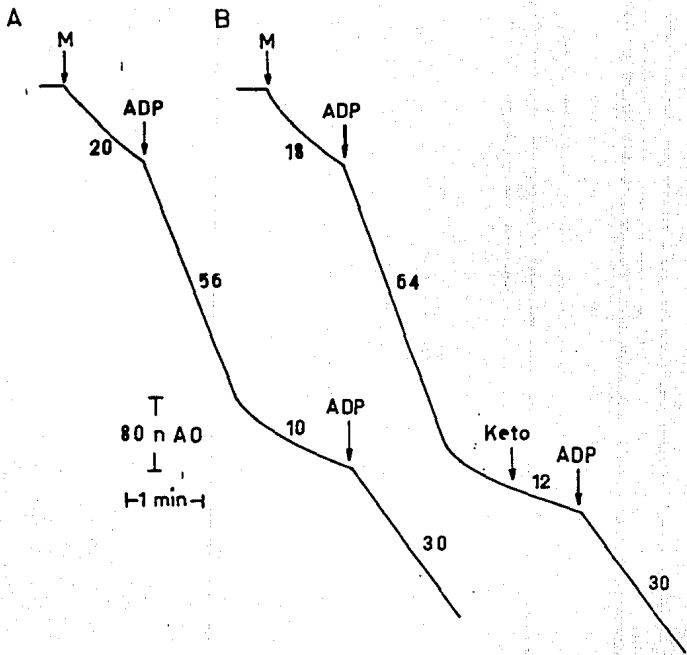


Fig. 8 Representación gráfica del análisis de la velocidad respiratoria por efecto del Ketorolac. Mitocondrias (M), Ketorolac (Keto).

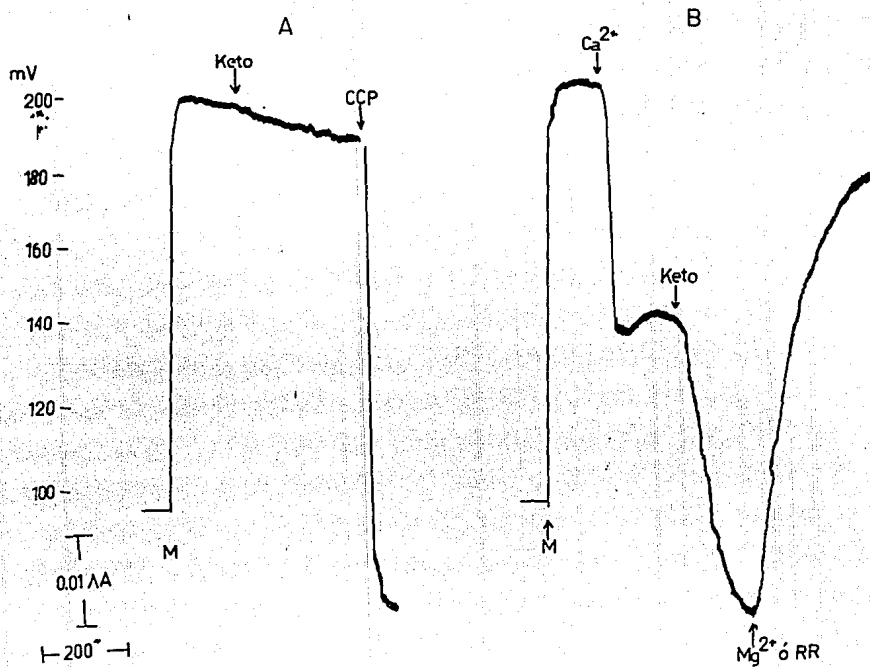


Fig. 9 Análisis del comportamiento del Potencial Transmembranal mitocondrial por efecto del Ketorolac. Mitocondrias (M), Ketorolac (Keto), Rojo de Rutenio (RR).

desacoplante CCP (carbonil cianida n-cloro fenil hidrazona). Sin embargo, cuando el Ketorolac fue añadido a mitocondrias que han acumulado calcio, el organelo rápidamente pierde su potencial transmembranal (Trazo B). Este efecto del Ketorolac fue similar al observado con otros agentes que inducen la salida de calcio (43), y ha sido atribuido a que estas drogas inducen un ciclo de calcio a través de la membrana (44,45).

La polarización de la membrana de aproximadamente 180 mV fue obtenida después de la adición de rojo de rutenio (RR) o Magnesio, los cuales inhiben la reentrada de calcio a la mitocondria (Fig. 9B). Tal repolarización de la mitocondria implica que el Ketorolac no induce daño en la membrana.

La alteración en la regulación del calcio a través de la membrana interna induce hinchamiento mitocondrial debido al aumento en la permeabilidad de esta última (44,45,46). La fig. 10A indica que en mitocondrias cargadas con calcio, el Ketorolac no impide el hinchamiento mitocondrial debido a la acumulación de calcio. En la fig. 10B observamos que la droga *per se* no fue capaz de producir un aumento en el volumen mitocondrial. En el trazo C se indica que el efecto combinado de Ketorolac-Ca²⁺, el cual induce hinchamiento mitocondrial, fue inhibido después de añadir 5 mM Mg²⁺.

Existe la posibilidad de que el Ketorolac actúe como un acarreador móvil para calcio, a través de la fase lipídica de la membrana interna. Para evaluar esta idea, el efecto de la droga en las funciones mitocondriales se analizó a 4°C para disminuir la fluidez de la membrana. En la figura 11 se indica que, bajo estas condiciones, el Ketorolac no induce la salida de calcio (Trazo A), colapso del (Trazo B), o hinchamiento mitocondrial

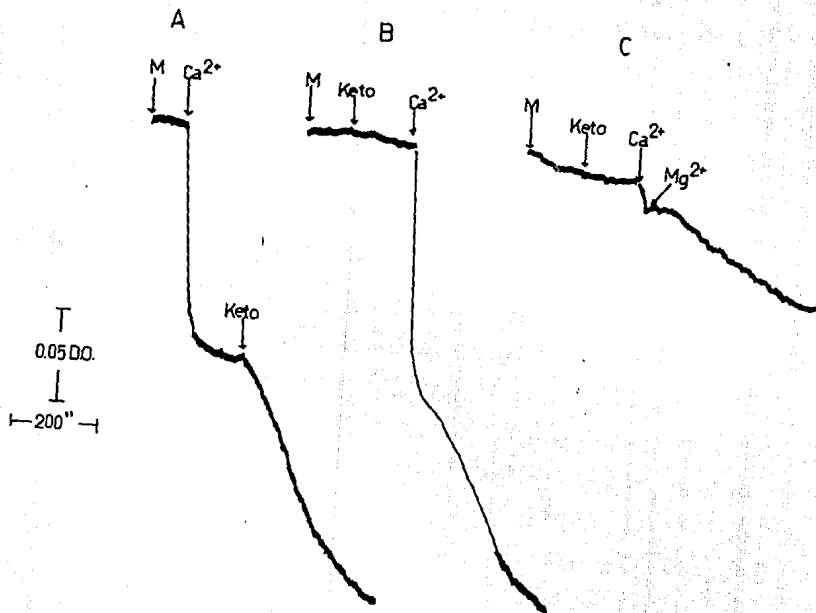


Fig. 10 Efecto del Ketorolac en el volumen mitocondrial. Mitochondrias (M), Ketorolac (Keto).

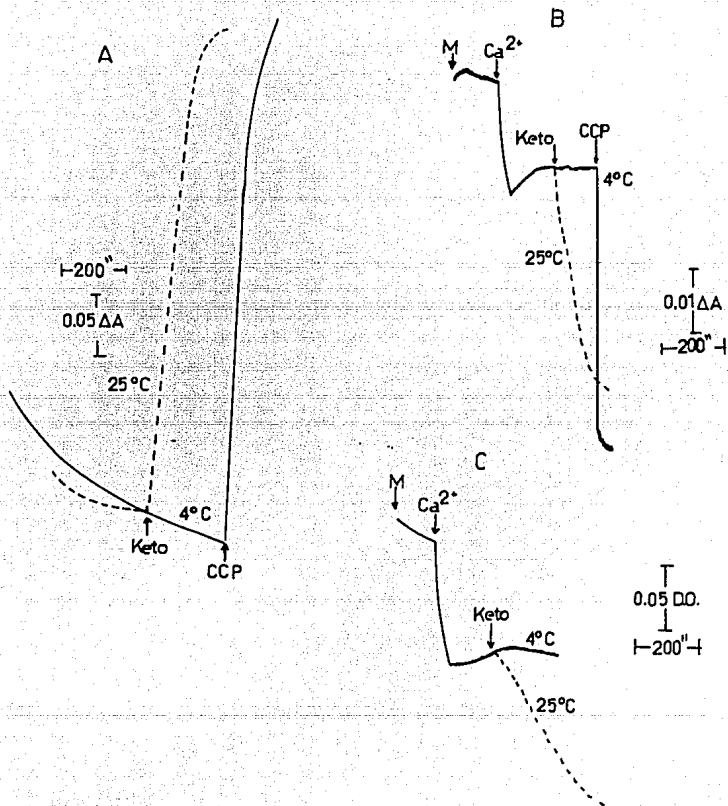


Fig. 11 Efecto del Ketorolac en las funciones mitocondriales a 4°C (línea continua) y a 25°C (línea punteada).
 A. Transporte de calcio
 B. Cambios en el Potencial Transmembranal
 C. Cambios en el volumen mitocondrial

(Trazo C). En comparación, las líneas punteadas muestran los trazos realizados a 25°C.

La función ionofórica requiere una alta fluidez de la membrana, por lo que los resultados anteriores apoyan la idea de que el Ketorolac es un acarreador móvil. La figura 12 muestra el efecto del ionóforo A23187, que es un ionóforo móvil clásico (47). Este ionóforo provoca la salida lenta de calcio cuando la temperatura se disminuye a 4°C.

EXPERIMENTOS DE TRANSPORTE DE CALCIO A TRAVES DE FASES ORGANICAS.

En la fig. 13 se muestra la representación gráfica a partir de la cuál se dedujo que el Ketorolac fue capaz de formar complejos neutros con el calcio en una solución no acuosa. Incrementando la concentración de calcio de 1 a 12 mM, el Ketorolac (4 mM) puede translocar al calcio de un medio acuoso a la fase formada por tolueno-butanol. La mayor cantidad promedio de calcio transferido fue de 73.3 ± 1.9 nmol. En el recuadro se muestran los valores de calcio transportado en una curva de doble recíproca, donde se indica la constante de afinidad, la cuál fue calculada en 4×10^{-3} .

La habilidad del Ketorolac para transferir calcio de un medio hidrofílico a otro, separados por una fase hidrofóbica constituida por cloroformo-butanol, se observa en el panel B. El transporte sigue una cinética sigmoideal con respecto al tiempo. El transporte máximo promedio de calcio, 109 ± 2.6 nmol, se alcanzó a las 10 horas.

Los experimentos mostrados en la fig. 14 indican que la transferencia de calcio a la fase hidrofóbica sigue una relación dependiente de las

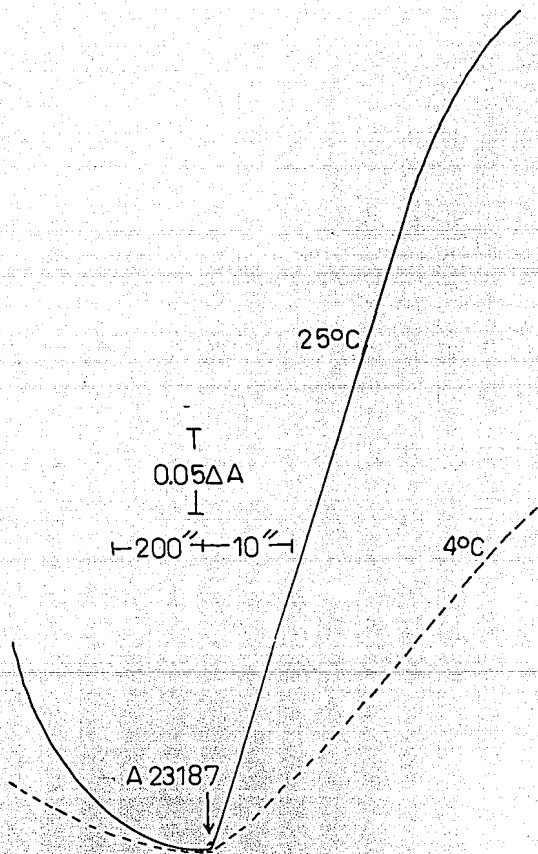


Fig. 12 Efecto del ionóforo A23187 en el contenido de calcio mitocondrial a diferentes temperaturas (4° v 25°C).

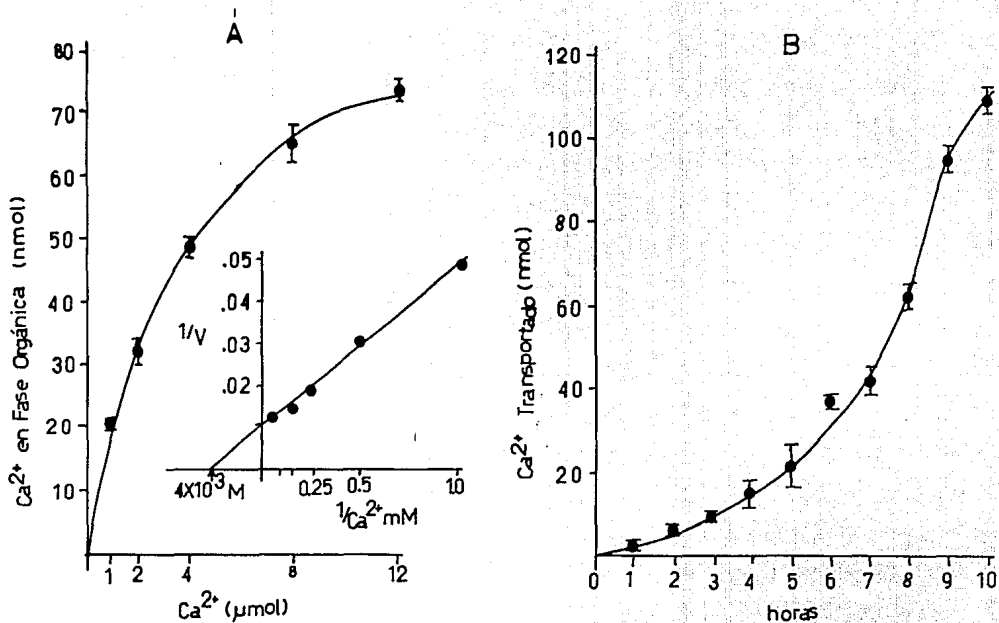


Fig. 13 Gráficas que representan la acción ionoforética del Ketorolac para iones de calcio. A. Transporte de calcio de una fase acuosa a una fase orgánica. B. Transporte de calcio de una fase hidrofílica a otra separadas por una fase hidrofóbica.

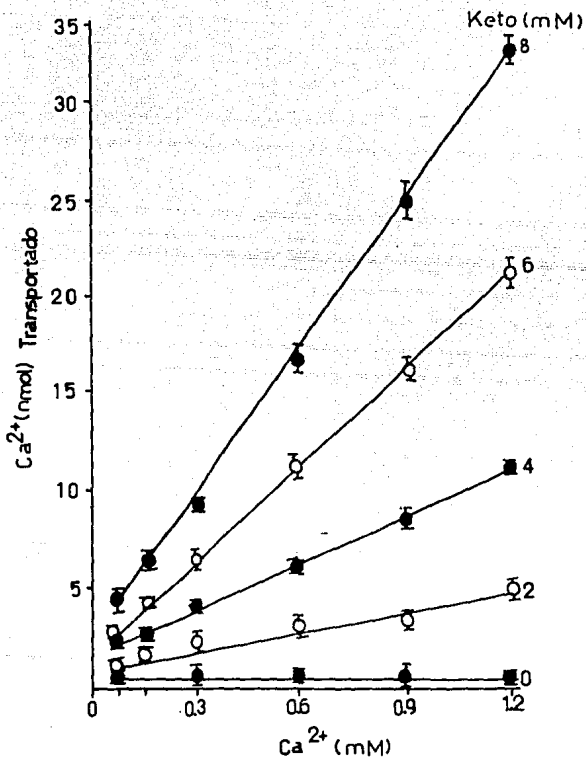


Fig. 14 Acción ionoforética del Ketorolac dependiendo de la concentración de droga y la concentración de iones de calcio.

concentraciones del catión y de la droga. A concentraciones crecientes del Ketorolac (2 a 8 mM), se transportó calcio dependiendo de la concentración del catión (0.075 a 1.2 mM). La máxima cantidad de calcio transportado, 32.91 ± 0.44 nM, fue alcanzada con Ketorolac 8 mM y calcio 1.2 mM.

La propiedad del Ketorolac como transportador de calcio fue ensayada también utilizando liposomas. La tabla 1 muestra la eficiencia del Ketorolac para inducir la acumulación de calcio en liposomas, siguiendo la formación de un potencial transmembranal negativo en el interior. Como se indica, la adición de 250 μ M Ketorolac da como resultado la entrada de 2.14 ± 0.13 nmol Ca^{2+} . En comparación 0.5 μ M del ionóforo neutro A23187 induce una entrada de 8.04 ± 0.32 nmol Ca^{2+} . Estos resultados apoyan la idea de la propiedad ionoforética del Ketorolac.

EFFECTO DEL KETOROLAC EN EL DAÑO INDUCIDO POR ISQUEMIA Y REPERFUSION MIOCARDICA.

De acuerdo a los resultados anteriores, el compuesto se ensayó en un modelo, en el cual se pierde la homeostasis del calcio y es necesaria la remoción de este catión, y así demostrar que el control de la concentración de calcio intramitocondrial disminuye el daño inducido por la reperfusión. A este respecto, se ha propuesto (26), que la acumulación de calcio en el miocito es el gatillo que dispara la cadena de procesos que llevan al daño miocárdico inducido por la isquemia y reperfusión.

Debido a esto se decidió estudiar la posibilidad de que el Ketorolac actuara como protector del daño inducido por reperfusión. Los resultados experimentales se muestran a continuación.

Tabla 1

Transporte de calcio al interior de vesículas de fosfolípidos inducido por Ketorolac.

Condiciones	Entrada de Ca^{2+}	Significancia vs. control
-Ketorolac	0.84 ± 0.01	
+250 μM Ketorolac	2.14 ± 0.13	$p < 0.01$
+0.5 μM A23187	8.04 ± 0.32	$p < 0.01$

Los registros electrocardiográficos de la fig. 15, muestran que durante el tiempo de oclusión, el corazón se mantiene en ritmo sinusal. Sin embargo, cuando la oclusión es retirada e inicia la reperfusión, se observa que en el grupo de ratas no tratadas se presentan arritmias ventriculares. Además, el registro de presión sanguínea periférica está completamente abatida. Las arritmias permanecen hasta el término del experimento (10 min después de la oclusión). En la fig. 16, se muestra que en el grupo de ratas tratadas con la droga, al restaurar el flujo coronario, se observan arritmias ventriculares que permanecen por aproximadamente 3 minutos. Durante este periodo de tiempo, intercalados con los latidos anormales (arritmias), se observan latidos normales. Estos se caracterizan por inducir un incremento en la presión sanguínea, mientras que durante los latidos anormales, solo observamos trazos de presión sanguínea hidrostática basal. Después de los 3 minutos de latidos intercalados, este grupo regresa completamente a ritmo sinusal, permaneciendo en este estado hasta el final del experimento.

El análisis cuantitativo muestra que en el grupo de ratas no tratadas (fig. 17), la frecuencia cardíaca se mantiene en 310 ± 11 lat/min, durante el tiempo de oclusión de la arteria coronaria. Al minuto 5, primer minuto del periodo de reperfusión, la frecuencia cardíaca se eleva a 600 ± 52 lat/min. Sin embargo el número de latidos normales, disminuyen hasta 70 ± 28 lat/min. Al minuto 6, la frecuencia cardíaca aumenta a 665 ± 52 lat/min, pero en comparación con la frecuencia cardíaca registrada en el minuto previo, los latidos normales desaparecen. Estos datos sugieren que después de la reperfusión, el corazón se contrae de una manera ineficiente y no es capaz de recuperarse.

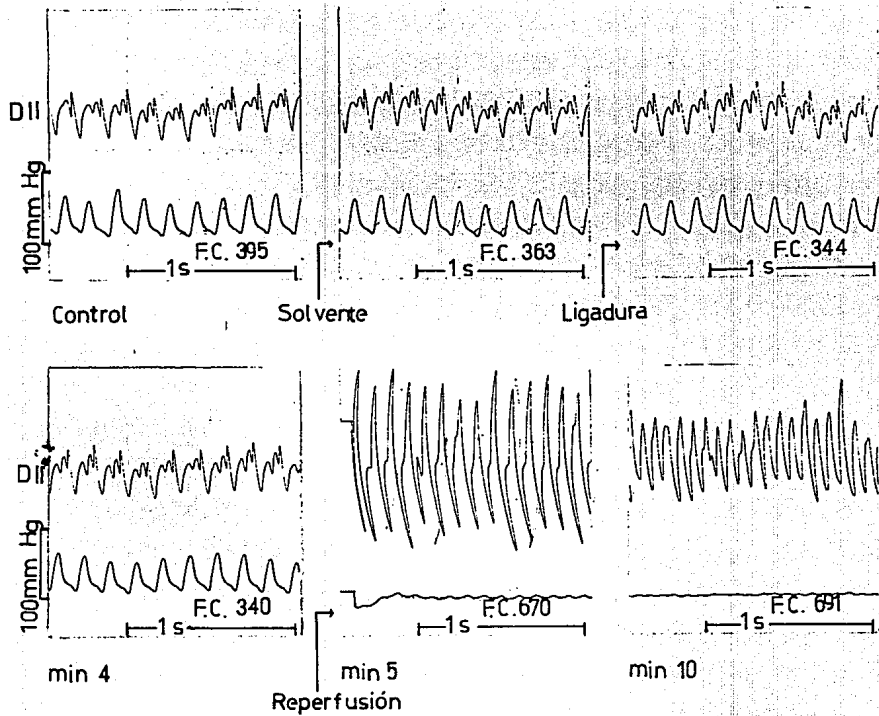


Fig. 15 Trazos electrocardiográficos y de presión arterial de experimentos en ratas no tratadas con Ketorolac con la aparición de arritmias cardiacas a los 5 seg de iniciada la reperfusión.

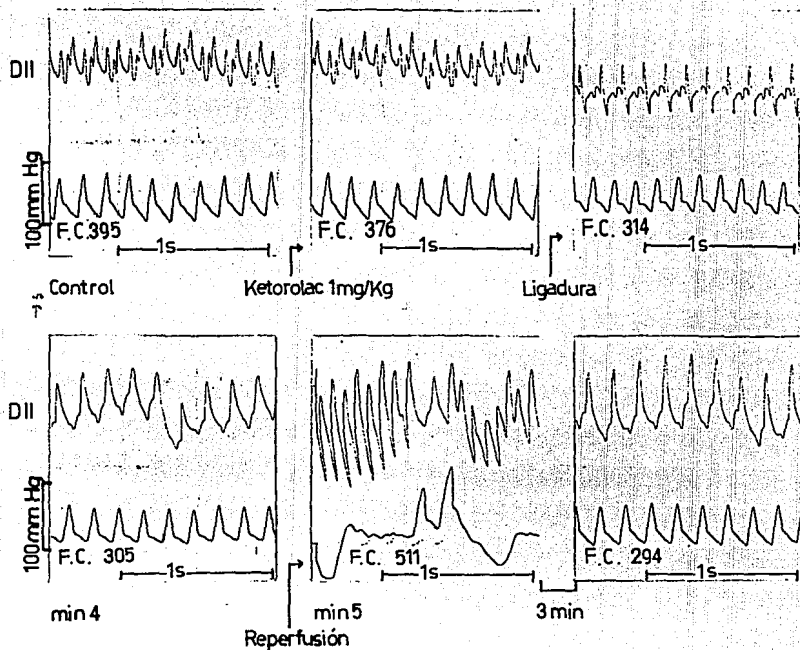


Fig. 16 Trazos de electrocardiograma y presión arterial de experimentos de ratas tratadas con Ketorolac, después de la reperfusión aparecen latidos normales y latidos anormales intercalados. 3 minutos después de iniciada la reperfusión desaparecen los latidos anormales.

Frecuencia
(Latidos/min)

Grupo de ratas no tratadas
n = 19

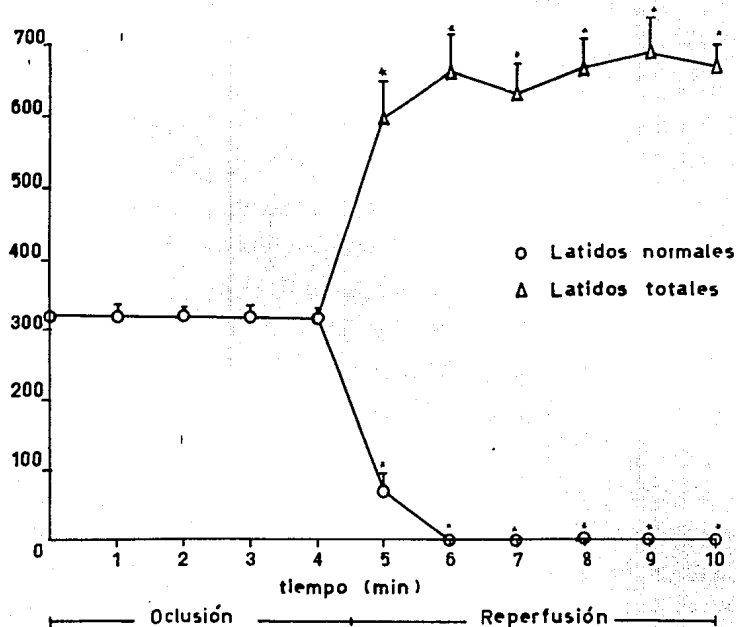


Fig. 17 Gráfica que muestra los cambios en la frecuencia cardiaca de ratas no tratadas durante el tiempo de occlusión y reperusión. * Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos durante la occlusión.

La fig. 18 muestra el análisis cuantitativo de la frecuencia cardiaca en el grupo de ratas tratadas con Ketorolac (1 mg/kg peso). Al igual que en el grupo no tratado, observamos que durante el periodo de oclusión de la arteria coronaria, la frecuencia cardiaca se mantiene alrededor de los 310 ± 15 lat/min. Al momento de retirar la ligadura, las arritmias aparecen con una frecuencia de 511 ± 46 lat/min. Sin embargo los latidos normales son dos veces mas frecuentes (130 ± 32 lat/min) que en el grupo no tratado (70 ± 28 lat/min), estos datos son estadísticamente significativos con una $p < 0.05$. Al minuto 6, los latidos totales disminuyen de 511 ± 46 a 416 ± 48 lat/min, en cambio los latidos normales aumentan de 130 ± 32 a 188 ± 37 lat/min. Conforme pasa el tiempo los latidos arrítmicos van desapareciendo, dando como resultado que la frecuencia estimada como latidos totales disminuya, acercándose lentamente a la frecuencia normal. A los 8 minutos después de la oclusión, aparecen únicamente latidos normales, en este momento los corazones de las ratas del grupo tratado con Ketorolac se encuentran nuevamente en ritmo sinusal.

En la figura 19, se muestra la representación gráfica de la frecuencia total de arritmias durante la reperfusión en ambos grupos (tratados y no tratados). En la gráfica observamos que en el grupo no tratado la frecuencia de arritmias ventriculares durante el tiempo de reperfusión es de 3785 ± 70 latidos, mientras que en el grupo tratado, la frecuencia de arritmias ventriculares es de 644 ± 74 latidos. La diferencia en la frecuencia de latidos arrítmicos es altamente significativa con una $p < 0.05$.

Para evaluar la preservación de la integridad tisular por el Ketorolac, se analizaron los niveles plasmáticos de las enzimas creatina cinasa y lactato deshidrogenasa.

Ketorolac 1 mg/Kg peso
n = 21

Frecuencia
(latidos/min)

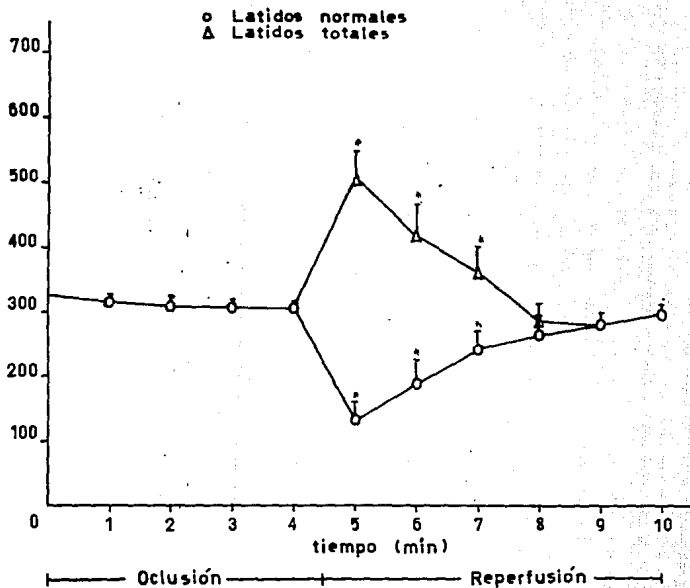


Fig. 18 Gráfica que muestra los cambios en la frecuencia cardiaca de ratas tratadas con Ketorolac (1mg/Kg peso) durante la oclusión y la reperfusión. *Las diferencias fueron estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos durante la oclusión.

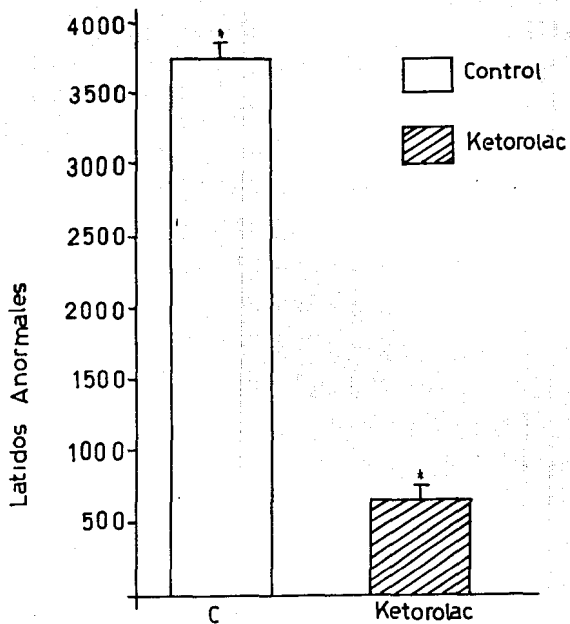


Fig. 19 Gráfica que muestra la frecuencia de latidos anormales totales en ambos grupos, las diferencias fueron estadísticamente significativas *p 0.05.

La tabla 2, muestra los valores obtenidos de la cuantificación de las enzimas CK y LDH en el suero sanguíneo de ratas tratadas (n=4) y no tratadas (n=4) con el Ketorolac.

En el caso de la CK observamos que los niveles de esta enzima se encuentran 5 veces más altos en los sueros de las ratas no tratadas (1742 UI/L) a comparación con los niveles encontrados en los sueros de las ratas del grupo tratado con Ketorolac (376 UI/L), con una diferencia estadísticamente significativa ($p < 0.05$).

Este mismo patrón lo observamos al cuantificar los niveles de la LDH, los cuales se encuentran 12 veces más altos en los sueros de ratas no tratadas (1434 UI/L) que en los sueros de ratas tratadas con Ketorolac (115 UI/L) con una $p < 0.05$.

Debido a que, cuando existe daño tisular estas enzimas son liberadas al suero, los resultados obtenidos señalan claramente que el Ketorolac protege al miocardio del daño tisular producido por la reperfusión (4,19).

Además de la importancia que implica la protección contra la disfunción eléctrica y la pérdida de enzimas debidas al efecto de la reperfusión, resultó interesante evaluar a nivel histológico, si este compuesto podría evitar la formación de bandas de contracción, edema y ondulación de fibras, fenómenos característicos en este tipo de daño (16,48).

La fig. 20 muestra los daños morfológicos antes señalados evidenciados con la técnica de Masson aplicada a un corte para microscopio óptico de corazón de una rata no tratada. En comparación, en la fig. 21 se observa que el corte del corazón de una rata tratada con Ketorolac no presenta un daño tan importante como en el corte del corazón de ratas no tratadas. En este corte del corazón de rata tratada con la droga podemos ver que las

Tabla 2

Concentración plasmática (UI/L) de las enzimas Deshidrogenasa Láctica (LDH) y Creatina Cinasa (CK) en ratas tratadas y no tratadas con Ketorolac.

Enzima	R E P E R F U S I O N		
	Basal	No Tratada	Ketorolac
LDH	225 [±] 50	1434 [±] 125*	115 [±] 70*
CK	458 [±] 39	1742 [±] 139*	376 [±] 33*

***Diferencias estadísticamente significativas p<0.05.**

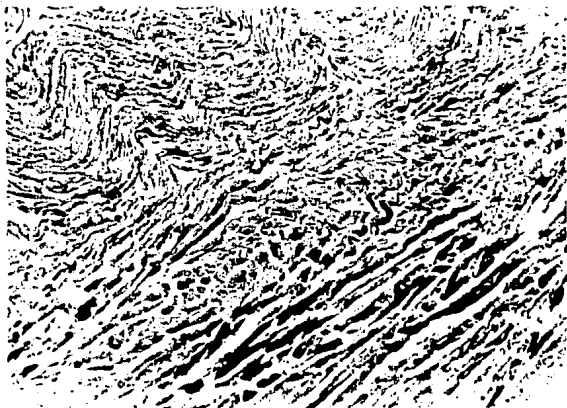


Fig. 20 Corte a 4 μm de corazón de ratas del grupo no tratado con Ketorolac (Massón 40x)

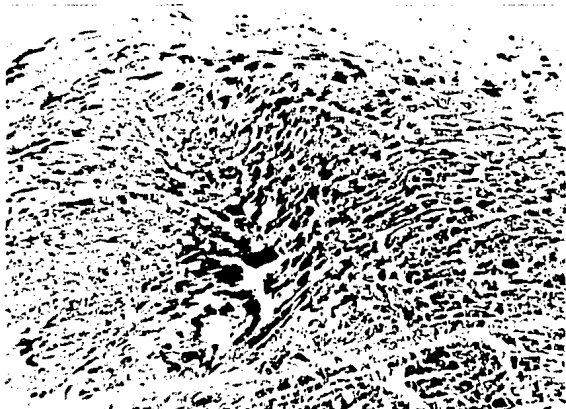


Fig. 21 Corte a 4 μm de corazón de ratas del grupo tratado con Ketorolac (Massón 40x)

fibras musculares mantienen su configuración estriada, no hay edema, ni ondulación de fibras, lo que implica también que a nivel histológico el daño tisular debido a la reperfusión ha sido efectivamente disminuido por el compuesto utilizado en este trabajo.

DISCUSION

El Ketorolac es una droga que actúa como algunos analgésicos inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (49). Un punto importante para el desarrollo de este trabajo fue el establecer si el Ketorolac presenta propiedades ionofóricas para el calcio y de esta manera poder evaluar el efecto de este fármaco en el modelo de reperfusión donde se necesita controlar la concentración de calcio intramitocondrial. El Ketorolac es una droga altamente hidrofílica (51), en contraste con los ionóforos clásicos (52). Sin embargo, la propiedad de esta droga para transportar calcio puede ser explicada debido a que este compuesto posee un grupo carboxilo, el cuál se puede unir al catión para formar un complejo neutro soluble en las membranas.

EFEECTO DEL KETOROLAC EN LAS FUNCIONES MITOCONDRIALES.

La habilidad del Ketorolac para transportar calcio a través de membranas biológicas fue demostrada debido a que promueve una salida rápida del catión acumulado en las mitocondrias. Es importante mencionar que ésta salida de calcio inducida por Ketorolac fue insensible a rojo de rutenio, esto implica que la salida de estos iones no fue a través del uniprotector de calcio, si no que se llevó a cabo a través de la fase lipídica. La no inhibición por rojo de rutenio descarta un efecto desacoplante del Ketorolac, ya que como se ha reportado (53,54), la salida de calcio mediada

por protonóforos es sensible a rojo de rutenio. El Ketorolac tampoco induce estimulación en la velocidad de respiración, ni colapsa el potencial transmembranal. Esta respuesta fue observada sólo cuando las mitocondrias fueron cargadas con calcio, esto corresponde a lo anteriormente descrito en la literatura, utilizando otros agentes que permiten la salida de calcio, y se ha atribuido a un reciclaje de calcio a través de la membrana (44,45,46).

La falta de efectos del Ketorolac en las funciones mitocondriales a 4°C, sugiere que el compuesto actúa como un acarreador móvil. Esto se basa en el hecho de que a temperaturas por debajo del punto de transición, la fluidez de la membrana se restringe (55) y en consecuencia, la movilidad de las moléculas solubles en la membrana disminuye. Se debe hacer notar que la velocidad de salida de calcio, inducida por el acarreador móvil A23187, fue igualmente disminuída a 4°C. Esta similitud entre el Ketorolac y el ionóforo A23187, refuerza la idea de que el Ketorolac es un acarreador móvil.

ACCION DEL KETOROLAC EN SOLVENTES HIDROFOBICOS Y BICAPAS LIPIDICAS.

Los experimentos con los solventes orgánicos, enfatizan las propiedades ionofóricas del Ketorolac. Es evidente que esta droga satisface el criterio por el cual los ionóforos clásicos se distinguen. La habilidad para formar un complejo con el catión, que sea soluble en un medio hidrofóbico se muestra en los datos mostrados en la fig. 13, donde se

muestra que el Ketorolac transfiere calcio de un medio acuoso a la fase tolueno-butanol.

La formación de un complejo soluble en medios hidrofóbicos también se observa entre el ionóforo A23187 y el calcio, este comportamiento ha sido estudiado mediante métodos de extracción en equilibrio (56). La habilidad para formar un complejo con el catión que sea soluble en los lípidos, es una condición necesaria para que la molécula actúe como un acarreador iónico. La capacidad para acoplarse y desacoplarse debe tener propiedades cinéticas favorables, para que el acarreador sea eficiente.

Los resultados obtenidos en los experimentos con el tubo-"U", apoyan la idea de que el Ketorolac posee la propiedad de acarrear calcio, como lo hace el ionóforo A23187 (47).

Además, los experimentos con liposomas apoyan también esta idea. En tales experimentos se demuestra que el Ketorolac se acopla con el calcio en un medio acuoso, luego transporta al catión a través del medio lipídico, como complejo neutro, y finalmente lo libera dentro del liposoma, siguiendo el potencial interno negativo de la membrana logrado por la oxidación del ascorbato-TMPD.

EFFECTO DEL KETOROLAC EN EL DAÑO POR REPERFUSION

El corazón normalmente es un órgano aeróbico con un bajo metabolismo anaeróbico. La restauración del aporte de oxígeno después de un evento isquémico transitorio, trae consigo la formación de radicales libres que provoca daño en la membrana. La generación de los radicales libres puede ser controlada según varios autores (23,25,26). Sin embargo,

aún controlando la generación de radicales, no hay garantía de que la sobrecarga de calcio no se lleve a cabo lo cual se considera la causa de la lesión permanente. Durante la isquemia, hay una depleción de las reservas de ATP, lo que induce que la ATPasa Na^+/K^+ deje de funcionar, esto a su vez produce un incremento en el sodio intracelular. Esta entrada de sodio a la célula es contrarrestada, aumentando la entrada de calcio, a través del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (57). Además de esta entrada, el calcio entra a la célula de manera "controlada" a través del canal lento de calcio (16). El aumento en la concentración de calcio intracelular, provoca la activación de proteasas y lipasas dependientes de calcio que destruyen la integridad membranal e incrementan la permeabilidad inespecífica (58). De esta forma aumenta aún más la concentración de calcio intracelular. Se ha propuesto que gran parte del calcio que entra a la célula es secuestrado por la mitocondria lo que genera la destrucción tisular.

En los últimos años se ha postulado que evitando la entrada masiva de calcio a la célula, se podría disminuir el daño que produce la sobrecarga de este catión (4,9,28).

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que el Ketorolac es una droga que posee propiedades ionofóricas para calcio, y debido a esta propiedad evita el daño inducido por la reperfusión de corazones isquémicos, ya que este compuesto no permite la sobrecarga de calcio en las mitocondrias, preservando de esta manera la integridad morfofisiológica del corazón.

Esto lo vemos apoyado con los registros electrocardiográficos, en los cuales se observa que el Ketorolac revierte la arritmias por reperfusión a ritmo sinusal (fig. 16). El hecho de que el Ketorolac revierta las arritmias a

rítmo sinusal, indica que al evitar la sobrecarga de calcio en las mitocondrias se permite que las células puedan restaurar los niveles de ATP, y así tratar de recuperar sus todas sus funciones.

También observamos que el Ketorolac, además de revertir las arritmias ventriculares a rítmo sinusal, también es capaz de disminuir la frecuencia de la fibrilación ventricular durante el tiempo de la reperusión a niveles muy bajos en comparación con el grupo que no recibió el tratamiento.

La pérdida de enzimas también se ve inhibida con la utilización de Ketorolac como protector. Una disminución en los niveles plasmáticos de las enzimas nos sugiere que la integridad de las membranas se ve preservada, al evitar la acción de fosfolipasas y proteasas dependientes de calcio. Esto evita que se pierda la continuidad de las membranas, y por lo tanto la marcada salida de las enzimas.

Otro parámetro empleado en la evaluación del efecto protector del Ketorolac, fue la determinación del daño histológico. En condiciones donde no se aplica tratamiento alguno, el estudio histológico muestra la aparición de bandas de contracción, edema, ondulación y elongación de fibras. Cuando el daño es totalmente irreversible se observan zonas de necrosis coagulativa (48).

En este trabajo encontramos que las muestras de tejido del grupo de ratas tratadas con Ketorolac, está mejor conservado, disminuyendo considerablemente el área dañada. Sin embargo, a pesar del tratamiento, se espera que el corazón presente un cierto grado de daño, el cual está dado por la isquemia y reperusión *per se*, y por el daño mecánico que se hace al manipular al corazón.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

El Ketorolac demostró ser un compuesto con propiedades ionofóricas para calcio.

El Ketorolac es un compuesto capaz de formar complejos neutros con el calcio y de esta manera movilizar al catión a través de las membranas.

Este compuesto no tiene ningún efecto adverso sobre las funciones mitocondriales estudiadas (potencial transmembranal, hinchamiento mitocondrial, velocidad de respiración).

Demostó ser un compuesto capaz de disminuir los daños funcional, bioquímico e histológico inducidos por la reperusión de corazones isquémicos.

Por lo tanto, es capaz de mantener la integridad funcional, bioquímica y morfológica del corazón, en condiciones de isquemia y posterior reperusión.

PERSPECTIVAS

De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, podemos afirmar que el anti-inflamatorio no esteroideo, Ketorolac, presenta propiedades ionofóricas para calcio.

Existen otros parámetros muy importantes los cuales deben ser considerados en estudios posteriores como lo es la cuantificación de los fosfatos de alta energía, la lipoperoxidación de las membranas debidas a radicales libres, factores que se espera volvieran a niveles normales o cercanos a ellos, cuando los animales fueran tratados con Ketorolac.

En este trabajo el Ketorolac fue administrado como pre-tratamiento. Es importante saber si este compuesto es capaz de evitar el daño administrado al momento de la reperfusión.

Es importante también que se hagan estudios en otros modelos animales donde se puedan inducir los problemas que se encuentran en los pacientes que son reperfundidos con trombolíticos o angioplastías.

Este compuesto también se podría ensayar simulando las condiciones que se dan cuando hay una operación a corazón abierto, donde también se observan las alteraciones producidas por la reperfusión.

En base a esto, proponemos que el Ketorolac podría aplicarse en un futuro no muy lejano en pacientes que han sido sometidos a trombolisis, angioplastía coronaria ó bypass, procedimientos que implican la reperfusión de corazones isquémicos, ya que evita algunos de los efectos negativos asociados con la reperfusión.

No se debe olvidar que los radicales libres también juegan un papel muy importante en este daño. Lo que lleva a pensar en hacer estudios de terapia combinada entre medicamentos que se sabe pueden regular la homeostasis del calcio, como el Ketorolac y medicamentos que eviten la formación de radicales libres, como el Captopril. De esta manera se podría atacar el problema por dos de sus importantes mecanismos de acción.

Lo que no hay que perder de vista en el daño inducido por reperfusión, es que si las células cardiacas han sido irreversiblemente dañadas, ni los atrapadores de radicales libres, ni los bloqueadores de los receptores alfa-adrenérgicos, ni los ionóforos ó los antagonistas de calcio, ni la hipotermia, podrían restaurar la integridad de la membrana o, reabastecer de fosfatos de alta energía a la célula, condiciones esenciales para la viabilidad de esta última.

Por lo que, intervenciones aplicadas al tiempo de la reperfusión podrían mejorar la recuperación anatomofuncional y disminuir el daño.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Guyton, A. C. La Circulación. En: Tratado de Fisiología médica. ed. Interamericana, España pp. 245-253.
- 2) Jening, R. F., Reimer, K. A., Sleenbergen, C. 1986. Myocardial Ischemia Revisited. The osmolar load, membrane damage and reperfusion. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 18:769-780
- 3) Osada, M., Sato, T., Kamoris, S., Tamura, K. 1991. The role of oxygen free radicals and extracellular calcium ions in reperfusion-induced arrhythmias. *Japanese Circulation Journal*. 55:609-616.
- 4) Marsh, J. D., Smith, T. S. 1991. Calcium overload and Ischemic Myocardial Injury. *Circulation*. 83(2):709-711.
- 5) Sheridan, D. J., Penkoske, P. A., Sobel, B. E., Corr, P. B. 1980. Alpha adrenergic contribution to dysrhythmias during myocardial ischemia and reperfusion in cats. *Journal of Clinical Investigation*. 65:161-167.
- 6) Hill, J. L., Gettes, L. S. 1980. Effect of acute coronary artery occlusion on local myocardial extracellular K^+ activity in swine. *Circulation*. 61:768-773.
- 7) Robert, A. K., Karin, P., Peter, W. 1989. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. *Circulation*. 80:1115-1120.
- 8) Bernier, M., Hearse, D. J., Manning, A. S. 1986. Reperfusion induced arrhythmias and oxygen derived free radicals. *Circulation Research*. 58:331-339.
- 9) Tosaki, A., Hearse, D. J. 1987. Protective effect of transient calcium reduction against reperfusion-induced arrhythmias in rat hearts. *American Journal of Physiology*. 253:H225-H231.

10) Krinsky, N. I., Scoon, K. L., Hadin, J. C., Levin, P. H. 1977. Source of hydrogen peroxide and of chemiluminescence observed in activated human platelet preparations. *Journal of Hematology*. 50:597-602.

11) Weening, R. S., Wever, R., Roos, D. 1975. Quantitative aspects of the production of superoxide radicals by phagocytizing human granulocytes. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*. 85:245-252.

12) Caldarera, C. M., Davalli, P., Guarnieri, C. 1978. Effect of alpha-tocopherol and sodium selenite on post-anoxic reoxygenated rat hearts. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 10(Suppl):16-25.

13) Dillard, C. J., Kunert, K. J., Tappel, A. L. 1982. Effects of vitamin E, ascorbic acid and mannitol on alloxan induced lipid peroxidation in rats. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 216:204-212.

14) Guranieri, C., Ferrari, R., Visoli, O., Caldarera, C. M., Mayles, W.G. 1978. Effect of alpha-tocopherol on hypoxic perfused and reoxygenated rabbit heart muscle. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 10:893-906.

15) Gutteridge, J. M. C. 1981. Thiobarbituric acid-reactivity following iron-dependant free radical damage to amino-acids and carbohydrates. *FEBS Letters*. 128:343-346.

16) Ople, L. H., Phil, D. 1989. Reperfusion injury and its pharmacologic modification. *Circulation*. 80(4):1049-1062.

17) Liedtke, A. J., Mahar, C. Q., Ytrehus, K., Mjos, O. D. 1984. Estimates of free-radical production in rat and swine hearts: method and application of measuring malondialdehyde levels in fresh and frozen myocardium. *Basic Research in Cardiology*. 79:513-318.

18) Nayler, W. G. 1981. The role of calcium in the ischemic myocardium. *American Journal of Pathology*. 102:262-270.

19) Samoullidou, E. C., Levis, G. M., Darsinos, J. T., Pisteros, A. C., Karli, J. N., Tsiganos, C. P. 1991. Effect of low calcium on high-energy phosphates and sarcolemmal Na^+/K^+ -ATPase in the infarcted reperfused heart. *Biochemica et Biophysica Acta*. 1070:343-348.

20) Jennings, R. B., Ganote, C. 1976. Mitochondrial structure and function in acute myocardial ischemic injury. *Circulation Research*. 38(Suppl I):I80-I91.

21) Hever, H. J., Muller, E., Bernauer, W. 1988. Differential effects of superoxide dismutase on high energy phosphates, creatine kinase release, and arrhythmias during post-ischemic reperfusion in isolated rat hearts. *Basic Research in Cardiology*. 83:149-157.

22) Ambrosio, G., Becker, L. C., Hutchins, G. M. 1986. Reduction in experimental infarct size by recombinant human superoxide dismutase: insights into the pathophysiology of reperfusion injury. *Circulation*. 74:1424-1433.

23) Chambers, D. E., Parks, D. A., Patterson, G. 1985. Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 17:145-152.

24) Ceconi, C., Curello, S., Cargnoni, A. 1988. The role of glutathione status in the protection against ischaemic and reperfusion damage. Effects of N-Acetyl Cysteine. *Journal of Molecular and Cell Cardiology*. 20:5-13.

25) Bolli, R., Patel, B. S., Zhu, W-X. 1987. The iron chelator desferrioxamine attenuates postischemic ventricular dysfunction. *American Journal of Physiology*. 253:H1372-H1380.

26) Przyklenk, K., Kloner, R. A. 1989. "Reperfusion injury" by oxygen-derived free radicals: Effect of superoxide dismutase plus catalase, given at the time of reperfusion, on myocardial infarct size, contractile function, coronary microvasculature and regional myocardial blood flow. *Circulation Research*. 64:86-96.

27) Ferrari, R., Boffa, G. M., Ceconi, C., Curello, S., Boraso, A., Ghielmi, S., Cargnoni, A. 1989. Effect of D-600 on ischemic and reperfused rabbit myocardium relation with timing and modality of administration. *Basic Research in Cardiology*. 84:606-622.

28) Arteaga, D., Odor, A., Lopez, R. M., Contreras, G., Pichardo, J., García E., Aranda, A., Chávez, E. 1992. Impairment by Cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sciences*. 51:1127-1134.

- 29) Arteaga, D., Valenzuela, F. 1988. Papel de las prostaglandinas en la inflamación, en la función renal y en la preservación de la mucosa gástrica y consecuencias del bloqueo de su síntesis. *Revista Mexicana de Reumatología*. 4:97-102.
- 30) Baños, G., Reyes, P. A. 1989. A comparative study of the effect of ten non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) upon some mitochondrial and platelet functions. *International Journal of Biochemistry*. 21:1387-1394.
- 31) Micaela, M., Buckley, T., Brogden, R. 1990. Ketorolac. A review of its pharmacodynamic and pharmacokinetic properties, and therapeutic potential. *Drugs*. 39(1):86-109.
- 32) Chávez, E., Briones, R., Michel, B., Bravo, C., Jay, D. 1985. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: Studies with cadmium. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 242:493-497.
- 33) Kendrick, N. C. 1976. Purification of Arsenazo III, a Ca^{2+} - sensitive dye. *Annals of Biochemistry*. 76:487-501.
- 34) Zazueta, C., Holguín, J. A., Ramírez, J. 1991. Calcium transport sensitive to ruthenium red in cytochrome oxidase vesicles reconstituted with mitochondrial proteins. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 29:889-902.
- 35) Ramírez, J., Calahorra, M., Peña, A. 1987. Variations on the "Dilution" method for reconstituting cytochrome oxidase into membrane vesicles. *Annals of Biochemistry*. 263:100-106.
- 36) Rosier, R. N., Gunter, T. E. 1980. Calcium uptake by cytochrome oxidase vesicles. *FEBS Letters*. 109:99-103
- 37) Akerman, K. E. O., Wikstrom, M. F. K. 1976. Safranin as a probe of the mitochondrial membrane potential. *FEBS Letters*. 68:191-197.
- 38) Entman, M. L., Michel, L., Rosse, R. D., Dreyed, W. J., Anderson, D. C., Taylor, A. A., Smith, W. 1991. Inflammation in the course of early myocardial ischemia. *FASEB Journal*. 5:2529-2537.

39) Papa, S., Lofrumento, N. E., Quagliariello, E., Meijer, A. J., Tager, J. M. 1970. Coupling mechanisms in anionic substrate transport across the inner membrane of rat liver mitochondria. *Bioenergetics*. 1:287-307.

40) Moore, C. 1971. Specific inhibition of mitochondrial Ca^{2+} transport by ruthenium red. *Biochemistry and Biophysics Research Communications*. 42:298-305.

41) Chávez, E., Bravo, C., Cruz, H. A., Reyes, P. A. 1985. Ionophoretic-like action of Diflunisal. *Life Science*. 37:1491-1498.

42) Mitchell, P., Moyle, J. 1969. Estimation of membrane potential and pH difference across the cristae membrane of rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry*. 7:471-484.

43) Gunter, T. E., Pfeiffer, D. R. 1990. Mechanisms by which mitochondria transport calcium. *American Journal of Physiology (Cell Physiology)* 27:C755-C786.

44) Broekemeier, K. M., Pfeiffer, D. R. 1989. Cyclosporin A-sensitive and insensitive mechanisms produce the permeability transition in mitochondria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 163:561-566.

45) Chávez, E., Moreno-Sánchez, R., Zazueta, C., Reyes-Vivas, H., Arteaga, D. 1991. Intramitochondrial K^{+} as activator of carboxyatractyloside-induced Ca^{2+} release. *Biochemical and Biophysical Acta*. 1070:461-466.

46) Halestrap, A. P., Davidson, A. M. 1990. Inhibition of Ca^{2+} -induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial-matrix peptidyl-prolyl-cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochemistry Journal*. 268:153-160.

47) Pfeiffer, D. R., Taylor, R. N., Lardy, H. A. 1978. Ionophore A23187: Cation binding and transport properties. *Annals of the New York Academy of Science*. 307:420-423.

48) Ashraf, M., Sybers, H. D. 1975. Scanning Electron Microscopy of the heart after Coronary Occlusion. *Laboratory Investigation*. 32(2):157-162.

- 49) Rooks, W. H. 1990. The pharmacologic activity of Ketorolac Tromethamine. *Pharmacotherapy*. 10:305-325.
- 50) Ferreira, S. H. 1981. Inflammatory pain, prostaglandin, hyperalgesia and the development of peripheral analgesics. *Trends in Pharmacological Science*. 2:183-286.
- 51) Mrosczac, E. J., Jung, D., Yee, J., Bynum, L., Sevelius, H., Massey, I. 1990. Ketorolac tromethamine pharmacokinetics and metabolism after intravenous, intramuscular and oral administration in humans and animals. *Pharmacotherapy*. 10:335-395.
- 52) Eisenman, G., Szabo, G., McLaughlin, S. G. A., Ciani, S.M. Molecular basis for the action of macrocyclic carriers on passive ionic translocation across lipid bilayer membranes. En: *Membrane structure and Mechanisms of Biological Energy Transduction*. ed. Avery, J., Plenum Press, Londres y Nueva York pp.295-350, 1973.
- 53) Bernardi, P., Azzone, G. F. 1979. pH induced calcium fluxes in rat liver mitochondria. *European Journal of Biochemistry*. 102:555-562.
- 54) Saris, N. E. L. 1987. Non-respiring rat liver mitochondria do not have a $\text{Ca}^{2+}/2\text{H}^{+}$ antiporter. *Acta Chemistry of Scandinavia*. 41:79-82.
- 55) Lenaz, G. Lipid-protein interactions in the structure of biological membranes. En: *Membrane structure and mecanisms of Biological Energy Transduction*. ed. Avery, J. Plenum Press, Londres y Nueva York. pp.455-526,1973.
- 56) Reed, P. W., Lardy, H. A. 1972. A23187: A divalent cation ionophore. *Journal of Biological Chemistry*. 247:6970-6977.
- 57) Tani, M., Neely, J. R. 1989. Role of Intracellular Na^{+} in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat heart. Possible involvement of $\text{H}^{+}\text{-Na}^{+}$ and $\text{Na}^{+}\text{-Ca}^{2+}$ Exchange. *Circulation Research*. 65:1045-1056.
- 58) Nayler, W. G., Elz, J. S. 1986. Reperfusion injury: Laboratory artifact or clinical dilemma? *Circulation*. 74:215-221.