
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE MEDICINA

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PROGRAMA DE MAESTRIA Y DOCTORADO EN CIENCIAS MÉDICAS

INSTITUTO NACIONAL DE CARDIOLOGÍA "IGNACIO CHÁVEZ"

"BASES MOLECULARES DEL POST-ACONDICIONAMIENTO MIOCÁRDICO: PAPEL DE LAS ENZIMAS ANTIOXIDANTES"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

P R E S E N T A

JUAN FRANCISCO ARREGUIN PORRAS

TUTOR DE TESIS

DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZABAL



SEPTIEMBRE 2012



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 esta 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 GENERAL

I	Abreviaturas.....	1
II	Resumen.....	3
III	Abstract	5
IV	Introducción.....	7
V	Marco Teórico:	
	1. Daño por reperfusión: Aspectos experimentales y traducción clínica.....	8
	2. Mecanismos de daño por reperfusión	
	2.1) Estrés oxidante y especies reactivas de oxígeno	10
	2.2) Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno formados en la isquemia-reperfusión.....	10
	3. Enzimas antioxidantes	
	3.1) Superóxido dismutasa.....	14
	3.2) Catalasa.....	14
	3.3) Glutación peroxidasa.....	15
	3.4)Hipótesis de la Regulación transcripcional y actividad enzimática de las enzimas antioxidantes en la isquemia-reperfusión.....	16
	4. Estrategias cardioprotectoras:	
	4.1) El post-acondicionamiento miocárdico.....	17
	4.2) Hipótesis de la Regulación de la Cardioprotección por los Radicales Libres.....	19
VI	Metodología	
	1. Hipótesis.....	21
	2. Objetivos.....	21
	3. Justificación y relevancia.....	22
	4. Tipo dediseño.....	22
	5. Muestra.....	22
	6. Criterios de Inclusión y exclusión.....	22

7. Variables.....	22
8. Recursos Materiales y Humanos.....	23

VII Desarrollo Experimental

1. Extracción de corazón de rata Wistar y montaje en el sistema de reperfusión Langendorff.....	24
2. Oxidación de proteínas.....	26
3. Determinación de malondialdehído.....	27
4. Medición de la cantidad relativa de enzimas antioxidantes mediante western blot.....	28
5. Medición cualitativa de la transcripción de los genes de las enzimas antioxidantes mediante PCR.....	28
6. Medición de la actividad de las enzimas antioxidantes.....	29
6.1 Glutación	29
6.2 Glutación Reductasa.....	30
6.3 Catalasa.....	30
6.4. Medición de la actividad de la superóxido dismutasa en fracciones mitocondriales y citosólicas.....	31

VIII Análisis estadístico.....34

IX Resultados

1. Trabajo contráctil en corazones aislados	35
2. Cuantificación de malondialdehído y proteínas oxidadas.....	36
3. Cantidad relativa de enzimas antioxidantes	37
4. Expresión de enzimas antioxidantes	39
5. Actividad de enzimas antioxidantes:	40
6. Inhibición de la superóxido dismutasa (CuZn) con ácido dietilmetilcarbámico.....	42
7. Sistema antioxidante directo: glutación total, oxidado y reducido	43
8. Respuesta antioxidante en corazones post-acondicionados de ratas con síndrome metabólico.....	45



X	Discusión	49
XI	Conclusiones	56
XII	Perspectivas	57
XIII	Referencias	58
IV	Anexos	77

Artículo Original

Artículo de Revisión

"Señor, hazme un instrumento de tu Paz, donde haya odio, que lleve el Amor, donde haya ofensa, que lleve el Perdón, donde haya discordia, que lleve la Unión, donde haya error, lleve la Verdad, donde haya desesperación, que lleve la Alegría, donde haya tinieblas, lleve la Luz. Dios, que no busque ser consolado sino consolar, ser comprendido sino comprender, ser amado sino amar, porque es dando que se engrandece, perdonando, que se es perdonado".

San Francisco de Asís 1182-1226

"Necesitamos crear nosotros mismos, hacer ciencia nosotros mismos y no pasarnos la vida rezando las verdades y los errores que nos legaron otros. Mientras no hagamos eso, seremos los eternos incapaces para resolver nuestros propios problemas de acuerdo con nuestra realidad propia."

Dr. Ignacio Chávez Sánchez 1897-1979

AGRADECIMIENTOS

Sin ninguna duda la elaboración de esta tesis doctoral ha sido personal de vida y profesional, tengo la firme convicción de que la investigación del médico especialista se agota pronto, si se efectúa sólo como clínico o como técnico, sin tener la preparación científica de base. Esto debe ser una exigencia indispensable, recordando que la medicina ha dejado de ser puramente clínica y la confrontación anatómica dejó de ser suficiente y ha requerido el estudio minucioso de la función orgánica. Por lo tanto es indispensable la integración de la física, la química, la biología y la matemática, además de técnicas complejas como el instrumental de precisión y el rigor del cálculo. En pocas palabras, éste es el auge del laboratorio y el comienzo de la era de la investigación.

El Doctorado ha sido una experiencia muy enriquecedora no sólo por los conocimientos adquiridos sino también por las personas con las que he tenido el privilegio de trabajar y tratar. Llevar a cabo un proyecto como este es difícil y costoso por eso también quiero agradecer profundamente todo el apoyo recibido por el Instituto Nacional de Cardiología.

Esta tesis representa el fruto del trabajo realizado durante varios años en dicha Institución, donde he conocido a la Dra. Ana Cecilia Zazueta Mendizábal, directora de mi tesis, a quien no solo quiero expresar mi agradecimiento sino mi más profundo respeto, no sólo por su nivel en el trabajo y la academia, sino también por su integridad y honestidad. No puedo olvidarme de Noemí García quien me brindó sus conocimientos y su ayuda en el trabajo realizado en el laboratorio, gracias por tu paciencia y propuestas llenas de experiencia. No sólo queda en mi memoria el recuerdo del trabajo realizado sino también los momentos de retroalimentación y crítica con la Dra. Baños Mahraber, el Dr. Martínez Ríos, Paco, Sauri, Mabel y Eduardo y las enseñanzas recibidas de Omar y Viridiana.

Este proyecto lo he realizado como actividad extra laboral lo que ha supuesto menor dedicación y atención a mi familia. Es por eso que quiero dedicar esta tesis a María Eloisa Buzetta Ricaurte, mi esposa, a mis hijos Francisco y Emmanuel, a ellos por todos

los momentos en los que en vez de jugar con ustedes, abrazarlos y decirles que los amaba y extrañaba continuamente, trabajaba. Sé que, aunque no esté con ustedes, leerán más adelante estos párrafos, por lo que quiero mostrarles que la labor y vocación de la persona que realiza la investigación será en pos de brindar descubrimientos útiles que sirvan para la creación de curas para las personas enfermas, las cuales no sólo buscan consuelo, sino también una segunda oportunidad en sus corazones y vidas, lo cual sería imposible sin Dios y sin el tesón y honestidad de los seres humanos que dedican su vida a crear los conocimientos para ello, y en la amplia mayoría de las ocasiones, no les importa no obtener por ello un gran reconocimiento ni remuneración económica. Como verdaderos héroes, quedan mirando con vehemencia a lo lejos la utilidad y la aplicación de sus grandes obras. No tengo palabras, a mi familia, Tía Mine, Mari, Chucho, Juanita, Dulcita, Padre, Madre, Tía Mine, mis amados viejos, quienes me dijeron que Dios existe y que me enseñaron a levantarme cuando caigo, a perdonar, continuar y terminar los proyectos trazados.

I INDICE DE ABREVIATURAS

BSA	Albúmina sérica bovina
BHT	Hidroxitolueno butilado
Cat	Catalasa
DNPH	2,4-Dinitrofenilhidrazina
EOR	Especies de oxígeno reactivas
ENR	Especies de nitrógeno reactivas
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
GST	Glutación-S-transferasa
GSSG	Glutación oxidado
GSH	Glutación reducido
GPx1	Glutación peroxidasa 1
IR60	Isquemia-reperfusión 60 minutos
mCB	Monoclorobimano
MDA	Malondialdehído
NBT	Nitroazul de tetrazolio
O₂^{·-}	Anión superóxido
OH[·]	Radical hidroxilo
ON:	Oxido nítrico
SON:	Sintasa de Óxido nítrico
ONOO⁻	Anión peroxinitrito
ERO:	Especies reactivas de oxígeno

SOD CuZn: Superóxido dismutasa dependiente de Cobre- Zinc

SOD Mn: Superóxido dismutasa dependiente de Manganese

TC: Trabajo cardiaco

TCA Acido tricloroacético

Trx1: Tioredoxin reductasa 1

XD Xantina deshidrogenasa

XO Xantina oxidasa

IR: Isquemia/Reperfusión

¹O₂ Oxígeno singulete

1M2F: 1-Metil- 2-fenilindol

II RESUMEN:

Introducción. La maniobra que reduce el daño producido durante el infarto agudo del miocardio es la reperfusión arterial coronaria. Paradójicamente, el restablecimiento del flujo coronario puede producir daños adicionales sobre el miocardio, condición que se conoce como daño letal inducido por reperfusión. El estrés oxidativo, entre otros factores, está implicado en la lesión por reperfusión miocárdica, por lo tanto se acepta que mantener el equilibrio intracelular entre el sistema oxidante y antioxidante proporcionará protección contra el daño por reperfusión. Se siguen investigando diversas estrategias cardioprotectoras, entre las cuales destaca la maniobra del post-acondicionamiento (PC) con lo que se han demostrado beneficios en estudios de intervencionismo coronario percutáneo. Dicha maniobra reduce la lesión por reperfusión a través de mecanismos complejos; sin embargo, la contribución del sistema antioxidante en el post-acondicionamiento no se ha estudiado completamente.

Objetivo: Determinar la contribución del sistema antioxidante en la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento a tiempos cortos de reperfusión y tras una reperfusión prolongada.

Metodología: Se utilizaron corazones de 60 ratas Wistar macho de aproximadamente 400 g. Los corazones de los animales se disecaron y se montaron en el aparato de perfusión de Langendorff y se siguieron los siguientes protocolos experimentales. Los corazones del grupo control se perfundieron continuamente durante 110 minutos; los del grupo isquémico, se sometieron a una isquemia total durante 30 minutos; el grupo isquémico-reperfundido, recibió reperfusión durante 60 minutos tras el periodo de isquemia; a los grupos post-acondicionados, se les aplicaron 3 ciclos de 30 segundos de reperfusión, seguidos por 30 segundos de re-oclusión, tras la isquemia y antes de la reperfusión. Uno de ellos recibió 5 minutos de reperfusión y el otro, 60 minutos de reperfusión. Se obtuvieron muestras del tejido miocárdico y se determinaron marcadores de estrés oxidativo, como oxidación de proteínas y lipoperoxidación. También se determinó la cantidad relativa, expresión y actividad de las enzimas antioxidantes SOD Cu-Zn (superóxido dismutasa dependiente de Cu-Zn), SOD Mn (Superóxido dismutasa

dependiente de Manganeso), Cat (Catalasa) y Gpx (Glutación Peroxidasa), así como el contenido de glutatión total y reducido. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA, se consideró significativa una $p < 0.05$.

Resultados: Encontramos que en corazones donde se aplicó la maniobra de post-acondicionamiento se recuperó significativamente el trabajo cardíaco, medido como presión ventricular izquierda (PVI) y el doble producto (DP: frecuencia cardíaca x presión ventricular izquierda) a tiempos de reperfusión cortos (PC5) y también tras la reperfusión prolongada (PC60). La carbonilación de proteínas y los niveles de malondialdehído, marcadores de estrés oxidante disminuyeron en los corazones post-acondicionados, en correlación con un aumento significativo de la actividad de la superóxido dismutasa CuZn ($P < 0.05$, PC60 vs. IR60) y de un incremento en el estado redox, medido como la relación entre glutatión reducido y oxidado (GSH: GSSG) ($P < 0.05$ PC60 vs. IR60). Al aplicar un inhibidor no-selectivo de la SOD, el dietiltiocarbamato (DETC), disminuyó la protección conferida por el post-acondicionamiento. Estos resultados indican que los antioxidantes no enzimáticos contribuyen de manera importante en el efecto protector del post-acondicionamiento y al parecer toma relevancia cuando actúa de manera concertada con otros mecanismos activados por el post-acondicionamiento.

Conclusiones:

Concluimos que en un modelo agudo de isquemia y reperfusión prolongada, el post-acondicionamiento es una maniobra que recupera la función mecánica del corazón, evitando los efectos deletéreos del estrés oxidativo. Esta condición parece estar relacionada con el aumento en la actividad de la SODCu-Zn y con la acción antioxidante del GSH.

III ABSTRACT

Background: Coronary artery reperfusion is the only mechanism that has been shown to reduce myocardial damage after acute myocardial infarction. Paradoxically, restoration of coronary blood flow can cause additional damage to the myocardium, a condition known as reperfusion-induced lethal damage. Therefore, cardioprotective strategies, like post-conditioning are being intensively studied. Although post-conditioning has demonstrated clinical benefits on percutaneous coronary interventions, the molecular mechanisms by which this cardioprotective strategy acts are not completely understood.

Objective: To determine the contribution of the antioxidant machinery in post-conditioning-exerted cardioprotection after short and long reperfusion.

Methodology: Sixty male Wistar rats weighting approximately 400 g were used in this study. Hearts were mounted in the Langendorff perfusion system and the following protocols were applied. Control hearts were continuously perfused during 110 minutes; the ischemic group was subjected to global ischemia during 30 min; the ischemic-reperfused group was reperfused during 60 minutes after ischemia; post-conditioned groups received three cycles of 30 seconds occlusion-reperfusion after ischemia and before short (PC5) or long (PC60) reperfusion. Cardiac tissue samples were obtained to determine oxidant stress markers, e.g. protein carbonylation and lipoperoxidation. Also the relative content, expression level and enzymatic activity of SOD Cu-Zn, SOD Mn, Cat and Gpx, and the ratio GSSH:GSSG ratio were evaluated. The statistical analysis was performed by ANOVA considering significance at $P < 0.05$.

Results: PC significantly increased the left ventricular developed pressure (LVDP) and the double product (DP: heart rate x LVDP) at both early (PC5) and long reperfusion (PC60). Necrotic tissue diminished to 10.8% in PC60 hearts as compared with 49% of infarct size measured in IR60 hearts ($P < 0.05$ vs. IR60); also protein carbonylation and malondialdehyde levels decreased in correlation with a significant augment in CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD) activity ($P < 0.05$, PC60 vs. IR60) and increased glutathione redox state (GSH: GSSG) ($P < 0.05$ PC60 vs. IR60). Diethylthiocarbamate

(DETC), a non-selective SOD inhibitor, significantly diminished PC-protection when administered during all the protocol. However, administration of this inhibitor only during reperfusion had no effect on PC-induced cardioprotection. These results indicate that non-enzymatic antioxidants account for the protective effect of PC, modifying the oxidant stress caused by ischemic reperfusion in rats. The contribution of CuZnSOD activity in the observed cardioprotective effect is less clear, and could be relevant if acting in concert with other PC-activated mechanisms.

Conclusions: We conclude that in an acute model of ischemia and prolonged reperfusion, the maneuver of post-conditioning recovers the mechanical function of the heart, avoiding the deleterious effects of oxidative stress. This condition appears to be related to increased activity of the SODCu-Zn and the antioxidant action of GSH.

IV INTRODUCCION

En correlación con el aumento del sobrepeso y la obesidad en México, se ha incrementado la mortalidad por el infarto del miocardio, ocupando el segundo lugar porcentual con 11% después de la Diabetes Mellitus. Esta entidad es responsable del 15% de mortalidad en nuestro país, ya que el *INEGI* ha documentado 65,000 muertes sólo en el 2010 (*INEGI,SS defunciones 2010*).

La reperfusión arterial coronaria es la única maniobra que reduce el daño producido durante el infarto del miocardio. Paradójicamente, el restablecimiento del flujo coronario puede producir daños adicionales sobre el miocardio isquémico, condición que se conoce como daño letal inducido por reperfusión (*Yellon et al., 2007*).

Los mecanismos descritos para explicar el daño por reperfusión son muy diversos, podemos mencionar la pérdida de energía como resultado del desbalance entre el suministro de oxígeno y la demanda metabólica (*Ferrari et al., 1993*), la alteración de la homeostasis iónica (*Tanaka et al. 2002*) y la generación de radicales libres (*Penna et al., 2009*). El estrés oxidativo inicia como resultado del desbalance entre la producción de radicales libres y defensas antioxidantes, asociándose con destrucción de lípidos, proteínas y ácidos nucleicos.

V. MARCO TEÓRICO

1. DAÑO POR REPERFUSION: ASPECTOS EXPERIMENTALES Y TRADUCCION CLINICA

La traducción clínica del daño por reperfusión en los pacientes es el aturdimiento miocárdico. El desarrollo de este fenómeno en una angioplastia primaria es más severo cuanto mayor ha sido el tiempo de isquemia previo a la reperfusión. En nuestro país, el Registro Nacional de Intervenciones Cardiovasculares de la Sociedad de Cardiología Intervencionista de México del 2010 al 2011, documentó que las indicaciones del procedimiento de intervencionismo coronario fueron en un 59% los síndromes coronarios agudos: 31% infarto agudo con elevación del segmento ST, y 28% síndrome coronario agudo sin elevación del segmento ST, 4% se encontraban en choque cardiogénico y 6% requirieron apoyo hemodinámico. Se registraron 43 complicaciones, entre las más frecuentes la del fenómeno de no reflujo. La mortalidad dentro de la sala de hemodinamia fue del 5%. En 2011, Palacios y sus colaboradores documentaron que dicha mortalidad era del 46% en pacientes que ingresaban a la sala de hemodinamia en choque cardiogénico.

En los estudios de la función ventricular después de un infarto agudo del miocardio se ha demostrado una recuperación tardía de ésta después de la reperfusión, que puede variar de 7 a 10 días. En la cirugía cardiaca se produce una disminución de la función contráctil después de restablecer la circulación normal posterior al uso de la bomba de circulación extracorpórea (*Hausenloy et al., 2012*). En la mayoría de los casos esta disfunción es reversible en 24-48 h, periodo durante el cual pueden presentarse arritmias ventriculares y choque cardiogénico. En grupos de alto riesgo, el aturdimiento posquirúrgico puede tener efectos adversos en la morbimortalidad (*Goldberg et al., 2006*). En 2006, Goldberg y sus colaboradores observaron el desarrollo de ritmo idioventricular acelerado en 10 de 12 pacientes reperfundidos con estreptocinasa intracoronaria. Múltiples estudios han mostrado que la aparición de ritmo idioventricular acelerado es más frecuente con la reperfusión que durante el episodio isquémico, por lo que la aparición de ritmo idioventricular acelerado se considera un criterio clínico de reperfusión.

Por otra parte, la reperfusión en los infartos inferiores se asocia con bradicardia sinusal e hipotensión arterial sistémica mediante el denominado reflejo de Bezold-Jarisch. Esto se explica por la afección de la arteria del nodo sinusal. Otro caso de daño por reperfusión se da en la angina de Prinzmetal, en dicha patología, los períodos de isquemia más breves seguidos por reperfusión se asocian a arritmias letales y explica los eventos de muerte súbita cardíaca arrítmica que se han demostrado en pacientes al ceder el espasmo coronario, al igual que en pacientes con isquemia silente y angina inestable.

La evidencia experimental sugiere que en los primeros minutos de la reperfusión se mimetiza lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria. En ambos casos, hay activación de neutrófilos, así como activación de células endoteliales; conforme avanza el tiempo de reperfusión hay reclutamiento de neutrófilos que de inicio se adhieren al endotelio y finalmente migran al parénquima. Estos mecanismos son inducidos por radicales libres de oxígeno, y pueden dar lugar al fenómeno de no reflujo el cual, angiográficamente se manifiesta como un estancamiento del medio de contraste en ausencia de disección coronaria, trombo, espasmo coronario grave o estenosis residual significativa en la arteria intervenida, siendo consecuencia del daño endotelial y de la disminución de la secreción basal de óxido nítrico (NO[•]). La depleción del óxido nítrico extracelular por radicales superóxido y la contracción celular coronaria por disfunción en la liberación del calcio por el retículo sarcoplasmático durante el estrés oxidativo (*Niccoli et al., 2009; Pasceri et al., 2005*), puede provocar vasoconstricción y la formación de micro-trombos en el lumen de vasos pequeños. Las células endoteliales sintetizan mediadores pro-inflamatorios (factor de necrosis tumoral α [FNT α], interleucina 6 [IL-6], IL-8) así como especies reactivas de oxígeno, que en pocos minutos causan daño tisular irreversible (*Sheng et al., 2007; Reffelmann et al., 2002*). Las consecuencias de todo esto son la disfunción contráctil segmentaria postisquémica y trastornos letales del ritmo cardíaco. Por lo tanto, la investigación de estrategias de cardioprotección es preponderante para esta categoría de pacientes.

2. MECANISMOS DE DAÑO POR REPERFUSION

2.1. Estrés oxidante y especies reactivas de oxígeno.

Los radicales libres son moléculas altamente reactivas que se forman en procesos donde interviene el oxígeno. Los radicales libres que se originan a partir del oxígeno son llamadas especies reactivas del oxígeno (ERO), mientras que los radicales libres que se originan mediante la reacción del oxígeno con el nitrógeno, son considerados una subclase de radicales libres y son llamadas especies reactivas de nitrógeno (ERN). Varias enzimas y procesos bioquímicos pueden producir especies reactivas de oxígeno y especies reactivas de nitrógeno. Las principales fuentes de ERO/ERN en el sistema cardiovascular son los siguientes: la xantina oxidoreductasa, la NADPH oxidasa, la sintasa de óxido nítrico (SON) y los citocromos mitocondriales (*Jaburek et al., 2006*). La hemoglobina también puede considerarse como una fuente de radicales libres.

El estrés oxidativo se asocia con modificaciones de los fosfolípidos de la membrana y de proteínas que conducen a la peroxidación y a la oxidación de grupos tiol (*Jaburek et al., 2006*). Las principales especies reactivas de oxígeno se presentan en la tabla I.

Radicales	No Radicales
Superóxido ($O_2^{\cdot-}$)	Oxígeno singulete (1O_2)
Hidroxilo (OH^{\cdot})	Peróxido de Hidrógeno (H_2O_2)
Peroxilo (RO_2^{\cdot})	Ozono (O_3)
Hidroperoxilo (HO_2^{\cdot})	Anión peroxinitrito ($ONOO^-$)

Tabla I: Especies Reactivas de Oxígeno (ERO)

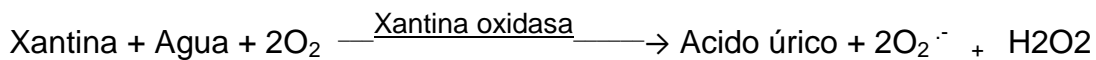
2.2 . Especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno formados en la isquemia reperusión

La generación de especies reactivas de oxígeno en el corazón ocurre durante la isquemia y la reperusión. En modelos de isquemia tisular global en cardiomiocitos

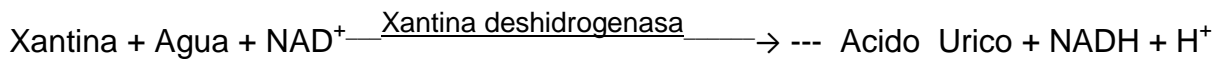
aislados, la concentración de oxígeno no se abate por completo, por lo tanto, se considera que existe una producción inicial de especies reactivas de oxígeno durante la isquemia (*Becker 2004*). Se ha propuesto que las especies reactivas de oxígeno en la isquemia pueden jugar un papel importante de señalización (*Yue et al., 2000; Zweier J et al., 2006; Chen et al., 2007*).

2.2.1 Compartimento citosólico:

Se ha propuesto que la acumulación de xantina oxidasa y de sus sustratos: hipoxantina y xantina durante el período de isquemia, pueden ser relevantes para producir la lesión de las células durante la posterior re-oxigenación, puesto que llegará el oxígeno necesario para la enzima con la consecuente producción de radicales libres de oxígeno (*Raedschelders et al., 2012*)



Durante la fase de reperfusión, el flujo sanguíneo se reinstaura llegando de nuevo oxígeno de forma importante a las células. El exceso de Ca^{2+} citoplasmático estimula proteasas, que activan en el citosol el paso de xantina-D (deshidrogenasa) a xantina-O (oxidasa) en presencia de NADPH (*Halliwell et al., 1991*) La xantina oxidasa es la mayor fuente biológica de producción de superóxidos en tejidos post-isquémicos. En los tejidos normóxicos la forma sintetizada es la xantina deshidrogenasa. La xantina deshidrogenasa no puede transferir electrones al oxígeno molecular para formar peróxido de hidrógeno o superóxido, pero puede reducir el NAD^+ (Nicotinamida adenin nucleótido).



En condiciones de baja concentración de oxígeno como ocurre en la fase de isquemia sucede la transformación de xantina–deshidrogenasa en xantina-oxidasa y ésta utiliza el oxígeno molecular en lugar del NAD^+ produciendo $\text{O}_2^{\cdot -}$ y H_2O_2 , sintetizando los radicales libres citosólicos (*Halliwell et al., 1987*). El anión superóxido y otras especies reactivas de oxígeno pueden oxidar las fibras del miocardio ya dañados por la isquemia,

lo que favorece la apoptosis. En la reperfusión, el O_2 reacciona con el óxido nítrico (NO^\bullet), formando peroxinitrito ($ONOO^-$).

El O_2^- puede ser transformado por la SOD a H_2O_2 , que en presencia de Fe^{2+} o Cu^{2+} , puede transformarse por la reacción de Fenton en el radical hidroxilo (OH^\bullet).

2.2.2 Compartimento mitocondrial:

Se ha descrito que la génesis de la lesión por isquemia/reperfusión está íntimamente ligada a la función mitocondrial. Los eventos principales asociados al daño por reperfusión son: la ruptura de la membrana mitocondrial externa, la sobrecarga de calcio intramitocondrial y la producción de especies reactivas de oxígeno. Se ha propuesto que los sitios productores de ERO en la mitocondria son los complejos respiratorios (I y III), la monoaminoxidasa (MAO) y el p66Shc (Zweier, 2006).

También se ha descrito que el aumento de calcio mitocondrial promueve la formación de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (Figura 1). La sobrecarga de calcio estimula a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs (Stone et al., 1992), provocando un incremento en el flujo de electrones de la cadena respiratoria, lo que produce un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno a partir del ciclo Q (Griffiths et al., 1998). El calcio también estimula directamente a la sintasa de óxido nítrico (SON), con lo que aumenta la producción de ON^\bullet , que inhibe al complejo III y IV de la cadena respiratoria (Brookes et al., 2004). Debido a esto los electrones en la cadena no tienen salida, aumentando la producción de especies reactivas de oxígeno a nivel del sitio Q. Además el ON^\bullet y el Ca^{2+} pueden inhibir el complejo I, lo que incrementa aun más la generación de especies reactivas de oxígeno (Nauta et al., 1991). La inhibición de la cadena respiratoria terminará afectando la maquinaria contráctil.

El calcio también puede disociar al citocromo C (cyt C) de la membrana interna y a altas concentraciones provocar la apertura del poro de transición mitocondrial (MPTP) (Halestrap, 1999). Las condiciones asociadas a la reperfusión, como la producción de especies reactivas de oxígeno, la normalización del pH y el incremento en la entrada intramitocondrial de Ca^{2+} , crean un escenario ideal para la apertura de MPTP (Rasola et

al., 2007; Zorov et al., 2009), aunque también se ha reportado que la apertura de MPTP puede ocurrir durante la isquemia (Costa et al., 2008),

La salida del citocromo C al citosol inicia la cadena de apoptosis. En este sentido, Zorov y colaboradores, trabajando con cardiomiocitos aislados de ratas adultas, observaron la liberación de esta proteína, en asociación con la apertura del MPTP y con un incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno en las mitocondrias (Zorov et al., 2000). Por lo tanto, el daño al miocardio durante la isquemia/reperfusión puede incrementarse, con un aumento en la producción de especies reactivas de oxígeno, secundario a la sobrecarga celular y mitocondrial de Ca^{2+} , contribuyendo a la activación del MPTP y a una menor disponibilidad de NO^* .

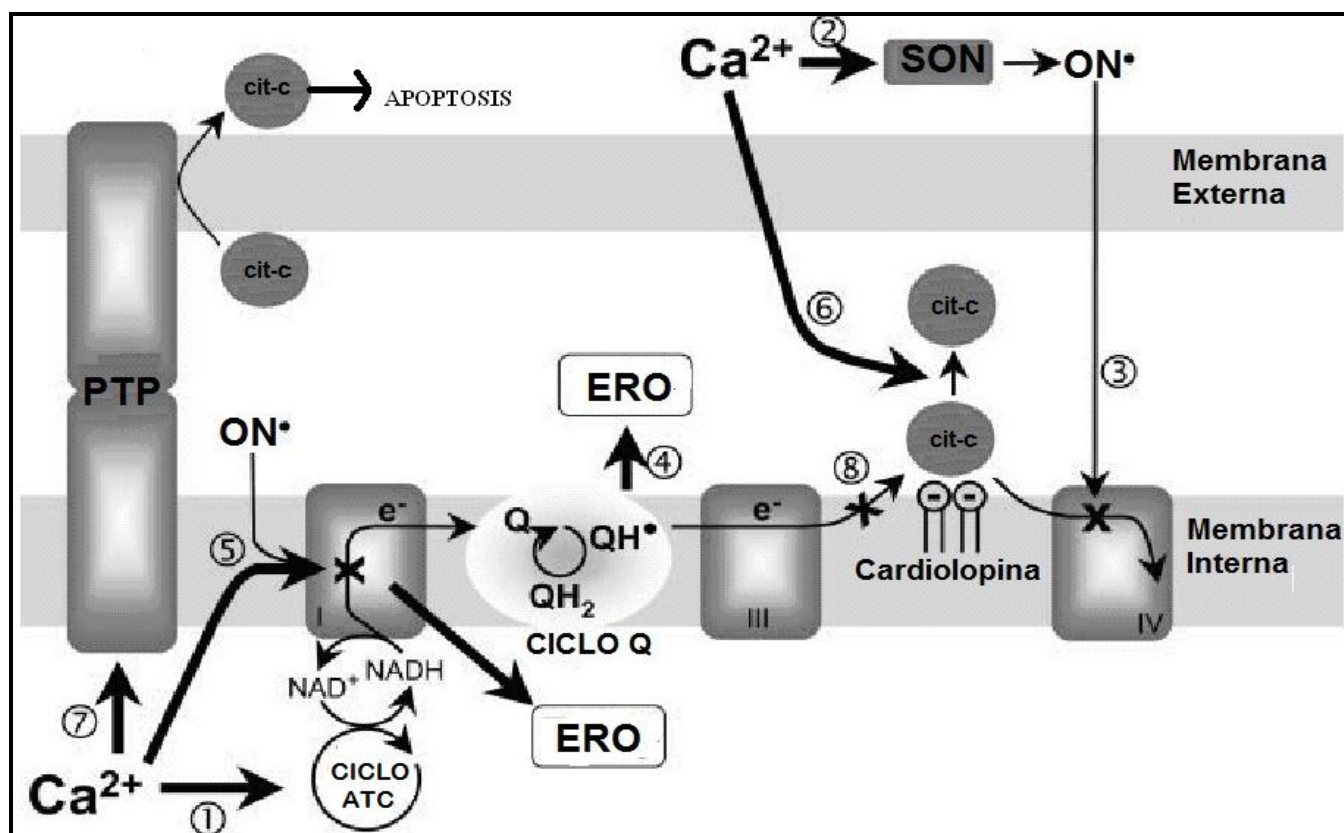


Figura 1: Mecanismos de generación de radicales libres.

Al estimular el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (ATC) por el Ca^{2+} (1), se incrementa el flujo de electrones en la cadena respiratoria, el Ca^{2+} también estimula a la SON y se produce ON^* (2), el cual puede inhibir el complejo respiratorio en el complejo IV (3). Esto ocasiona el incremento de ERO a través del ciclo Q (4). En conjunto, el ON^* y el Ca^{2+} pueden inhibir el complejo I. El Ca^{2+} también puede disociar el citocromo C (cit-c) de la cardiopina en la membrana interna (6) y esto ocasiona que haya apertura del PTP y liberación del cit-c a través de la membrana externa (7). La subsecuente inhibición del complejo III (8) puede incrementar aún más la generación de ERO a través del ciclo Q. El complejo II fue omitido en la figura para dar más claridad a la misma. Tomado de Brookes et al.(2004)

coronarias breves (Linguist et. al 1988) así como en respuesta a la sobrecarga hemodinámica (Delcayre, 1988).

3.ENZIMAS ANTIOXIDANTES

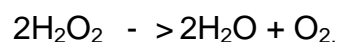
3.1 Superóxido dismutasa: La superóxido dismutasa (SOD) es una metaloproteína que cataliza la reacción de conversión de $O_2^{\cdot-}$ mediante su transformación en H_2O_2 , el cual puede ser convertido a su vez por las actividades de catalasa o glutatión peroxidasa (Halliwell et al., 1991).

Se han identificado tres clases de SOD aisladas en mamíferos (Tanno et al., 2010) La SOD CuZn contiene un cofactor con dos átomos metálicos, uno de Cu y otro de Zn. La SOD Mn tiene como cofactor manganeso. Otras SODs presentan cofactores mononucleares de hierro o níquel. Las SODs presentan homologías en cuanto a sus secuencias y estructura tridimensional. Además poseen residuos quelantes idénticos en el sitio activo (Liou et al., 1993). La presencia del cobre y del zinc en esta metaloenzima le permite reducir al ión superóxido.

Reducción: $M^{n+} + O_2^{\cdot-} + 2H^+ \rightarrow M^{(n+1)+} + H_2O_2$. M = Metal

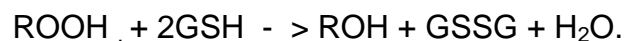
3.2 Catalasa: Es una enzima tetramérica con cuatro subunidades idénticas de 60 kDa dispuestas tetraédricamente y que contiene cuatro grupos de ferro-protoporfirina por molécula. Es una de las enzimas conocidas más eficientes, tanto que no puede ser saturada por H_2O_2 a ninguna concentración.

Cataliza la conversión de H_2O_2 en H_2O y O_2 para proteger a las células del H_2O_2 que se genera en su interior (Halliwell et al., 1985)



En animales, el H₂O₂ se detoxifica mediante las actividades de la catalasa y la glutatión peroxidasa. Aunque la catalasa no es esencial para algunos tipos de células en condiciones normales, tiene un importante papel en la adquisición de tolerancia al estrés oxidativo en la respuesta adaptativa de las células miocárdicas (*Pendergrass et al. 2011*) O₂⁻ y H₂O₂

3.3 Glutatión peroxidasa: Está formada por cuatro subunidades idénticas, y cada una de ellas contiene un residuo de seleno-cisteína, que es esencial para su actividad enzimática. La glutatión peroxidasa (GPx) comparte su sustrato con la catalasa, pero además puede reaccionar de manera efectiva con lípidos y otros hidroperóxidos orgánicos, catalizando su reducción (ROOH y H₂O₂) usando glutatión reducido (GSH) y así contribuye a la protección de las células de mamíferos contra el daño oxidativo. (*Brigelius, 1999*).



Se han encontrado al menos cinco isoenzimas de GPx en mamíferos. Aunque su expresión es ubicua, el nivel de cada isoforma varía dependiendo del tipo de tejido, en corazón la isoforma predominante es la Gpx-1 (*Holtzman 2007*).

La neutralización de las ERO ocurre en la mitocondria por acción de la SOD Mn y en el citosol por la SOD CuZn, GPx y catalasa. Se ha propuesto que el ciclo redox del glutatión es la mayor fuente de protección contra bajos niveles de estrés oxidativo, sin embargo, la acción de catalasa es más importante contra el estrés oxidativo severo (Figura 3) (*Halliwell, 1995*).

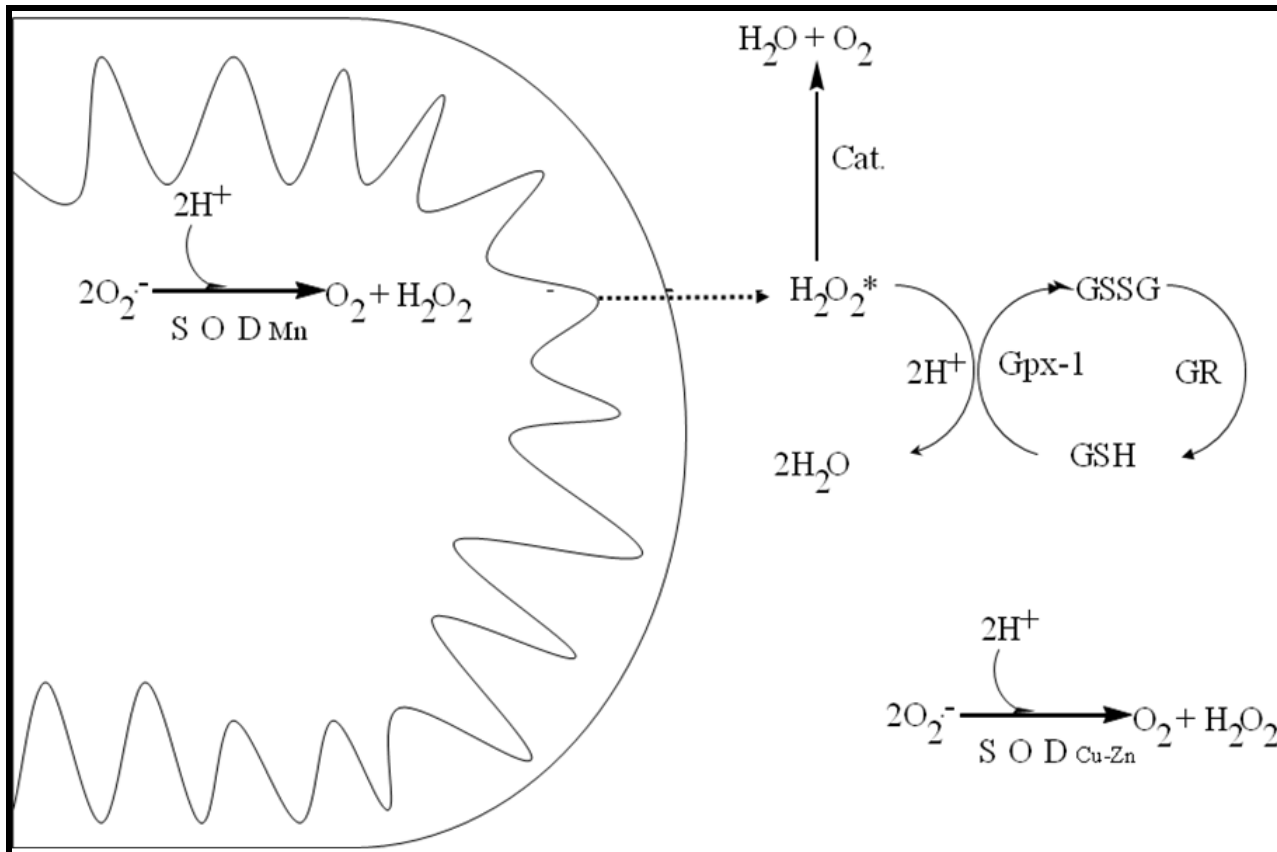


Figura 2: Principales Sistemas antioxidantes en el corazón de rata. H_2O_2 :Peróxido de hidrógeno; Hidroxilo: OH^\cdot ; SOD Cu-Zn: Superóxido dismutasa cobre zinc; SOD Mn: Superóxido dismutasa de manganeso; GSH: Glutación reducido; GSSG: Glutación oxidado; O_2^- : Ión superóxido; GPx-1: Glutación Peroxidasa 1; GR: Glutación Reductasa.

3.4 Hipótesis de la Regulación transcripcional y actividad enzimática de las enzimas antioxidantes en la isquemia- reperfusión.

3.4.1 Regulación Transcripcional:

Muchos de los genes regulados por la hipoxia en las células de los mamíferos son regulados transcripcionalmente por el factor inductor de hipoxia (HIF). El complejo del HIF-1 es un heterodímero compuesto por una subunidad beta expresada constitutivamente, y por una subunidad alfa. El nivel y la actividad transcripcional de este complejo son regulados en forma precisa por la concentración celular del oxígeno. Bajo concentraciones de oxígeno normales, la proteína es destruida por el proteosoma, mientras que con concentraciones bajas de oxígeno, el HIF-1 α se estabiliza dimerizándose con HIF- β para formar un activador transcripcional efectivo (Kakinuma, 2001). El dímero se une a secuencias específicas del ADN y activa la transcripción de

varios genes involucrados en el metabolismo, la proliferación, la supervivencia, la eritropoyesis y la biología vascular (Shultz, 1999; Caramaelo, 2006). En este sentido, el Nrf2, es un factor de transcripción que induce la expresión de genes para proteínas fase II, que protegen a las células contra el daño generado por estrés oxidante (Dreger et al., 2009).

3.4.2 Regulación de la actividad enzimática: La regulación enzimática se refiere a la posibilidad que tienen las enzimas de variar la velocidad de las reacciones que catalizan al producirse determinados cambios en el medio. Los cambios de velocidad se deben a cambios cuantitativos o cualitativos de los centros activos, y atendiendo a esto las formas básicas de la regulación enzimática se manifiestan por variación en la cantidad o la actividad de las enzimas. De acuerdo a la información previa se ha descrito en respuesta a la hipoxia un incremento en la actividad de las enzimas productoras de radicales libres como la xantina oxidasa y un decremento en la actividad de las enzimas antioxidantes.

4. ESTRATEGIAS CARDIOPROTECTORAS

4.1 El Post-acondicionamiento miocárdico

En el estudio del miocardio isquémico-reperfundido, tan variados son los mecanismos de daño, como la estrategias descritas para su protección. De manera experimental, se han investigado estrategias cardioprotectoras farmacológicas como los bloqueadores de los canales de calcio y los flavonoides, con discretos resultados (Haramaki, 1993; Yoon, 1985; García G. et al., 2005; García G. et al., 2006), mientras que las estrategias mecánicas como el pre y el post-acondicionamiento han resultado más efectivas. Este último consiste en la protección contra el daño por reperusión por la adaptación del corazón a la hipoxia crónica, mediante una serie de oclusiones breves antes de una isquemia prolongada y del restablecimiento del flujo coronario, lo cual aumenta la recuperación de la función cardiaca y reduce el tamaño del infarto (Yellon 2005). Los dos protocolos se presentan en la Figura 3.

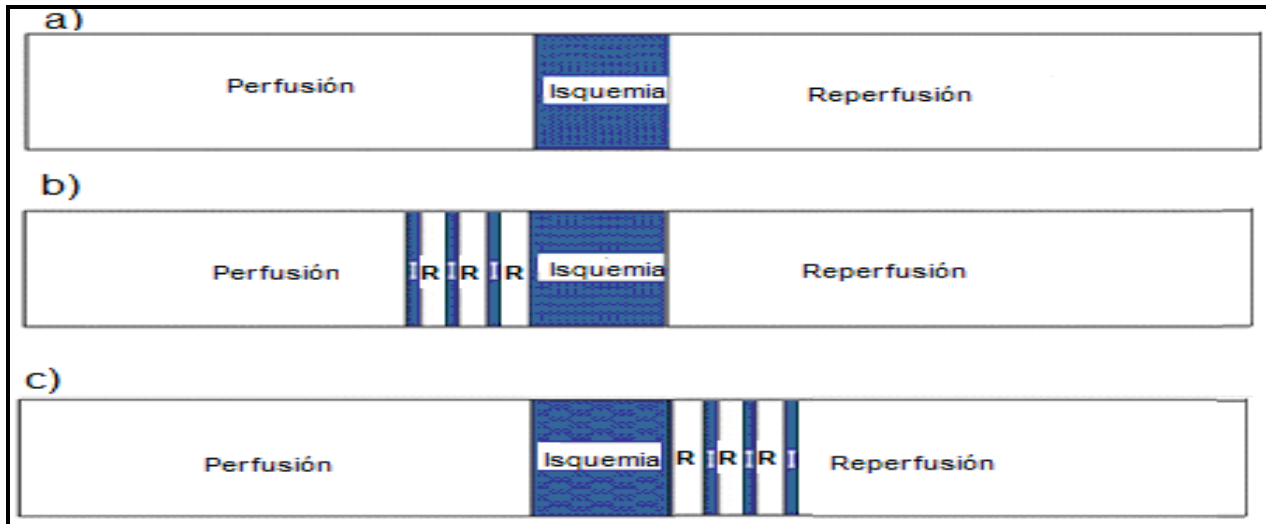


Figura 3: Estrategias mecánicas de protección contra el daño por reperfusión miocárdica. a) Isquemia-Reperfusión sin cardioprotección, b) Pre-acondicionamiento, c) Post-acondicionamiento. I=Isquemia durante 30 segundos, R=Reperfusión durante 30 segundos.

En sus inicios, a la aplicación del post-acondicionamiento se le denominó reperfusión tardía y no le dio plena importancia (Okamoto, 1986). Mucho después, se demostró en perros que la aplicación de una serie de ciclos cortos de reperfusión y oclusión de la arteria coronaria, justo antes de la reperfusión, pero después de una isquemia relativamente prolongada, son tan efectivos como el pre-acondicionamiento para limitar el tamaño del infarto (Zhao et al., 2003). La técnica consistió específicamente, en la aplicación de 3 ciclos de 30 segundos de reperfusión, seguidos por 30 segundos de re-oclusión, después de 60 minutos de isquemia, obteniendo una reducción en el tamaño del infarto miocárdico. Dependiendo de la especie, modelos y otros factores, el post-acondicionamiento ha demostrado reducir el tamaño del infarto de ~ 20-70% en comparación con controles emparejados (Otani et al., 1984; Haramaki et al., 1993; Zhao et al., 2003). En múltiples modelos y especies, el post-acondicionamiento puede reducir la apoptosis, la necrosis, la disfunción endotelial y la activación endotelial, por lo tanto también disminuye la adhesión de leucocitos al endotelio y la inflamación por los radicales libres (Niccoli et al., 2009; Luna P. et al., 2010).

También se ha observado una reducción en la incidencia de arritmias por reperfusión. Galagudza et al. (2004) documentaron que la recanalización percutánea de

la arteria coronaria mediante angioplastia coronaria transluminal percutánea (ACTP) indujo un ritmo idioventricular, al interrumpir de manera repetida el flujo varias veces y la restauración del ritmo sinusal una vez que se restauró la circulación coronaria.

En el trabajo realizado por Halkos et al. (2004) en cirugía de revascularización con perros se evaluó el post-acondicionamiento isquémico obteniendo cardioprotección (reducción del 10 al 15% en el tamaño del infarto); este estudio se confirmó en pacientes post-operados de cirugía de cambio valvular y de revascularización coronaria (Luo et al., 2010).

Otros estudios en pacientes han confirmado los hallazgos experimentales en modelos animales; por ejemplo, en pacientes con infarto agudo del miocardio (Staat et al. 2005), se aplicó esta técnica de acuerdo con lo descrito por Galagudza et al. (2004), quienes encontraron que la aplicación del post-acondicionamiento en ratas convierte la fibrilación ventricular persistente en ritmo sinusal. En el protocolo realizado por Laskey (2005), a 17 pacientes se les realizó angioplastía estándar con 90 segundos de inflado del globo ininterrumpido y se comparó con 17 pacientes a los que se les realizó angioplastía con post-acondicionamiento. Se observó una reducción mayor del desnivel positivo del ST en el último grupo. Por su parte, Thibault y colaboradores documentaron en un ensayo clínico controlado una diferencia del 7 al 10% en la fracción de expulsión del ventrículo izquierdo en aquellos pacientes en quienes se realizó la maniobra de post-acondicionamiento durante la angioplastía primaria en comparación con aquellos en quienes no se realizó dicha maniobra (Thibault et al. 2008).

Sin embargo los mecanismos por los cuales esta maniobra cardioprotectora actúa no se conocen del todo.

4.2 Hipótesis de la regulación de la cardioprotección por los radicales libres

Las especies reactivas de oxígeno generadas por el pre-acondicionamiento isquémico y farmacológico actúan como desencadenantes de la protección cardiaca (Tsutsumi et al. 2007), sin embargo, la participación de especies reactivas de oxígeno en el post-acondicionamiento isquémico y farmacológico *in vivo e in vitro* se encuentra en estudio. Por ejemplo, en un modelo *in vivo*, se sometieron los corazones de ratones a 30 minutos de isquemia coronaria, seguidos de 2 horas de reperfusión. A dos grupos se les realizó post-acondicionamiento mecánico o farmacológico con isoflurano, otros grupos fueron

tratados con 2-mercaptopropionil glicina (MPG) un atrapador de ROS, 10 minutos antes o después del post-acondicionamiento mecánico o farmacológico. Se obtuvo una reducción significativa del tamaño del infarto en comparación con el grupo control en los animales post-acondicionados, pero el efecto protector se perdió con la administración previa al post-acondicionamiento de MPG, pero no después del post-acondicionamiento. Estos datos sugieren que las especies reactivas de oxígeno son un efector importante del daño por reperfusión, pero que también juegan un papel importante como moléculas señalizadoras en la cardioprotección conferida por post-acondicionamiento en miocitos cardíacos.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se ha sugerido que en condiciones de reperfusión hipóxica tras períodos de post-acondicionamiento, la cardioprotección está relacionada con una disminución de peróxido en mitocondrias, por lo que se intuye que los sistemas antioxidantes estén involucrados. No se ha determinado que sucede con la producción de enzimas antioxidantes en respuesta a las especies reactivas de oxígeno que se producen durante los períodos de post-acondicionamiento, por lo que nos propusimos estudiarlas y determinar cuál podría ser la relación entre su producción y los mecanismos que pudieran neutralizar las especies reactivas de oxígeno antes de llegar a un daño miocárdico irreversible por la reperfusión.

VI METODOLOGIA

1. HIPOTESIS

Durante el post-acondicionamiento, las especies reactivas de oxígeno producidas en una fase inicial inducen la activación de mecanismos de cardioprotección, que incluyen la sobre-expresión de proteínas antioxidantes. Así, la maquinaria antioxidante se encontrará aumentada al momento de la reperfusión prolongada, logrando atenuar el daño producido por la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y contribuyendo a la cardioprotección por post-acondicionamiento.

2. OBJETIVOS

2.1 General: Determinar los cambios en los niveles de expresión y actividad de las enzimas antioxidantes y en el estado redox de corazones post-acondicionados.

2.2 Particulares:

- a) Establecer los tiempos de post-acondicionamiento que promuevan la protección del tejido cardiaco sometido a isquemia y reperfusión prolongadas.
- b) Obtener muestras de ARNm de corazones normóxicos, reperfundidos y sometidos a post-acondicionamiento mediante técnicas establecidas.
- c) Determinar la pureza de tales preparaciones, mediante análisis de geles de agarosa.
- d) Determinar por PCR la expresión de los genes que codifican para las proteínas antioxidantes antes indicadas.
- e) Determinar la sobre-expresión de estas proteínas mediante inmunodetección.
- f) Medir la actividad enzimática de las enzimas antioxidantes.
- g) Medir los niveles de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en los diferentes protocolos experimentales.

3. JUSTIFICACION Y RELEVANCIA:

La posible aplicación clínica del post-acondicionamiento isquémico es de suma importancia, por lo que el estudio de los mecanismos que derivan de esta estrategia cardioprotectora, se ha convertido en el foco de estudio de diversos grupos, incluido el nuestro. De confirmarse la hipótesis planteada, los resultados obtenidos en este trabajo, contribuirán para la aplicación de nuevos tratamientos en la isquemia miocárdica aguda.

4. TIPO DE DISEÑO: Experimental

5. MUESTRA:

Se utilizaron 90 ratas Wistar sanas de 400 g para la realización del protocolo experimental. Se requirieron de otras 10 ratas Wistar para la medición en células miocárdicas de los valores basales de las enzimas antioxidantes. Total: 100 ratas.

6. CRITERIOS DE INCLUSIÓN Y EXCLUSIÓN

Se incluyeron corazones de ratas Wistar sanas y se excluyeron todos aquellos corazones en los que se documentaron trastornos del ritmo cardiaco (Fibrilación ventricular, taquicardia ventricular, fibrilación auricular) antes de iniciar el experimento.

7. VARIABLES:

7.1 Variable de Interés: Isquemia:

Definición conceptual: Desequilibrio de difusión y perfusión de O₂ en un tejido, en este caso tejido miocárdico de rata.

Definición operacional: Periodo de ausencia de flujo de la solución de perfusión a través de las arterias coronarias.

Tipo de variable: Cualitativa nominal

7.2 Variable de resultado: Enzimas antioxidantes y estrés oxidante

Definición conceptual: El estrés oxidante es la producción de especies reactivas de oxígeno causadas por diversas condiciones ambientales adversas. Las enzimas antioxidantes son proteínas dotadas de propiedades catalíticas que mantienen en

niveles aceptables las concentraciones de especies químicas conocidas como radicales libres.

Definición operacional: La glutatión peroxidasa cataliza la degradación de H_2O_2 y de peróxidos orgánicos utilizando el GSH como co-sustrato, la SOD cataliza la dismutación de O_2^- a O_2 y H_2O_2 y la catalasa cataliza la degradación de H_2O_2 .

Medición: Mediante determinación de marcadores de estrés oxidante; lipoperoxidación y carbonilación de proteínas y PCR, análisis de western blot y ensayos de actividad de las enzimas antioxidantes.

Tipo de Variable: Cuantitativa continua.

7.3 Maniobra de Intervención; protocolo de post-acondicionamiento:

Definición conceptual: Maniobra de cardioprotección al inicio de la perfusión coronaria.

Definición operacional: Maniobra realizada durante los primeros cinco minutos después de un tiempo determinado de suspensión de la solución de perfusión en el corazón aislado (isquemia) consistente en la reapertura de la solución de perfusión (reperfusión) durante 30 segundos y después isquemia (30 segundos) durante cinco ciclos.

Tipo de Variable: Cualitativa dicotómica.

8. RECURSOS MATERIALES Y HUMANOS

En el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, se contó con la infraestructura necesaria para llevar a cabo los experimentos de corazón aislado, para extraer y determinar la pureza de las muestras de RNA de los corazones controles, reperfundidos y post-acondicionados mediante electroforesis en geles de agarosa, así como para realizar pruebas de la expresión diferencial de proteínas, mediante ensayos de RT-PCR e inmunodetección.

VII DESARROLLO EXPERIMENTAL:

1.- Extracción de corazón de rata Wistar y montaje en el sistema de reperfusión

Langendorff:

Se utilizaron ratas Wistar macho de entre 400-450 g, que se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg). Cinco minutos después, una vez anestesiado el animal, se hizo disección roma y se identificó la vena femoral profunda donde se inyectaron 500 U de heparina no fraccionada con el fin de evitar trombos intracavitarios e intracoronarios que destruirían la preparación. Acto seguido se inició la incisión del abdomen hasta el cuello, retirándose el esternón por completo y exponiendo toda la cavidad torácica. Rápidamente se retiró el corazón de la cavidad, teniendo especial cuidado de cortar la aorta en un punto distal a la primera rama del cayado de manera que se pudiera introducir la cánula de perfusión 5 a 10 mm sin riesgo de ocluir el orificio de las coronarias o atravesar la válvula aórtica. Desde la remoción completa del corazón hasta el inicio de la perfusión transcurrieron aproximadamente 30 a 90 segundos. La actividad cardíaca se normalizó a los pocos segundos. Después el corazón se montó en el aparato de perfusión de corazón de Langendorff (Figura 4).

El principio básico de esta preparación radica en la posibilidad de perfundir las arterias coronarias usando una cánula de perfusión retrógrada posicionada en la aorta donde, gracias a una presión de perfusión adecuada del líquido nutriente, se mantiene cerrada la válvula aórtica y el flujo se desvía en su totalidad hacia el orificio de las coronarias, nutriendo la masa ventricular, sin existir llenado ventricular. Los corazones se perfundieron vía aorta, en modo retrógrado con un flujo constante de 12 ml/min con medio Krebs-Henseleit, que contiene 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18mM KH₂PO₄, 1.18 mM MgSO₄·7H₂O, 5M de CaCl₂, 25 mM de NaHCO₃, 5.5 mM de glucosa y 100µM de octanato de sodio. La solución se oxigena al 95% y 5% de CO₂ a temperatura de 37°C. El trabajo cardíaco se midió introduciendo un balón de látex en el ventrículo izquierdo al que se conectó un transductor de presión. Los corazones se estabilizaron durante 20 minutos con medio Krebs-Henseleit antes de someterlos a una isquemia total de 30 minutos y a reperfusión durante 60 minutos.

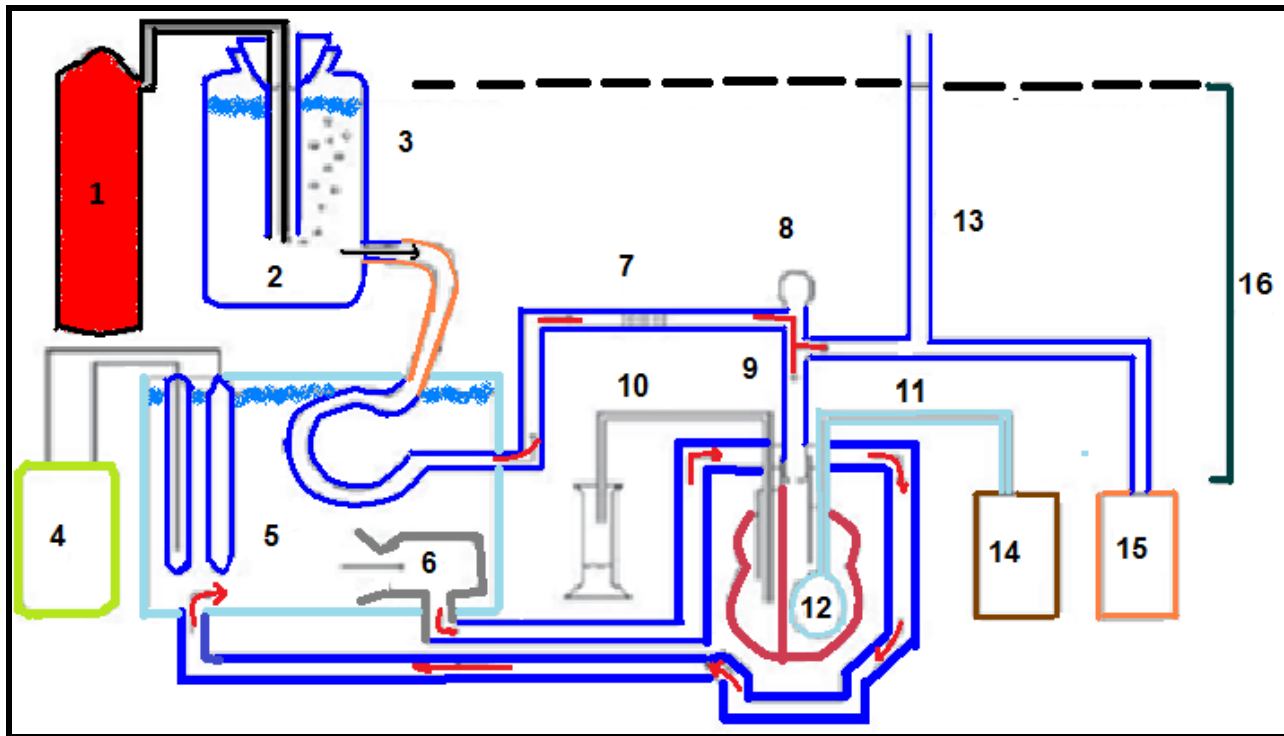


Figura 4 Sistema de Perfusión Retrógada de Langendorff: 1) Fuente de Oxígeno; 2) solución nutritiva de Krebs-Henseleit; 3) frasco de Mariotte; 4) sistema regulador de temperatura constante; 5) baño a temperatura constante; 6) bomba de circuito externo; 7) filtro de burbujas; 8) colateral hermética para la administración de fármacos en el líquido de perfusión coronaria; 9) cánula de perfusión retrógrada sujeta a la aorta; 10) catéter de polietileno ubicado en el ventrículo izquierdo para el registro del flujo coronario; 11) catéter de polietileno del balón intraventricular; 12) balón de látex ubicado en el ventrículo izquierdo; 12) colateral con columna de solución nutritiva; 14) transductor electrónico que registra la presión del ventrículo izquierdo; 15) transductor electrónico que registra la presión de perfusión; 16) altura de la columna de solución nutritiva, presión de perfusión en cm de agua. Tomado de (Yethus, 2000).

La maniobra de post-acondicionamiento se aplicó a un grupo de ratas después de la isquemia. Esta consistió en la aplicación de cinco ciclos de isquemia y cinco de perfusión con duración de 30 segundos cada una. Los grupos experimentales se describen en la figura 5.

Después se procedió a la obtención de muestra del tejido celular miocárdico. Al término del período de isquemia-reperfusión, los corazones fueron desmontados y se obtuvieron homogenados. La proteína de las diferentes fracciones se cuantificó por el método de Lowry (1951).

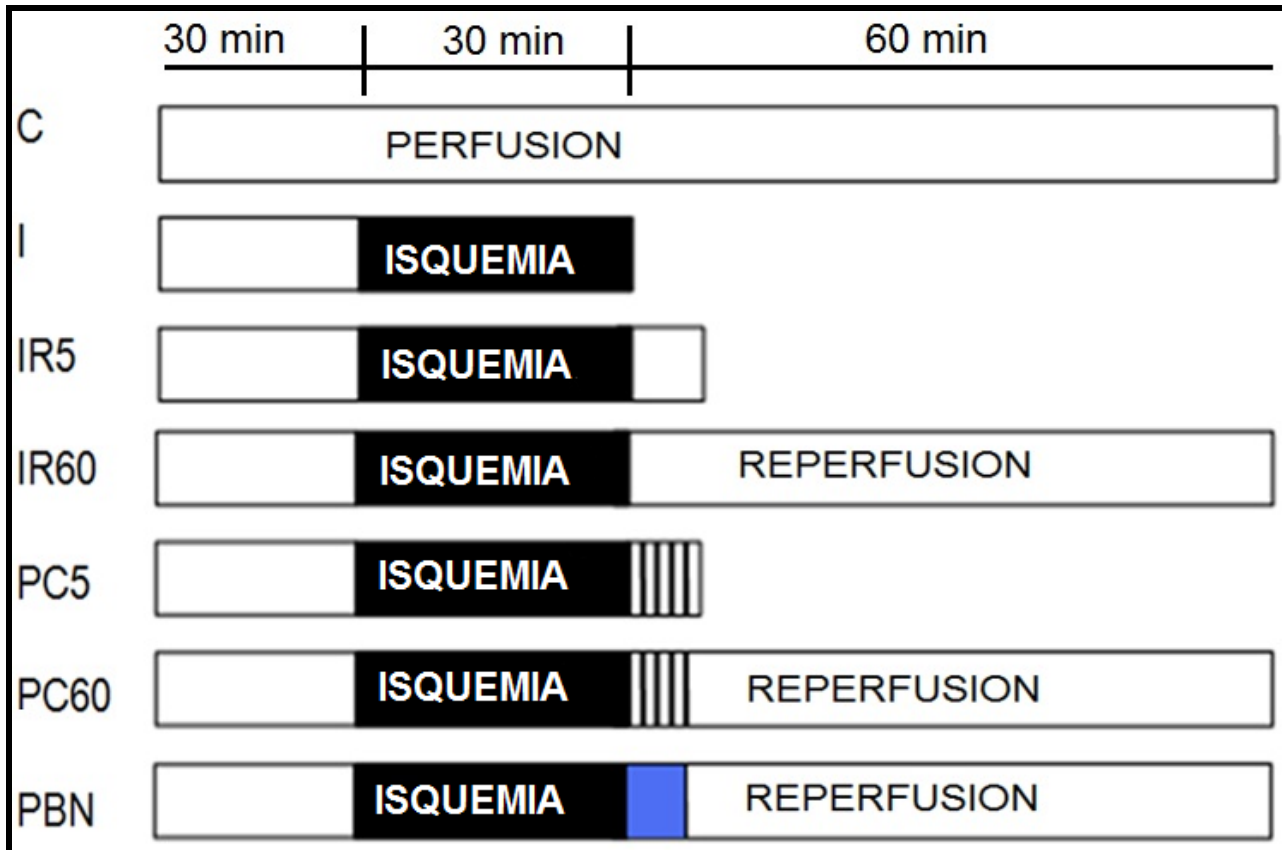


Figura 5 Diagrama de los grupos experimentales en el estudio: C = perfusión durante 90 minutos, I = isquemia durante 30 minutos; R5 = isquemia durante 30 minutos y 5 minutos de reperfusión, R60 = isquemia durante 30 minutos y 60 minutos de reperfusión, PC5 = isquemia, post-acondicionamiento y 5 minutos de la reperfusión; PC60= isquemia, post-acondicionamiento y 60 minutos de la reperfusión, PBN = isquemia, fenil-N-tert-butil-nitrona (cuadrado azul) y 60 minutos de la reperfusión.

2.-Oxidación de proteínas: Con el fin de evaluar el estrés oxidativo en el tejido miocárdico, se utilizó el Kit OxyBlot™ de International Incorporated (California, U.S.A.). Se homogeneizó el tejido de corazón en PBS, pH 7.0, con 1 mM PMSF y 50 mM de ditionitro (DTT), para evitar la oxidación de las proteínas después de la lisis celular. Entonces, se tomaron dos alícuotas de cada muestra (20 microgramos) que se transfirieron a tubos Eppendorf, donde se desnaturalizaron mediante la adición de una concentración final al 6% de dodecil sulfato sódico (SDS). Una alícuota se derivatizó a 2,4 dinitrofenilhidrazona (DNP), con 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), mientras que la alícuota utilizada como control negativo se incubó con el mismo volumen de solución control. Luego, las muestras se neutralizaron y se separaron por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y luego se incubaron con anticuerpos anti-DNP

(1:150) en 1% de BSA / PBS-T. Después se utilizaron anticuerpos secundarios para la detección de la señal (Figura 6).

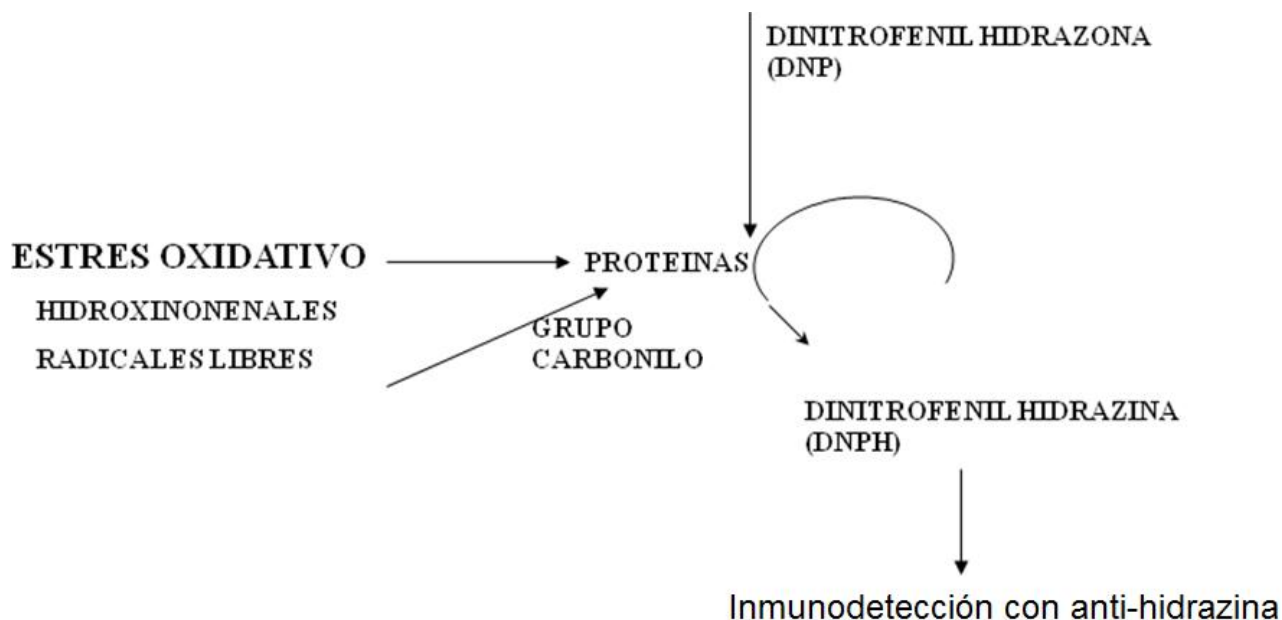


Figura 6. Detección de proteínas carboniladas.

3.- Determinación de malondialdehído: El malondialdehído (MDA) es un importante subproducto tóxico de la peroxidación de lípidos al igual que el 4-hidroxi-nonenal (4-HNE). La medición de estos aldehídos se ha usado ampliamente como un indicador de la oxidación de lípidos *in vitro* e *in vivo* (Esterbauer et al., 1990). Bajo condiciones de acidez y baja temperatura, el 1-metil, 2-fenilindol (1M2F) puede reaccionar con el MDA y con el 4-HNE y producir un cromóforo estable con una máxima intensidad de absorbancia a 586 nm. Se preparó la mezcla de reacción, al tubo blanco se añadió amortiguador de fosfatos 20 mM pH 7.4, solución 15.4 mM de 1M2F 15.4, acetonitrilo: metanol (3:1) y HCl; a los tubos estándares se les añadió concentraciones conocidas de TMPO (malondialdehído bis -dimetil acetal), solución 15.4 mM de 1M2F en acetonitrilo: metanol (3:1) y HCl; finalmente se añadió a la muestra aproximadamente 1mg de proteína del tejido cardíaco, HCl y solución de acetonitrilo: metanol (3:1). Una vez realizada la mezcla de reacción se incubó 40 minutos a 45°C, se centrifugó a 3000 g por

5 minutos. Finalmente se determinó la densidad óptica (DO) en un espectrofotómetro a 586 nm versus la curva estándar con TMPO. Los resultados se expresan en nmol MDA /mg de proteína.

4.-Medición de la cantidad relativa de enzimas antioxidantes glutatión peroxidasa, superóxido-dismutasa y catalasa mediante western blot: Al final de los diferentes tratamientos (Figura 5), los corazones de las ratas fueron congelados rápidamente y almacenados en nitrógeno líquido. Se homogenizó el tejido de corazón en PBS, pH 7.0, con 1 mM PMSF y se centrifugaron para eliminar los desechos celulares. Se midió el contenido de proteína por el método de Lowry (1951) y las muestras se desnaturalizaron para separar las proteínas por SDS-PAGE en condiciones reductoras; después se transfirieron a membranas de PVDF y luego se incubaron con anticuerpos primarios específicos para la SOD CuZn (0.2 µg/ml) de Abcam (Ab 16.831), la SOD Mn (dilución 1:1000) de Abcam (Ab8867), para catalasa (Abcam, RbAb 52477, dilución 1:1000) y de la glutatión peroxidasa (Abcam, Ab 22604, dilución 1:2,000), respectivamente. Después se incubaron las membranas con anticuerpos secundarios conjugados con fosfatasa alcalina (1:25,000) (Zymed Laboratories Inc., CA) y la señal fue detectada con el kit para quimioluminiscencia Immobilon (Millipore, MA). El control de carga se determinó mediante la incubación de las membranas contra un anticuerpo monoclonal anti-GAPDH (1,0 mg / ml) (Abcam, Ab9485). Las imágenes finales se analizaron con el Software J Image; expresando los resultados como intensidad relativa, haciendo la normalización correspondiente con el control de carga (GAPDH).

5.- Medición cualitativa de la transcripción de los genes de las enzimas antioxidantes mediante PCR.

El ácido ribonucleico (ARN) total fue aislado se aisló del tejido cardíaco utilizando el RNeasy minikit (Ciencias de QIAGEN, Germantown, EE.UU.). El ARN se cuantificó con densidad óptica a 260 nm (OD 260). A continuación, con 2 µg de ARN se obtuvo cDNA utilizando la enzima transcriptasa reversa (Invitrogen kit). El cDNA resultante se amplificó por PCR utilizando los siguientes primers: para SOD CuZn (forward: 5´- GCG AGC CTG AAG GAT TAA AT -3´ y reverse: 5´- GCG CCA TGT TTC TTA GAG T -3´, para SOD Mn

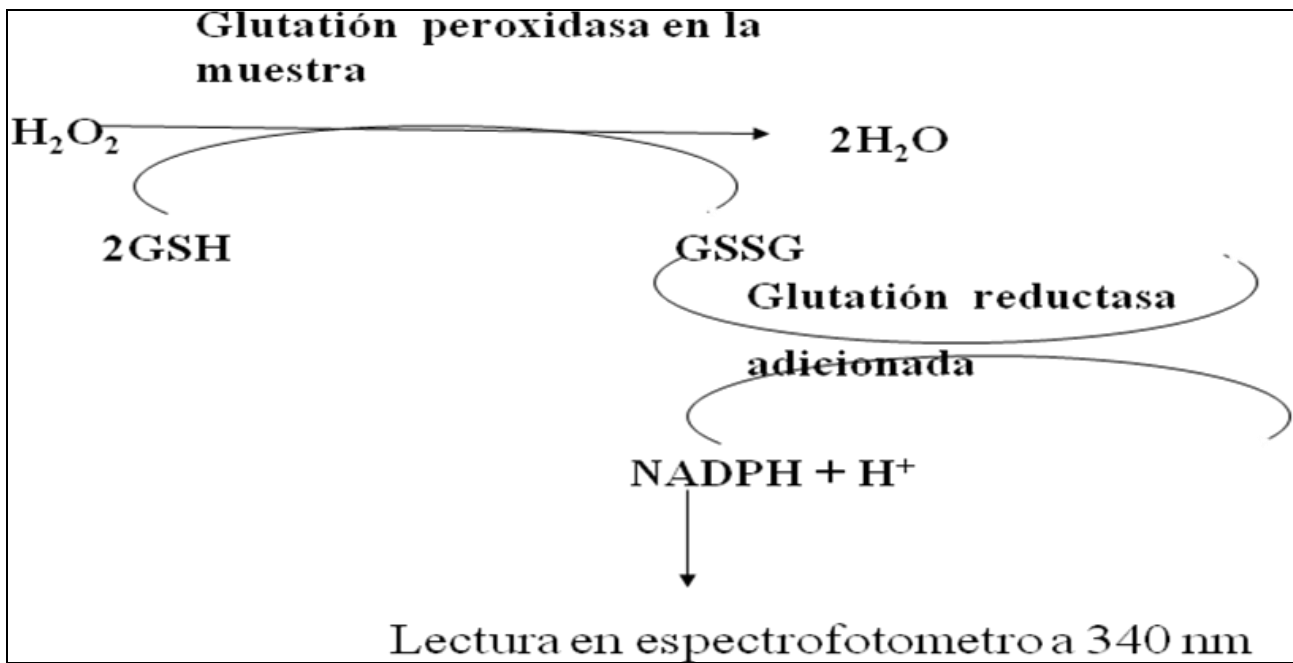


Figura 7. Actividad de glutación peroxidasa.

6.2 Glutation reductasa: La actividad de GR se midió mediante el método de Carlberg y Mannervik (1975). El consumo de NADPH en la reacción se midió a 340 nm.

6.3 Catalasa: Para medir la catalasa el tejido se homogenizó en amortiguador de fosfato de potasio 50 mM, pH 7.4 (100 mg/1 ml), el homogenizado se centrifugó a 40,000 g durante 30 minutos. El sobrenadante (50 μ L) se agregó a 2.95 mL de amortiguador de fosfato de potasio 50 mM y pH más 7.4 mM de H_2O_2 ; los cambios en la absorbancia a 240 se siguieron de manera continua durante 5 minutos (Figura 8). La actividad de la catalasa se registra en κ (constante de la velocidad de reacción)/miligramo de proteína) (Tapia et al., 2008.)



Figura 8. Actividad de catalasa.

6.4 Medición de la actividad de superóxido dismutasa en fracciones mitocondriales y citosólicas.

6.4.1 Aislamiento de mitocondrias y fracciones citosólicas:

Al final de los períodos de isquemia y reperfusión, los corazones fueron lavados con solución STE helada (sacarosa 250 mM, Tris-Na 10 mM, EDTA 1 mM a pH 7.4) y se procedió al aislamiento de mitocondrias por centrifugación diferencial como se reporta por Chávez et al. (1985). Los corazones se picaron finamente con tijeras Metzenbaum manteniéndolos todo el tiempo en un baño de hielo. Los fragmentos obtenidos se lavaron con la misma solución STE para eliminar los restos de sangre. El tejido se incubó durante 10 minutos a 4°C con esa misma solución, suplementada con 2 mg de enzima subtililina por cada cada corazón en 10 ml de solución STE. Después el tejido se centrifugó a 7,500 x g durante 10 minutos a 4°C, tras lo cual se decantó el sobrenadante que contenía a la enzima. Luego el tejido se homogenizó en solución STE sin enzima en un homogeneizador tipo Potter. El total del homogenizado se centrifugó a 2,500 x g para eliminar los restos de tejidos y núcleos celulares. El sobrenadante se centrifugó a 7,500 x g durante 10 minutos para recuperar la fracción mitocondrial. Las mitocondrias se suspendieron en la misma solución a la que se adicionó albúmina sérica bovina (BSA) libre de ácidos grasos al 0.1% y se incubaron durante 10 minutos a 4°C. La suspensión mitocondrial se centrifugó nuevamente a 7,500 x g durante 10 minutos y se resuspendió en la misma solución TSE sin BSA ni EDTA a pH 7.0. El sobrenadante de la primera centrifugación a 7,500 x g se recuperó y centrifugó a 45,000 x g durante una hora. Finalmente se guardaron el sobrenadante y el precipitado a -70°C, mismos que representan la fracción citosólica y de membrana plasmática respectivamente.

6.4.2 Superóxido dismutasa: Para medir la actividad de la SOD, se utilizó un método combinado de electroforesis y densitometría modificado de Beauchamp y Fridovich (Pérez, et al., 2009). El ensayo se realizó en un gel de poliacrilamida al 8% con un sistema para reducir azul de tetrazolio (NBT), el amortiguador de corrida se preparó sin

SDS, con glicerina 0.192 mM y Tris 0.025 mM, pH 8.3. Se realizó el ensayo con muestras de fracción citosólica y mitocondrial, en ambas fracciones se encuentran las dos isoformas, predominando SOD Mn en la fracción mitocondrial y SOD CuZn en la fracción citosólica.

Se agregaron a cada pozo 100 ug de cada muestra (fracción citosólica para el estudio de SOD CuZn o mitocondrial para el estudio de SOD Mn), sin SDS y sin hervir, se incluyó un carril para SOD (100 pg). Se corrió durante 4 h a 120 V, después se incubó el gel en NBT 2.45 mM en agua durante 20 minutos en oscuridad.

El gel se llevó a una solución de 36 mM de fosfatos + EDTA + riboflavina durante 5 minutos. Se eliminó el líquido y se expuso el gel a la luz hasta que oscureció, finalmente se lavó con agua. La riboflavina y el TEMED en gel en presencia de luz y oxígeno producen ROS. El NBT y la SOD compiten por ellos. El NBT se reducirá a un color azul, en donde hay SOD el gel permanecerá transparente (Figura 9). La SOD Mn tiene un peso molecular de 24 kDa y la SOD CuZn de 35kDa. Para el contenido de proteína en el carril estándar, se realizó la equivalencia en U de actividad y con 130 ng se obtuvieron 9.6 U/mg de proteína, dicho carril se tomó como referencia tanto para peso molecular como para actividad de SOD.

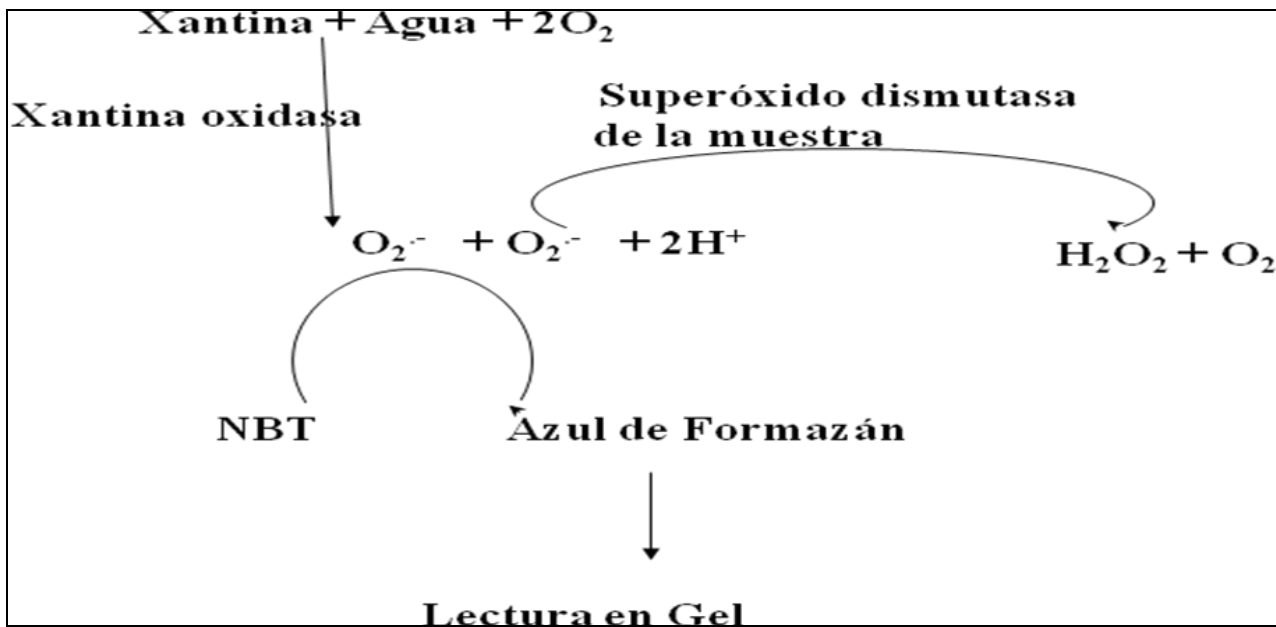


Figura 9. Actividad de SOD.

6.4.3.- Tiorredoxina reductasa (TrxR): Este ensayo se basa en la reducción de ácido dinitrobenzoico (DTNB) con NADPH a ácido nitrobenzoico (TNB) en ausencia y presencia de aurotiomalato, el cual es un inhibidor específico para la tiorredoxina reductasa. Se utilizó el kit de ensayo de actividad de TrxR de mamífero de Cayman™. Se midió en homogenados y se midió a 414 nm. Los valores se expresan en U/mg de proteína. Los resultados se corrigieron tomando en cuenta las reducciones independientes de DTNB no atribuidas a la tiorredoxina reductasa, como lo son las debidas a glutatión mediante la siguiente reacción: $TrxR + DTNB + NADPH + H^+ \rightarrow 2 TNB + NADP^+$

7. Glutatión total: La cantidad de glutatión total se determinó de manera directa, de acuerdo a la técnica de detección mediante HPLC, expresando el resultado en nmol/mg de proteína.

7.1. Medición de glutatión reducido (GSH): Ensayo fluorométrico con mCB (monoclorobimano). Este método se basa en la capacidad del mCB de formar un aducto estable fluorescente con el GSH, que puede ser medido fluorométricamente. Esta reacción es catalizada por la GST, el mCB por sí mismo no es fluorescente (Fernández

Checa, 1990). Este método es suficientemente específico y confiable para la determinación de GSH en el tejido (*Kamencic, 2000*). La medición se realiza con un espectrofluorómetro Synergy HT. Se utilizaron placas de 96 pozos Costa # 3915. Se preparó la mezcla de reacción con amortiguador de Krebs Henseleit a pH 7.4, mCB 1 mM, GST 1 U/ml y la muestra del tejido. Se leyó en el espectrofluorómetro a longitudes de onda de excitación = 385 nm y de emisión = 478 nm, durante un periodo de incubación de 30 minutos a 37°C, la lectura se realizó cada 15 minutos y se comparó contra una curva estándar de GSH. Los resultados se expresan en $\mu\text{mol GSH/mg}$ de proteína.

VII ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos obtenidos se analizaron de forma correspondiente mediante la prueba de t de Student y ANOVA, seguido de la prueba de Tukey. Los valores menores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

VIII RESULTADOS

1. Trabajo contráctil en corazones aislados

Las preparaciones de corazón aislado que no se sometieron a ningún tratamiento, mantuvieron constante tanto la frecuencia cardiaca como la presión ventricular izquierda (LVDP). El comportamiento del doble producto en el corazón aislado de ratas Wistar sometidos a los diferentes protocolos se presenta en la Figura 10.

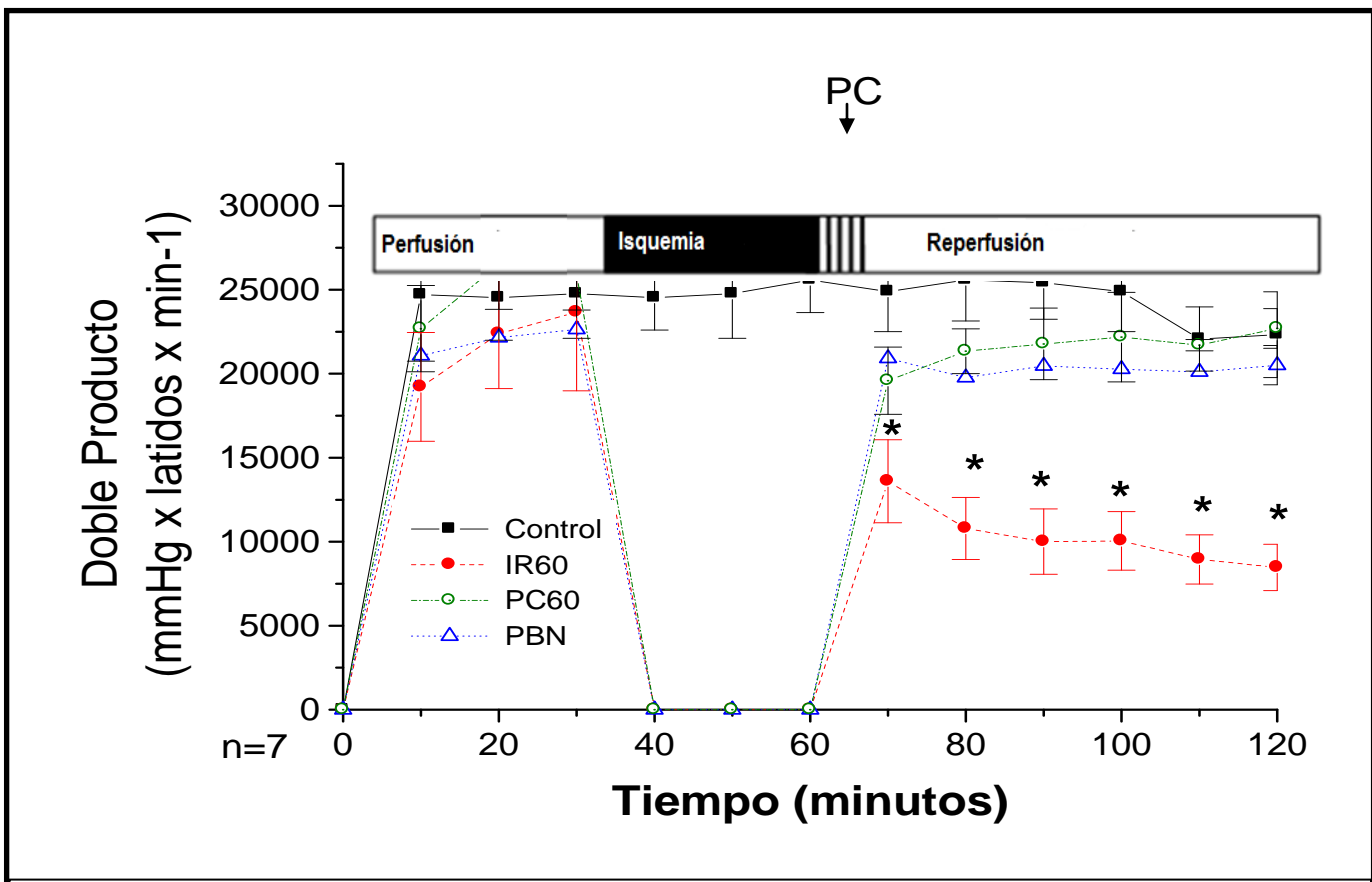


Figura 10. Comparación entre el post-acondicionamiento y el efecto de PBN en el rendimiento del miocardio en el corazón reperfundido. Grupo control (■); grupo isquémico-reperfundido (●); corazones post-acondicionados (○) y corazones isquémicos-reperfundidos + PBN (△). Los datos representan la media de siete experimentos \pm SD, excepto en el grupo con PBN donde $n = 3$. * $P < 0.05$ vs control y PC60 por ANOVA.

El doble producto de los corazones en los que se realizó 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión disminuyó desde los primeros cinco minutos de reperfusión (de $19,216 \pm 3,236$ mmHg x latidos x min^{-1} antes de la isquemia a $12,596 \pm 2,472$ mmHg x latidos x min^{-1}). A los 60 minutos de reperfusión, los valores disminuyeron aún más a $8,469 \pm 1,173$ mmHg x latidos x min^{-1} .

Lo anterior contrastó de manera notable con los corazones en los que se realizó la maniobra de post-acondicionamiento, en los cuales se registró un doble producto de $20,910 \pm 2,381$ y $22,697 \pm 1,176$ mmHg x latidos x min^{-1} a los 5 y 60 minutos de reperfusión, respectivamente la administración del atrapador de radicales libres PBN emula la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento miocárdico al registrarse un doble producto de $20,509 \pm 1,173$ mmHg x latidos x min^{-1} (Figura 10).

Al término de la reperfusión, no hubo diferencias significativas en el doble producto de los corazones controles, PC60 y PBN.

2. Cuantificación de malondialdehído y proteínas oxidadas

De cada uno de los grupos experimentales, se tomaron corazones para determinar marcadores de estrés oxidante. El daño oxidativo a proteínas y a lípidos se presenta en la Figura 11. Se observó un aumento en la oxidación de proteínas desde la isquemia, que se acentuó durante los primeros cinco minutos de la reperfusión y se mantuvo hasta el final de la misma. En los corazones a los que se les aplicó la maniobra de post-acondicionamiento, se apreció una reducción significativa de la oxidación en las proteínas. También se observó un significativo incremento de malondialdehído en los homogenados de los corazones reperfundidos donde no se realizó post-acondicionamiento versus aquéllos corazones donde se practicó dicha maniobra.

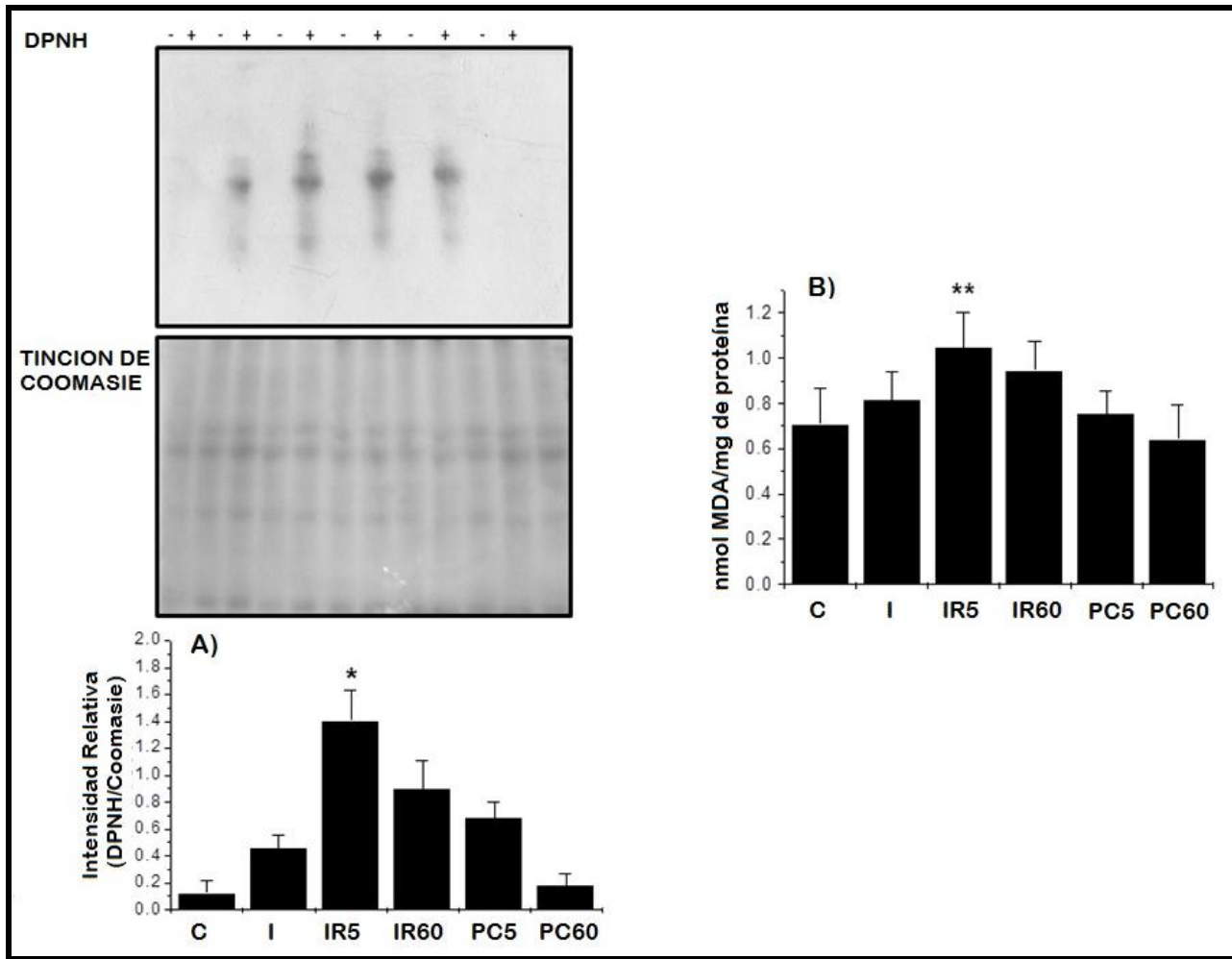


Figura 11. Marcadores de estrés oxidante en homogenados de corazones post-acondicionados. A) Autoradiografía representativa de proteínas carboniladas en los homogeneizados de miocardios post-acondicionados. Se muestran los controles negativos, sin DPNH para cada muestra (-) y una imagen del gel teñido con azul de Coomassie tras la inmunotransferencia. La cuantificación de la señal se hizo como se describe en la sección de métodos. * $P < 0,05$ para todos los grupos excepto IR/60. B) Contenido de malondialdehído en homogenados de corazones de ratas de los diferentes grupos experimentales. ** $P < 0,05$ respecto PC60.

3. Cantidad relativa de enzimas antioxidantes

La única enzima que cambió significativamente ($P < 0.05$) en corazones post-acondicionados versus los corazones isquémicos-reperfundidos sin la maniobra fue la SODCuZn (Figura 12). También se observó una tendencia en el aumento de la cantidad relativa de SODMn, catalasa y Gpx-1 en el grupo PC60, sin

embargo no fueron significativas contra su respectivo grupo isquémico reperfundido (IR60).

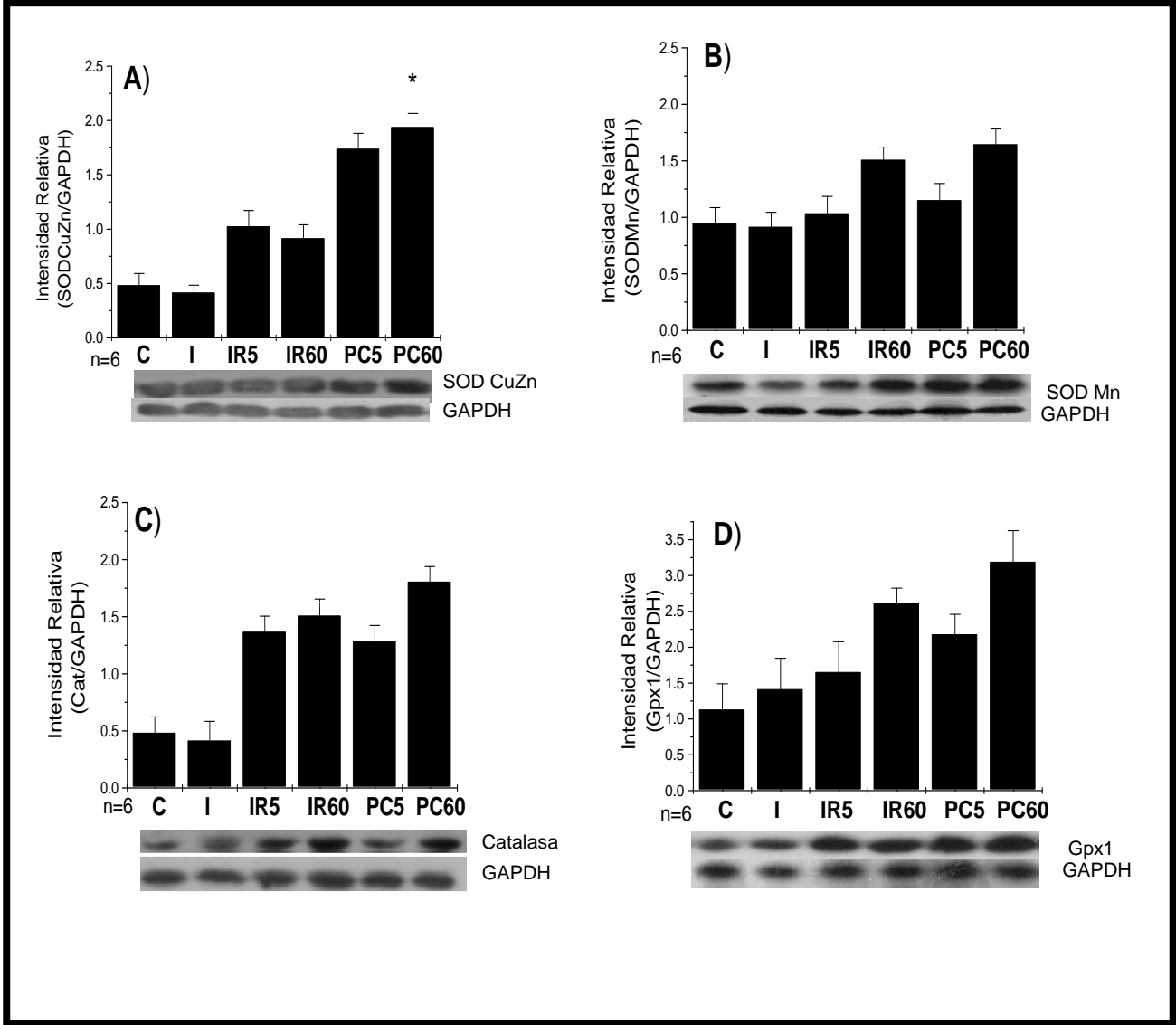


Figura 12. Contenido relativo de enzimas antioxidantes en corazones post-acondicionados. Western blot representativo y análisis densitométrico de tres muestras independientes de los grupos descritos en la Figura 5. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de la intensidad de la señal obtenida. Los resultados obtenidos se normalizaron contra GAPDH. A) SOD CuZn; B) SOD Mn; C) catalasa; D) GPx1. * $P < 0.05$ vs IR60 por ANOVA

4. Expresión de enzimas antioxidantes:

También evaluamos los niveles de ARNm de las cuatro enzimas (Figura 13). Encontramos un incremento de 1.4 veces en la transcripción de SOD CuZn en corazones PC60 comparado con corazones IR60 ($P<0.05$) (Figura 13A) y un incremento de 1.3 veces en los transcritos de GPx-1 corazones PC60 ($P<0.05$ vs. corazones IR60) (Figura 13D). No se encontraron diferencias entre estos grupos, en el caso de catalasa y de SOD Mn entre los grupos reperfundidos versus aquellos grupos donde se realizó la maniobra de post-acondionamiento miocárdico.

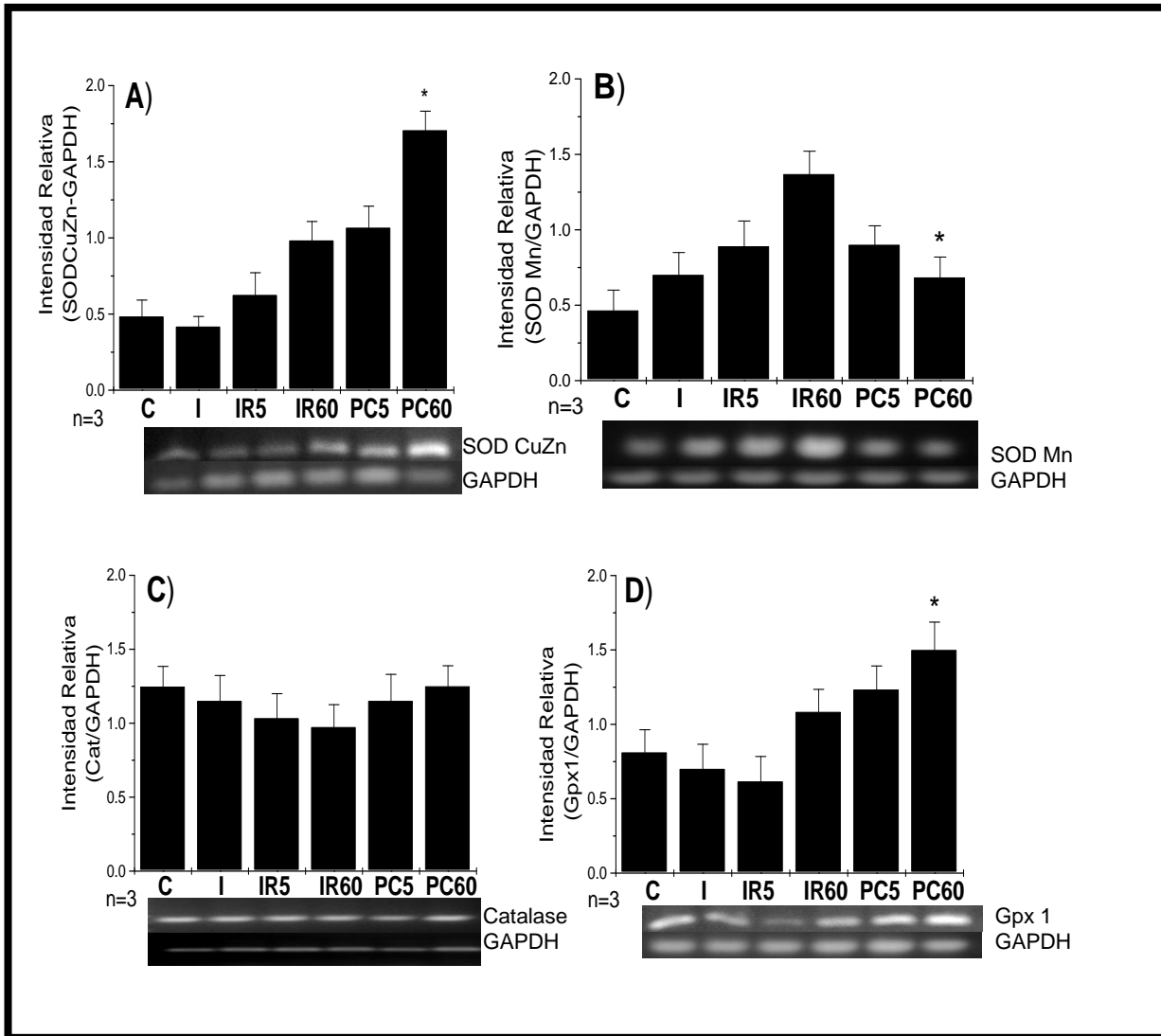


Figura 13: Niveles de ARNm de las enzimas antioxidantes en los corazones post-acondicionados. Se presentan imágenes de los geles de agarosa de los grupos descritos en la Figura 5. Las barras representan la media \pm la desviación estándar de la intensidad de la señal obtenida de tres experimentos diferentes. Los resultados obtenidos en la PCR se normalizaron contra GAPDH. A) SOD CuZn; B) SOD Mn; C) catalasa; D) GPx-1. * $P < 0,05$ vs IR60 por ANOVA.

También se midió la actividad de las enzimas antioxidantes. Se encontró una diferencia significativa entre los grupos de corazones post-acondicionados y los isquémico-reperfundidos en el caso de SOD CuZn. La actividad fue de 47.3 ± 2.6 U/mg de proteína y 30 ± 5.4 U/mg de proteína respectivamente. No se encontraron diferencias entre estos grupos, en el caso de catalasa, GPx, GR, SOD Mn. La actividad de la tioredoxina reductasa fue significativamente mayor en el grupo de corazones isquémicos que no fueron reperfundidos.

	CATALASA (K/mg proteína)	SOD CuZn(U/mg proteína)	SOD Mn U/mg proteína)	GLUTATION PEROXIDASA (U/mg protein)	GLUTATION REDUCTASA (U/mg protein)	TIOREDOXINA REDUCTASA (U/mg protein)
C	0.04 ± 0.01	3.7 ± 2.8	4.4 ± 2.2	0.19 ± 0.04	0.02 ± 0.003	0.14 ± 0.04
I	0.04 ± 0.01	13.6 ± 3.2	7.6 ± 3.2	0.21 ± 0.04	0.01 ± 0.003	$0.21 \pm 0.06^{**}$
IR5	0.04 ± 0.02	20.1 ± 4.0	17.1 ± 2.8	0.19 ± 0.05	0.01 ± 0.004	0.11 ± 0.03
IR60	0.02 ± 0.01	30.0 ± 5.4	23.0 ± 4.0	0.20 ± 0.03	0.02 ± 0.01	0.12 ± 0.02
PC5	0.04 ± 0.01	30.8 ± 3.7	11.4 ± 2.8	0.18 ± 0.05	0.01 ± 0.004	0.12 ± 0.05
PC60	0.03 ± 0.01	$47.3 \pm 2.6^*$	18.2 ± 2.6	0.19 ± 0.03	0.01 ± 0.003	0.15 ± 0.02

Tabla I. Actividades de enzimas antioxidantes en corazones post-acondicionados. La actividad se analizó en fracciones citoplasmáticas por duplicado. En el caso de CuZn SOD y Mn SOD, la actividad enzimática se midió por el método mixto de electroforesis y densitometría. * P <0,05 vs IR60 y ** de I vs todos los grupos por ANOVA.

En la Figura 14 se presentan geles representativos de la actividad enzimática de SOD CuZn y SOD Mn en fracciones citosólicas y mitocondriales de corazones isquémicos reperfundidos versus post-acondicionados y se encontró un incremento al final de la reperfusión (IR60) de ambas isoformas respecto a los controles, pero solamente SOD CuZn se incrementó 1.5 veces más en los corazones post-acondicionados (PC60) en comparación a los corazones isquémico-reperfundidos.

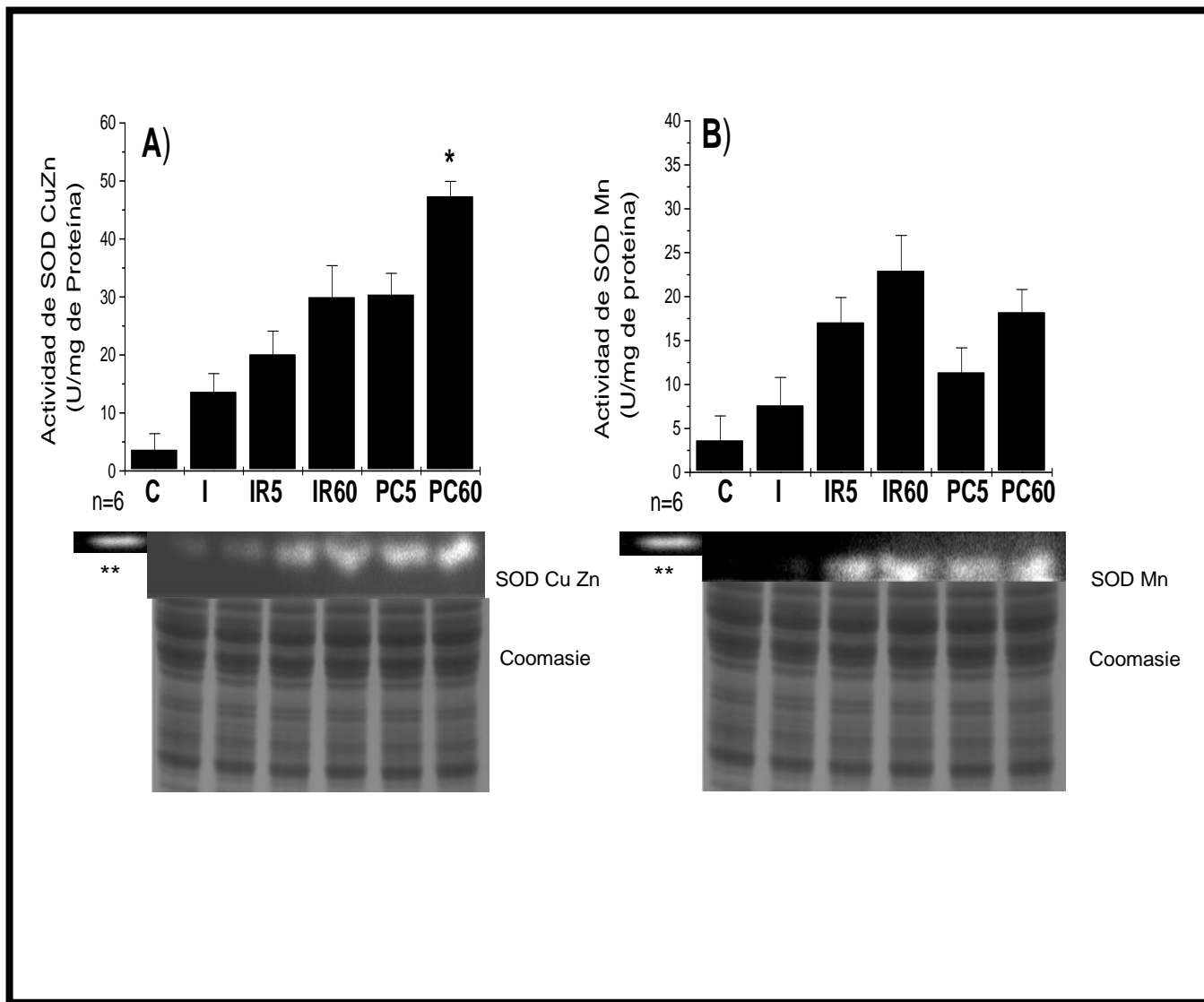


Figura 14: Gel representativo del ensayo de la actividad de SOD Cu-Zn y SOD Mn en corazones post-acondicionados. Se muestra como control de carga la tinción con azul de Coomassie de la porción del gel que incluye a las SODs. El gráfico representa la media \pm D.E. de tres experimentos diferentes. * $P < 0,05$ vs IR60 por ANOVA; ** Imagen que representa la actividad de SOD equivalente a 10 U totales cargadas en el gel.

6. Inhibición de la superóxido dismutasa CuZn con ácido dietilmetilcarbámico

Para evaluar la importancia funcional de la superóxido dismutasa de CuZn en la cardioprotección obtenida al realizar la maniobra de post-acondicionamiento miocárdico, se decidió experimentar con un grupo de corazones donde se perfundió ácido dietilcarbámico (ADMC). Se sabe que este compuesto inhibe de manera relativamente específica a las SODs. Descartamos que el ADMC tuviera efecto sobre los corazones controles, pues algunos de ellos fueron perfundidos continuamente con el compuesto sin que hayamos observado que se comprometía la función cardíaca.

En los corazones post-acondicionados en los cuales se administró ADMC solo durante la reperfusión, se registró una disminución de $26,486 \pm 2,749$ mmHg x latidos x min^{-1} antes de la isquemia a $17,937 \pm 1952$ mmHg x latidos x min^{-1}) a los 60 minutos de reperfusión.

Cuando se administró ADMC durante todo el protocolo, incluyendo la fase de perfusión previa a la isquemia, los valores disminuyeron aún más a $14,469 \pm 1,383$ mmHg x latidos x min^{-1} al término de la reperfusión.

Se observó una disminución parcial, pero significativa ($P < 0.05$) del trabajo cardíaco versus aquéllos corazones donde se realizó la maniobra de post-acondicionamiento sin inhibidor, en los cuales se registró un doble producto de $22,197 \pm 1,176$ mmHg x latidos x min^{-1} a los 60 minutos de reperfusión.

Lo anterior confirma la participación parcial de la SOD CuZn en la cardioprotección derivada de la aplicación de la maniobra. (Figura 15).

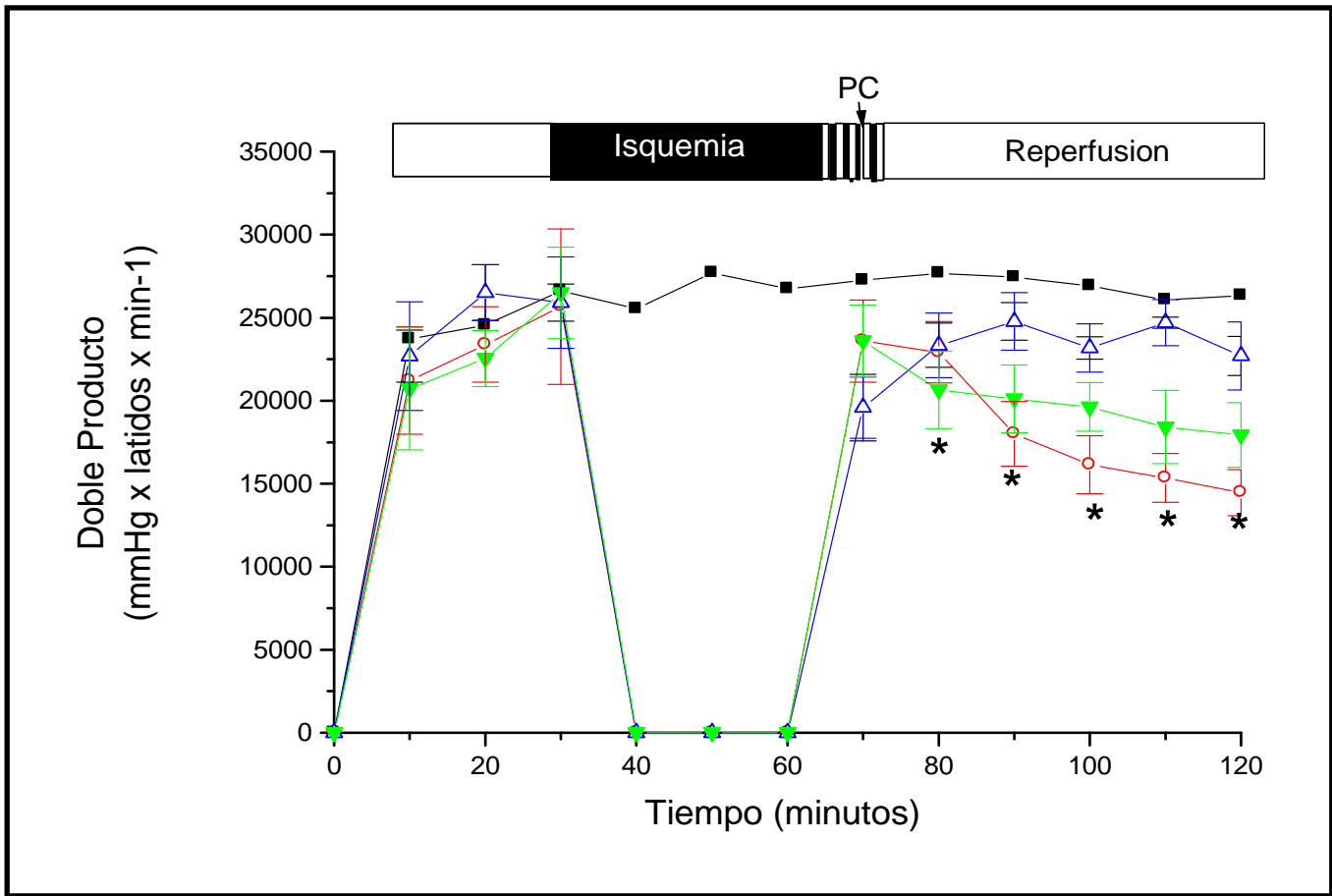


Figura 15: Comportamiento del doble producto en corazones isquémico-reperfundidos en los cuales se administró ácido dietil-metil-carbámico en la solución de Krebs Henseleit. Los datos representan la media y desviación estándar de grupos de 3, excepto en los corazones controles donde se administró ácido dietil-metil-carbámico (ADMC) durante toda la perfusión donde n=2 (■). Corazones PC60 (Δ); PC60 + ADMC 1mM durante todo el protocolo (○); PC60 + ADMC 1 mM sólo durante la reperfusion (▼). *P≤0.05 vs. control y PC 60. n= 3.

7. Sistema antioxidante directo: glutatión total, oxidado y reducido.

Los hallazgos obtenidos en el sistema antioxidante directo (glutatión total, glutatión reducido y glutatión oxidado) en el estudio de homogenados de corazón aislado se presentan en la tabla 2. Respecto al glutatión total, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de corazones reperfundidos versus los corazones en donde se realizó la maniobra de post-acondicionamiento miocárdico.

En el caso de glutatión reducido sí se observaron diferencias entre ambos grupos y consecuentemente al realizar la diferencia entre el glutatión total y el glutatión reducido, esto también se reflejó en el contenido de glutatión oxidado. La relación GSH/GSSH fue mayor en el grupo donde se realizó la maniobra de protección miocárdica (5 vs. 0.8 P<0.05).

	GSH red (umol/mg proteína)	GSSG (umol/mg proteína)	Relación GSH/GSSH
C	0.004 ± 0.0003	0.0006	6.66
I	0.003 ± 0.0006	0.0007	4.28
IR5	0.003 ± 0.0004*	0.0013	2.30
IR60	0.002 ± 0.0001*	0.0025	0.8
PC5	0.003 ± 0.0003	0.0014	2.14
PC60	0.003 ± 0.002**	0.0006 **	5 **

Tabla 2: Cuantificación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG). El glutatión total y el glutatión reducido se obtuvieron como se describe en la metodología. La diferencia entre ambos representa el glutatión oxidado. La relación GSH / GSSH se calculó mediante la ecuación $GSH - 2GSSG / GSSG$. * P < 0.05 vs IR60 por ANOVA.

8. Respuesta antioxidante en corazones post-acondicionados de ratas con síndrome metabólico

Ya que en la literatura se encuentra información controversial en relación a la efectividad de las maniobras de cardioprotección en modelos animales donde se inducen desórdenes metabólicos como hipercolesterolemia, hipertrigliceridemia e hiperglucemia, decidimos realizar algunos experimentos en un modelo de ratas con síndrome metabólico, para definir la eficacia de la maniobra de post-acondicionamiento miocárdico en el modelo de corazón aislado. Los animales nos fueron donados por la Dra. Guadalupe Baños y el Dr. Mohammed el Hafidi, quienes han demostrado el establecimiento de la patología en estos animales (*Pérez I, 2008, 2009*).

Por lo tanto, evaluamos la participación de la hipertrigliceridemia como factor comórbido en la isquemia-reperfusión en ratas HTG en las cuales se realizó la maniobra de post-acondicionamiento y en aquéllas donde no se aplicó dicha maniobra.

El doble producto de los corazones de ratas hipertrigliceridémicas a los que se aplicó 30 minutos de isquemia y 60 minutos de perfusión disminuyó de $26,317 \pm 4,680$ mmHg x latidos x min^{-1} antes de la isquemia a $2,347 \pm 1,466$ mmHg x latidos x min^{-1} al término de la perfusión. Este comportamiento difiere de manera significativa con los corazones de ratas hipertrigliceridémicas en los que se realizó la maniobra de post-acondicionamiento, en los cuales se registró un doble producto de $24,806 \pm 1,110$ y $22,697 \pm 1,338$ mmHg x latidos x min^{-1} antes de la isquemia y a los 60 minutos de perfusión respectivamente. En estos corazones, la recuperación del trabajo cardiaco fue más lenta que la observada en los corazones de animales sin co-morbilidad asociada, sin embargo finalmente llegó a ser del 90% respecto al valor de su grupo control.

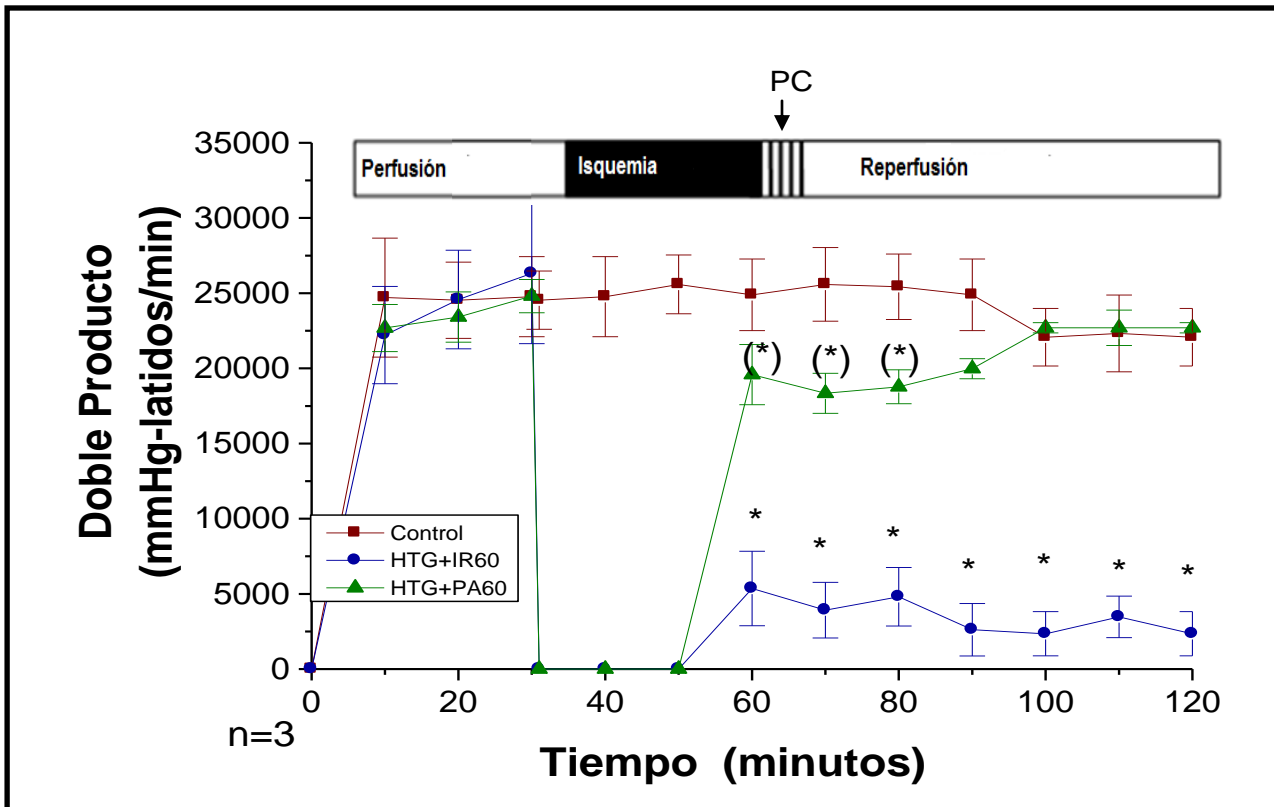


Figura 16: Comportamiento del trabajo cardiaco en corazones isquémico-reperfundidos de ratas con síndrome metabólico. Control = animales con síndrome metabólico perfundidos durante 120 minutos con solución de Krebs Henseleit. HTG+Pac60: corazones de ratas con síndrome metabólico + Post-acondicionamiento miocárdico; HTG+ I/R60: Corazón de ratas con síndrome metabólico sometidas a isquemia y reperfusion prolongada. * $P < 0.05$ respecto al grupo control y a HTG+PA60. (*) $P < 0.05$ respecto al grupo control y a HTG+IR/60.

En este modelo experimental, se obtuvo una reproducibilidad en relación a la diferencia de actividad enzimática de la SOD CuZn, la cual fue significativamente diferente, siendo 1.4 veces mayor en corazones post-acondicionados, versus aquellos corazones reperfundidos en los cuales no se aplicó la maniobra de cardioprotección (Figura 17).

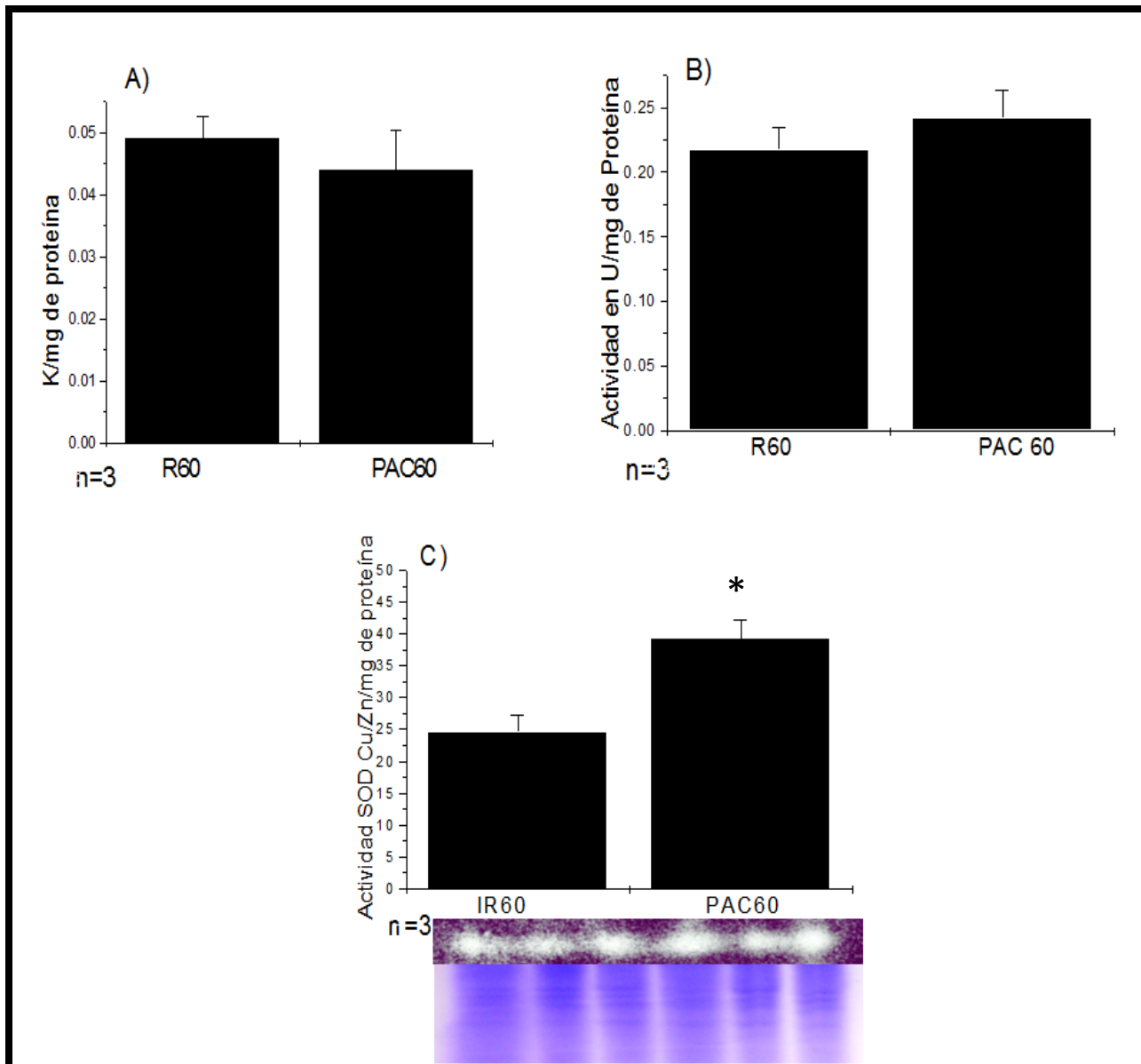


Figura 17. Actividad de algunas enzimas antioxidantes en corazones post-acondicionados de ratas hipertriglicéridémicas. A) Catalasa; B) Glutathión Peroxidasa; C) Imagen representativa del ensayo de la actividad enzimática de SOD Cu-Zn. El gráfico se realizó tras la cuantificación de tres experimentos diferentes, utilizando como referencia la señal observada con 10 U de SOD cargadas en el gel. * P < 0,05 vs. IR60 por ANOVA.

También se obtuvo reproducibilidad en el comportamiento del sistema antioxidante directo en los corazones aislados de ratas con síndrome metabólico. Nuevamente no se observaron diferencias en el glutatión total entre los grupos de corazones reperfundidos versus los corazones en donde se realizó la maniobra de post-acondicionamiento miocárdico, pero sí fueron significativas en el caso del GSH (**Tabla 3**).

n=6	GSH (umol/mg proteína)	GSSG (umol/mg proteína)	Relación GSH/GSSH
HTG + IR60	0.0026 ± 0.00045	0.00109	0.22
HTG + PC60	0.0040 ± 0.00056	0.00051*	5.88*

Tabla 3: Cuantificación de glutatión reducido (GSH) y glutatión oxidado (GSSG) en corazones de ratas hipertriglicéridémicas en protocolos de isquemia reperfusión (HTG+ IR60) y post-acondicionamiento (HTG+ PC60). El glutatión total y el glutatión reducido se obtuvieron como se describe en la metodología. La diferencia entre ambos representa el glutatión oxidado. La relación GSH / GSSH se calculó mediante la ecuación $GSH - 2GSSG / GSSG$. * P <0.05 vs IR60 por ANOVA.

IX DISCUSION

Los reportes referentes al papel de los sistemas antioxidantes en la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento son escasos. En el 2005, Serviddio demostró que la cantidad de glutatión reducido (GSH) aumenta en cultivos de cardiomiocitos sometidos a ciclos cortos de hipoxia/normoxia después de periodos prolongados de hipoxia (Serviddio 2005). Se ha documentado en el mismo modelo experimental, una menor producción de radicales superóxido en cardiomiocitos con post-acondicionamiento, en comparación con cardiomiocitos que no se sometieron a los ciclos de hipoxia/normoxia (2 μ M/g de proteína versus 8 μ M/g de proteína), así como una disminución en la concentración de H₂O₂ (7 μ M/g de proteína versus 10 μ M/g de proteína) (He et. al 2005), lo que sugiere que en el post-acondicionamiento, el GSH es relevante para contender contra el estrés oxidativo generado durante la reperfusión.

En este trabajo, observamos un incremento significativo en la carbonilación de proteínas de los corazones reperfundidos lo que implica un daño oxidativo importante, que disminuyó en los corazones post-acondicionados. Otros experimentos que apoyan la importancia del daño por estrés oxidativo fueron aquéllos en donde se administró el antioxidante α -fenil-ter-butil nitrona (PBN). Si bien este compuesto no es específico, actúa principalmente anulando al OH \cdot (Figura 1), en nuestros experimentos el PBN mimetizó el efecto protector del post-acondicionamiento.

Es claro que la atenuación del estrés oxidante forma parte de los mecanismos activados por el post-acondicionamiento. En este sentido, en el mismo modelo de isquemia-reperfusión, aunque ligando el tronco de la arteria coronaria izquierda, se encontró que el post-acondicionamiento disminuyó los niveles de MDA, de TNF alfa, la actividad de caspasa 3 y el contenido de Bcl-2 (Kin et al, 2008), sin que se haya establecido cuáles son los sistemas de defensa involucrados.

Otros trabajos han reportado la disminución del ión superóxido en zonas cercanas al área de riesgo de los corazones post-acondicionados en comparación con los corazones isquémico-reperfundidos (Iliodromitis et al., 2006; Lauzier et al., 2008). También se ha descrito que la actividad de aconitasa se preserva en mitocondrias

aisladas de corazones postcondicionados, lo que sugiere una estrecha interdependencia entre la integridad mitocondrial y la disminución del estrés oxidativo (Correa et al. 2008). Estudios recientes indican que el desacoplamiento moderado puede tener un papel protector en la mitocondria dañada por la isquemia, disminuyendo la producción de especies reactivas de oxígeno y recaptura de calcio (Paillard et al., 2009); en tanto otros grupos proponen que las señales activadas por el postcondicionamiento protegen a la mitocondria dañada por la isquemia (Chen et al., 2007).

Por otra parte, hay que considerar el papel que las especies reactivas de oxígeno juegan en la cardioprotección, pues paradójicamente, los radicales libres activan mecanismos involucrados en la síntesis y activación del sistema antioxidante. En un estudio de vasoconstricción mediada por angiotensina II, se demostró que las especies reactivas de oxígeno no son sólo tóxicas sino también actúan como segundos mensajeros en las vías de transducción de señales cardioprotectoras (Penna et al. 2009), aunque la identificación del sitio de generación de las especies reactivas de oxígeno, así como los mecanismos para la inducción de la transducción de señales de protección, no se conocen del todo. En los últimos años la importancia de la señalización de especies reactivas de oxígeno es un tema importante de investigación en diversos campos (Raedscherlders et al., 2012).

Sorprendentemente, poco se conoce acerca de la contribución de las enzimas antioxidantes en corazones postcondicionados. Un estudio reciente mostró que la cardioprotección conferida por el postcondicionamiento se asoció con una disminución en la actividad de la SOD, aún cuando los niveles de dicha enzima aumentaban con respecto a los corazones isquémicos-reperfundidos (Penna et al., 2011). Por el contrario, en nuestro estudio, encontramos un incremento significativo en la expresión, cantidad y actividad de la superóxido dismutasa de CuZn y un menor consumo de glutatión reducido en los corazones post-acondicionados. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Hu et al. (2008), quienes describieron que la cantidad de malondialdehído (MAD), que aumentó significativamente en un modelo de isquemia y perfusión *in vivo* al ligar la arteria descendente anterior durante 30 minutos, disminuyó tras la aplicación de la maniobra de post-acondicionamiento y se incrementó la actividad de la SOD. Sin embargo, no definieron cuál de las dos isoformas de la SOD aumentó su

actividad. Una posible explicación para esta discrepancia es que la actividad de las isoenzimas está compartimentalizada y la actividad de la SOD total como suma no permite individualizar la medición de las isoenzimas involucradas.

Para comprobar la participación de la SODCuZn en la cardioprotección conferida por el post-acondicionamiento, administramos durante la reperfusión el inhibidor de la enzima, ácido dietil-ditio-carbamato (ADEMC), que abatió el efecto de la maniobra (Figura 7). La disminución en la función cardíaca del corazón postacondicionado se observó cuando el órgano fue perfundido con el ADEMC durante todo protocolo, pero no cuando dicho inhibidor fue administrado después de los ciclos del postacondicionamiento. Nosotros concluimos que la contribución de la SODCuZn a la cardioprotección es parcial y hay otros factores involucrados.

Por otra parte también observamos que al aumento de la SODCuZn no correspondió con un incremento concomitante de las actividades de la catalasa ni de la Gpx, lo cual podría favorecer la acumulación intracelular de H_2O_2 . Al respecto, nuestros resultados muestran que en los corazones postacondicionados la relación GSH/GSSG se encuentra incrementada. El GSH podría actuar directamente como atrapador de radicales libres, o como donador de electrones para neutralizar peróxido de hidrógeno y lipoperóxidos, evitando la acumulación y el posible daño por H_2O_2 .

La importancia de las SODs en condiciones de isquemia y reperfusión ya se ha estudiado. Se sabe que la sobreexpresión moderada de SODCuZn en células endoteliales protege al corazón contra el daño provocado por la isquemia-reperfusión en ratones transgénicos TgN(SOD1)3Cje (Chen et al., 2000). En otro estudio, después de transfectar ratones con adenovirus recombinantes, la sobreexpresión de SODCuZn y SODMn proporcionaron protección del daño por la reperfusión cerebral con disminución de la inducción del factor nuclear κB (Kinouchi et al., 1991). Por otro lado, Jones y sus colaboradores (2003) encontraron en el modelo de corazón *in vivo* en rata, un incremento durante la reperfusión de la isoforma mitocondrial dependiente de Mn (SODMn) después de una isquemia prolongada. Así mismo en cerebro, se ha documentado un incremento en la actividad de SODMn y una disminución en la de SODCuZn durante la reperfusión

(Danielisova et al., 2007). En nuestro estudio se encontró un aumento de la actividad de ambas isoformas durante la reperfusión, con respecto a los niveles del control.

También resulta interesante la observación realizada en bacterias, de que el contenido de GSH regula negativamente la transcripción de SODMn (Gardner et al, 1981). El aumento del GSH en los corazones post-acondicionados podría afectar la transcripción de esta isoforma. Otra posible explicación para el aumento en la expresión, cantidad y actividad de SOD CuZn en nuestros experimentos, en comparación con SOD Mn, podría ser que existiera una menor demanda de la actividad de esta isoforma localizada en la mitocondria, ya que se ha reportado que durante el post-acondicionamiento se preserva la integridad y el funcionamiento mitocondrial (Correa et al, 2008; Bopassa et al, 2006).

Por otra parte, la regulación de la transcripción de las isoformas SOD CuZn y SOD Mn, es distinta: el gen de SOD CuZn se encuentra en el cromosoma 21 en humano y 16 en rata (Zelko et al. 2002), y Sp1, Erg 1 y AP2 son factores que estimulan su transcripción (Kim et al., 1996, Mine et al., 1999). En tanto el gen de SOD Mn se encuentra en el cromosoma 6 en humano y en rata y su transcripción es estimulada por Sp1, pero inhibida por AP2 (Zhu et al., 1998).

Los elementos que promueven la transcripción de SODCu Zn son la radiación UV, metales pesados, H₂O₂, ON y ácido araquidónico, mientras que la transcripción de SOD Mn es fuertemente promovida por TNF alfa, IL1 e IL6 (Warner et al., 1994), estos últimos factores se encuentran incrementados en corazones reperfundidos pero no en aquéllos donde se realizó el postacondicionamiento (Hu et al., 2008, Kin et al, 2008). Otros estudios señalan que el aumento en la fosforilación de ERK 1/2 está asociado con la disminución en la cantidad de lactato deshidrogenasa, de creatina cinasa y con el incremento de SOD total miocárdica (Zhongua et al. 2008). Aunque en dichos estudios no se exploraron de forma específica los cambios en el aparato antioxidante, se ha sugerido que ERK 1/2, podría estar relacionada con la activación de Nrf2, factor de transcripción nuclear que se acumula en el núcleo cuando se incrementan las ERO y se une a su elemento de respuesta antioxidante (ARE) en el promotor de genes involucrados en la respuesta antioxidante (Zahoor et. al., 2007, Heping et al., 2005).

El Nrf2 induce la transcripción de SOD (Zhu, 2005) y de las enzimas implicadas en la formación del glutatión como la gama glutamil cisteína ligasa (Suh et al., 2004). Por otra parte, la PI3/Akt, utilizada por varios tipos celulares para la inhibición de la apoptosis, favorece la expresión de SOD Cu Zn vía la activación del factor nuclear NFκB, sugiriendo que la activación de esta vía puede reforzar la capacidad antioxidante y dar protección con el daño oxidativo al favorecer la transcripción de genes antioxidantes (Shah ZA et al., 2007, Rojo et al., 2004). En última instancia, además, los radicales libres pueden contribuir a la activación del factor de transcripción NFκb (Sasaki et al. 1999, Kabe et al. 2005, Kin, 2008). La proteína activadora 1 (AP1) es otro factor de transcripción que regula la expresión de enzimas antioxidantes como CAT, SOD Cu/Zn y GPx (Lucy et al., 2001, Kim et al., 1996). Por otra parte debe considerarse la importancia de la señalización por las especies reactivas de oxígeno (Poyton et al., 2009 y Raedschelders et al., 2012) en diferentes procesos.

En este estudio también exploramos el efecto del post-acondicionamiento en ratas hipertriglicéridémicas sometidas a isquemia y reperfusión, para determinar si la comorbilidad asociada a esta patología, afectaba la eficacia del post-acondicionamiento y el comportamiento del sistema antioxidante. Encontramos que los cambios observados en el comportamiento de SOD Cu-Zn el modelo de isquemia aguda, se presentan también en el modelo de rata hipertriglicéridémica (Figura 9).

En relación a los modelos con co-morbilidad utilizados para probar la eficacia del post-acondicionamiento, nuestros resultados concuerdan con trabajos en ratas y conejos hipercolesterolémicos (Ferdinand et al., 2007, Donato et al., 2006), sin embargo es importante señalar que la efectividad de la maniobra decrece de acuerdo a la complejidad y grado de avance de dicha co-morbilidad (Iliodromitis et al., 2006). Respecto a la hiperglucemia e hiperinsulinemia, es pertinente mencionar que se ha documentado la efectividad del post-acondicionamiento en pacientes diabéticos (Mewton et al., 2003), lo cual no se relaciona con lo reportado en modelos animales (Valko et al., 2007).

Es importante mencionar que hasta donde sabemos, no existen reportes sobre la actividad del sistema antioxidante en corazones post-acondicionados de animales con

una patología co-mórbida, por lo que los resultados mostrados en este estudio son la primera aproximación al respecto. En la figura 14, se resumen las posibles vías de activación y regulación del sistema antioxidante durante la isquemia/reperfusión y el post-acondicionamiento.

Tomamos en consideración que el modelo de perfusión ex vivo de corazón de rata tiene menos relevancia para la extrapolación al aspecto clínico que el modelo in vivo. No obstante, como ha sido demostrado en otros estudios, la protección del post-acondicionamiento no depende de factores celulares sanguíneos sugiriendo un papel preponderante de las células endoteliales y miocárdicas (Yang et al., 2005), por lo que el presente modelo es adecuado para estudiar el comportamiento del estrés oxidante en los corazones post-acondicionados.

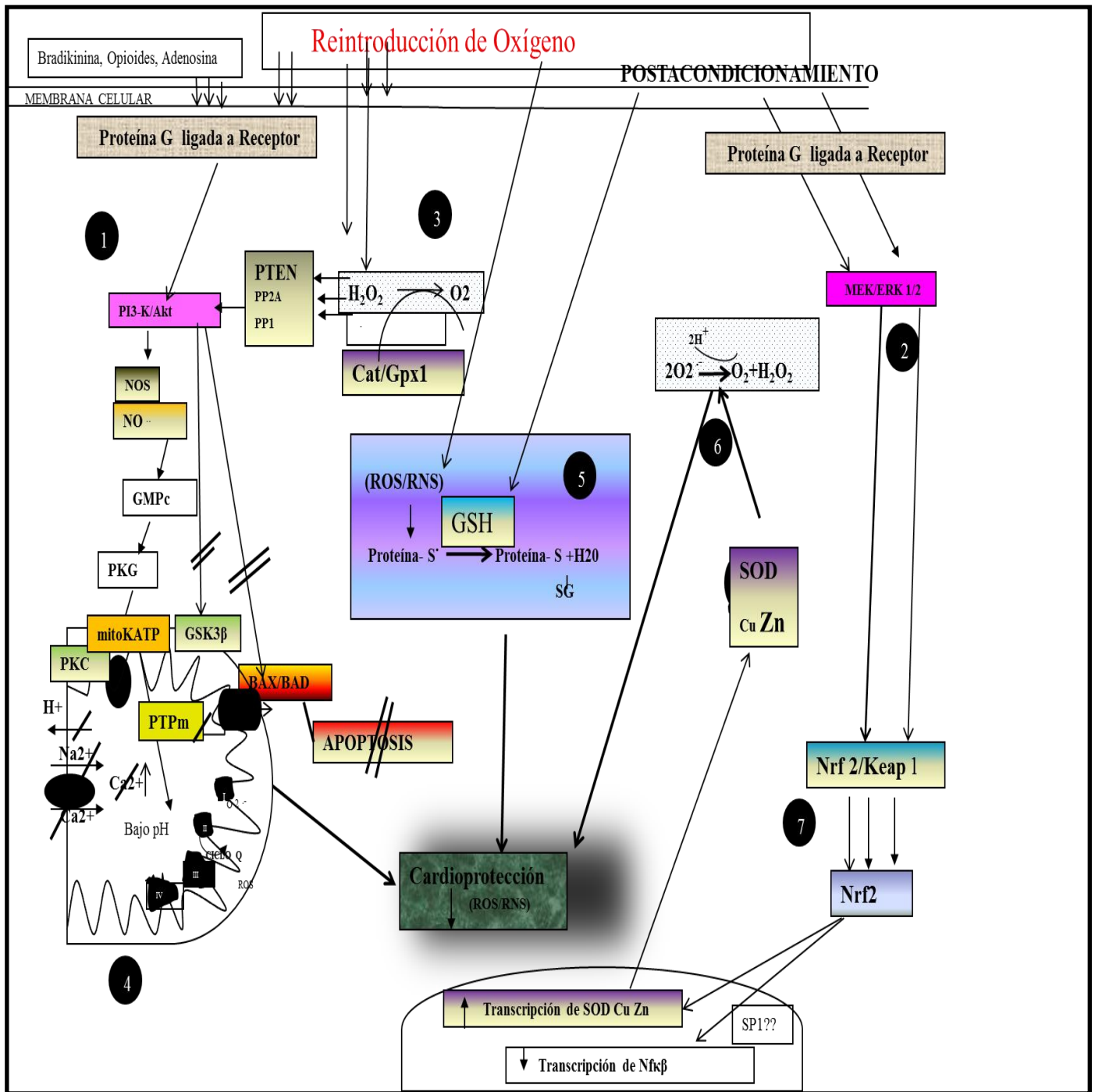


Figura 14: Diagrama de Flujo en la Cardioprotección por Postcondicionamiento

1.- Cinasas de salvamento activadas por proteínas G ligadas a receptor 2.-Activación de Nrf2 por MEK/ERK 1/2 3.- Posible papel de H_2O_2 como factor de señalización en el postcondicionamiento 4.- Inhibición de la cadena de electrones como generadora de radicales libres e impedimento de la apertura del PTPm. 5.- Menor producción de radicales libres, protección de las reservas de GSH (creados en la isquemia) y atenuación de la oxidación en proteínas por éste último en el corazón postcondicionado 6.- Cardioprotección medida por SOD Cu Zn 7.-Inhibición de la transcripción de Nfκβ y de la liberación de TNF-α por Nrf2

X CONCLUSIONES

Concluimos que en un modelo agudo de isquemia y reperfusión prolongada, el post-acondicionamiento es una maniobra que recupera la función mecánica del corazón, evitando los efectos deletéreos del estrés oxidativo. Esta condición parece estar relacionada con aumento en la actividad de la SODCu-Zn y con la acción antioxidante del GSH. En un modelo de isquemia y reperfusión con co-morbilidad el patrón se mantiene.

En algunas situaciones clínicas en el momento de la reperfusión, la maniobra mecánica del postacondicionamiento isquémico puede ser difícil de realizar. Dicho protocolo podría ser posible de aplicar en un paciente con infarto de miocardio al que se le realizará intervención coronaria percutánea (ICP), o en el momento de la cirugía cardíaca. Empero, en el caso de ICP de placas ateromatosas complejas, tipo C de la American Heart Association, con abundante carga de trombo, es muy difícil llevarlo a cabo. Por otra parte, en la cirugía de bypass coronario sería la repetición de sujeción y despinzamiento de la aorta ascendente para hacer la maniobra de postacondicionamiento, lo cual, tiene alto riesgo de desprender placas de ateroma de la pared aórtica y condicionar accidente cerebrovascular embólico-isquémico. Por lo tanto, el estudio de los mecanismos de acción de la maniobra de postacondicionamiento tiene como objetivo el diseño del “postacondicionamiento farmacológico”, que retribuirá en una disminución del índice de mortalidad relacionada al daño por reperfusión.

XI PERSPECTIVAS

La presente información ha servido a nuestro grupo de trabajo, para iniciar en investigaciones paralelas la búsqueda de los mecanismos de transcripción específicos por los cuales se activaría la maquinaria antioxidante como respuesta a la mecano-transducción derivada del Post-acondicionamiento miocárdico. La posibilidad de inducir farmacológicamente el Postacondicionamiento sería de primordial importancia. De hecho, en la literatura, varios estudios experimentales se han centrado en los efectos de fármacos cardioprotectores administrados en el inicio de la reperfusión. Algunos de estos medicamentos son activadores de la PKC, la adenosina, la bradicinina, la eritropoyetina, óxido nítrico y los opiáceos. Sin embargo, la estrategia de la adición de fármacos que puedan ser cardioprotectores durante la reperfusión aún no ha sido adoptada en la práctica clínica. Estos fármacos idealmente no deberán interferir con las primeras condiciones redox (señalización de ERO) provocado por las maniobras de cardioprotección.

XII REFERENCIAS

Agullo L, Garcia-Dorado D, Escalona N, 2002. Hypoxia and acidosis impair cGMP synthesis in microvascular coronary endothelial cells. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology* **283**: H917-925.

Ambrosio G, Zweier J, and Flaherty J. 1991. The relationship between oxygen radical generation and impairment of myocardial energy metabolism following post-ischemic reperfusion. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* **23**: 1359-1374.

Andrukhiv A, Costa A, Garlidge K. 2006. From complex I of the electron transport chain opening mitoKATP increases superoxide generation. *American Journal of Physiology* **291**: H2067-H2074.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Muntean D, Chalabreysse L, Loufouat J, Robert D. 2005. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *Journal of Molecular and Cell Cardiology* **38**: 367–374.

Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O. 2005. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* **111**: 194–197.

Baudry N, Laemmel E. and Vicautin E. 2008. Effects of oxygen species production induced by ischemia in muscle of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *American Journal of Physiology Circulation Physiology* **294**: H821-H828.

Becker L. B. 2004. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research*. **61**: 461–470.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, Heusch G, Schulz R. 2008. The myocardial JAK/STAT pathway: from protection to failure. *Pharmacology Therapy* **120**: 172-185.

Boengler K, Heusch G, Schulz R. 2011. Nuclear encoded mitochondrial proteins and their role in cardioprotection. *Biochimica et Biophysica Acta* **183**: 1286-1294.

Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Heusch G, Schulz R. 2010. Inhibition of permeability transition pore opening by mitochondrial STAT3 and its role in myocardial ischemia/reperfusion. *Basic Research of Cardiology* **105**: 771-785.

Bopassa J, Ferrera R, Roesch O. 2006. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovascular Research*; **69**: 178-185.

Brigelius R. 1999 Tissue-specific functions of individual glutathione peroxidases. *Free Radical and Biology Medicine* **27**: 951–965.

Brookes P, Yoon Y, Robotham J. 2004. Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* **287**: C817-C833.

Caramaelo C, Peña D, Castilla A. 2006. Respuesta a la Hipoxia. Un mecanismo Sistemico basado en el control de la Expresión Génica. *Medicina* **66**: 155-164

Carden D, Granger D. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. 2000. *Journal of Pathology* **190**: 255–266.

Carlberg I, Mannervik B. 1975. Purification and characterization of the flavoenzyme glutathione reductase from rat liver. *Journal of Biological and Chemical* **250**: 5475-5480.

Carlsson M, Ubachs JFA, Hedstrom E, Heiberg E, Jovinge S, Arheden H. 2009. Myocardium at Risk after Acute Infarction in Humans on Cardiac Magnetic Resonance: Quantitative Assessment during Follow-up and Validation with Single Photon Emission Computed Tomography. *Journal of American College of Cardiology-Imagenology* **2**: 569-576.

Chandrasekar B, Colston J, Freeman G. 1997. Induction of proinflammatory cytokine and antioxidant enzyme gene expression following brief myocardial ischaemia, *Clinical and Experimental Immunology* **108**: 346–351.

-
- Chávez E, Briones R, Michel B, Bravo C, Gay D. 1985. Evidence for the involvement of dithiol groups in mitochondrial calcium transport: studies with cadmium. *Archives of Biochemical and Biophysical* **242**: 293-297.
- Chen Q, Moghaddas S, Hoppler C, Lesnefsky E. 2007. Isolated rat heart mitochondria increase the production of reactive oxygen species from ischemic defects in the electron transport chain. *American Journal of Physiology- Cell Physiology* **294**: C460-C466.
- Chen Z, Oberley TD, Ho Y, ChuaCC, Siu B, Hamdy RC, Epstein CJ, ChuaBH. 2000. Overexpression of CuZnSOD in coronary vascular cells attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radical Biology and Medicine* **29**:589-596.
- Ching-Nen C, Shu-Mei P. 1996. Assay of superoxide dismutase activity by combining electrophoresis and densitometry *Botanical Bulletin of Academia Sinica* **37**: 107-111.
- Cohen M, Yang M, Downy J. 2008. Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning success. *Basic Research of Cardiology* **103**: 464-471.
- Correa F, Soto V, Zazueta C. 2007. Mitochondrial permeability transition relevante for apoptotic triggering in the post-ischemic Heart. *The Internacional Journal of Biochemistry and Cell Biology* **39**: 787-798.
- Correa F, García N, Robles C, Martínez E, Zazueta C. 2008. Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart. *Journal of Bioenergetic and Biomembranes* **40**: 599-606.
- Correa F, Zazueta C, 2009. Mecanismos moleculares involucrados en las estrategias mecánicas para evitar el daño por reperfusión en el miocardio isquémica. *Bioquímica* **7**: 137-149.
- Costa A, Keith G, 2008. Intramitochondrial signaling: interactions among mitoKATP, PKCe, ROS and MPT. *American Journal of Physiology Heart-Circulation Physiology* **295**: H874-H882.

Danielisova V, Miroslav G, Némethová M. 2007. Effects of Bradykinin Postconditioning on Endogenous Antioxidant Enzyme Activity After Transient Forebrain Ischemia in Rat. *Neurochemical Research* **34**: 1057-1064.

Delcayre C, Samuel J, Marotte F. 1988. Synthesis of stress proteins in rat cardiac myocytes 2-4 days after imposition of hemodynamic overload. *Journal of Clinical Investigation* **82**: 460–468.

Donato M, Dannunzio V, Berg G. 2006. Ischemic postconditioning reduces infarct size by activation of A1 receptors and K⁺ ATP channels in both normal and hypercholesterlemic mini swines. *Microvascular Research* **73**: 137-142.

Dreger H, Wetphal K, Weller A, Baumann G, Stangl V, Meiners S. 2009. Nrf-2 dependent upregulation of antioxidant enzymes: a novel pathway for proteasome inhibitor mediated cardioprotection. *Cardiovascular Research*. **83**: 354-361.

Flores G, Carrillo P, Elosua R, Guallar E, Marugat J, Bleys J, Covas MI. 2009. Antioxidant Enzyme Activity and Coronary Heart Disease: Meta-analyses of Observational Studies. *American Journal of Epidemiology* **170**: 135-146.

Hedström E, Engblom H, Frogner F. 2009. Infarct evolution in man studied in patients with first-time coronary occlusion in comparison to different species - implications for assessment of myocardial salvage. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance* **11**: 38.

Hochhauser E, Kaminski O, Shalom H. 2004. Role of Adenosine Receptor: Activation in Antioxidant Enzyme Regulation During Ischemia–Reperfusion in the Isolated Rat Heart; *Antioxidants and Redox Signaling* **6**: 235-244.

Esterbauer H, Zollner H, y Schaur RJ. 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Methods in Enzymology* **186**: 407-421.

Ferdinand P, Shulz R, Baxter G. 2007. Interaction of cardiovascular risk factors with myocardial ischemia/reperfusion injury, preconditioning and postconditioning. *Pharmacology Review* **59**: 418-458.

Ferencza A, Takácsa S, Horvatha S. 2010. Examination of Protective Effect of Ischemic Postconditioning after Small Bowel Autotransplantation. *Transplantation Proceedings* **42**: 2287-2289.

Férez S, Ocaranza S, Márquez M. 2001. Daño Miocárdico por Reperusión. *Archivos de Cardiología de México* **71**: S45-S50.

Fernández JC, Kaplowitz N. 1990. The use of monochlorobimane to determine hepatic GSH levels and synthesis. *Analytical Biochemistry* **190**: 212-219.

Ferrari, R, Perdarsini P, Bonzagrio M, Gaia G, Bernocchi P, Dilisa F, Visioli O. 1993 Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischemia and reperfusion. *Basic Research in Cardiology* **88**: 495-512.

Forbes RA, Steenbergen C, Murphy E. 2001. Diazoxide-induced cardioprotection requires signaling through a redox-sensitive mechanism. *Circulation Research* **88**: 802–809.

Galagudza M, Kurapeev D, Minasian S. 2004. Ischemic postconditioning: brief ischemia during reperfusion converts persistent ventricular fibrillation into regular rhythm. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* **25**: 1006–1010.

Galván-García JE. 2011. Mortalidad intrahospitalaria en choque cardiogénico. *Revista Mexicana de Cardiología* **22**: 74-82.

García G, Carvajal K. 2006. Cardioprotection against left ventricular reperfusion damage by the specific mitochondrial calcium uniporter inhibitor Ru₃₆₀. *British Journal of Pharmacology* **149**: 829–837.

García G, Guerrero A, Guerrero S. 2005. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear amine complex (Ru₃₆₀) prevents from irreversible injury in the post-ischemic heart. *Federation of European Biochemical Societies Journal* **272**: 3477-3488.

Gardner PR, Fridovich I. 1981. Controls of the biosynthesis of Mn-SOD of *E coli*. *Journal of Biological and Chemical* **262**:17591-17595.

Gateau O, Argaud L, Ovize M, 2006 Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular Research* **70**: 264-273.

Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F, Gómez L, Li B, Mewton N, Sánchez I, Pion C, Elbaz M, Ovize M. 2009. Inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening: translation to patients. *Cardiovascular Research* **83**: 226-233.

Goldberg R, Glatfelter K, Burbank-Schmidt E, Lessard D, Gore J. 2006. Trends in community mortality due to coronary heart disease. *American Heart Journal* **151**: 501-507.

Granfeldt A, Lefer D, Vinten Johansen J. 2009 Protective ischaemia in patients: preconditioning and postconditioning; *Cardiovascular Research* **83**: 234-246.

Griffiths EJ, Ocampo CJ, Savage JS. 1998. Mitochondrial calcium transporting pathways during hypoxia and reoxygenation in single rat cardiomyocytes. *Cardiovascular Research* **39**: 423-33.

Gross E, Hsy A, Gross G. 2007. GSK3b inhibition and KATP channel opening mediate acute opioid-induced cardioprotection at reperfusion. *Basic Research in Cardiology* **102**: 341-349.

Guyton R, Vinten J, Wang N. 2005. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca² overload. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology* **288**: 1900-1908.

Halestrap AP. 1999. The mitochondrial permeability transition: its molecular mechanism and role in reperfusion injury. *Biochemical Society Symposia* **66**: 181–203.

Halliwell B, Gutteridge MC. 1985.. The chemistry of oxygen radicals and other oxygen-derived species. In: *Free Radicals in Biology and Medicine* Oxford: Clarendon Press, 20–66.

Halliwell B. 1987. Oxidants and human disease: some new concepts. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **1**: 358– 364.

Halliwell B. 1991 Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *American Journal of Medicine* **91**: 3C14S– 3C22S.

Halliwell B, Gutteridge JC. 1995. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine* **18**: 125–126.

Haramaki, N, Packer, L, Assadnazari M. 1993. Cardiac recovery during post-ischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochemical Biophysical Research Communications* **196**: 1101-1107.

Hausenloy D, Yellon M. 2006. Survival kinases in ischemic preconditioning and postconditioning. *Cardiovascular Research* **70**: 240-253.

Hausenloy DJ, Griffiths EB, Yellon DM. 2012. Cardioprotection during cardiac surgery *Cardiovascular Research* **94**: 253 – 265.

Halkos M, Kerendi F, Corvera J. 2004. Myocardial Protection with Post-Conditioning is not enhanced by Ischemic Pre-conditioning. *Annals of Thoracic Surgery* **78**: 961–969.

He H, Li HL, Lin A, Gottlieb RA. 1999. Activation of the JNK pathway is important for cardiomyocyte death in response to simulated ischemia. *Cell Death Differ* **6**: 987–991.

He Y, Ning-Ping W, Faraz K. 2005. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* **288**: H1900–H1908.

Headrick JP, Peart J, Hack B. 2001. Functional properties and responses to ischemia-reperfusion in Langendorff perfused mouse heart. *Experimental Physiology* **86**: 703-716.

Heping Y, Magilnick N, Lee C, Kalmaz D. 2005. Nrf1 and Nrf2 Regulate Rat Glutamate-Cysteine Ligase Catalytic Subunit Transcription Indirectly via NFkB and AP-1. *Molecular and Cellular Biology* **25**: 5933–5946.

Herrera L, Gaspar J, González H. 2006. De la Reperusión al Postoacondicionamiento del miocardio con isquemia prolongada. ¿Nuevo paradigma terapéutico de los síndrome coronarios agudos con elevación del segmento ST? De lo básico a lo clínico. *Archivos de Cardiología de México* **76**: S76-S101.

Holtzman JL. 2007. The role of glutathione pathways in the prevention of atherosclerosis. In: *Atherosclerosis and Oxidant Stress: A New Perspective*. New York: Springer, 213–241.

Hu Y, Chen X, Ting Ting P, Neo K. 2008. Cardioprotection induced by hydrogen sulfide preconditioning involves activation of ERK and PI3K/Akt pathways. *European Journal of Physiology* **455**: 607-616.

Hwang I. 1987. Fructose-Induced insuoin resistance and hypertension in rats, *Hypertension* **10**: 512-516.

Iliodromitis E, Zoga A, Vrettou A, Andreadou I. 2006. The effectiveness of postconditioning and preconditioning on infarct size in hypercholesterolemic and normal anesthetized rabbit. *Atherosclerosis* **188**: 356-362.

Instituto Nacional de Estadística y Geografía/Secretaría de Salud. Información histórica de estadísticas vitales nacimientos y defunciones 1893-2010. http://www.dgepi.salud.gob.mx/2010/PDFS/PUBLICACIONES/LIBROS/LIBRO_HIST_ES TADIS_NAC_DEF_1893_2010.pdf

Itoh M, Shuji O, Hatao K. 2004. Effects of dietary calcium restriction and acute exercise on the antioxidant enzyme system and oxidative stress in rat diaphragm. *American Journal Physiology Regulatory Integrative Compilation Physiology* **287**: 33-48.

Jaburek M, Garlid K, Costa A, Quinlan C, Andrukhin A. 2006. The direct physiological effects of mitoKATP opening on heart mitochondria. *American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology* **290**: H406-H415.

Jiménez M. 2004. Manual de Técnicas de Biología Molecular Básica 1ª Ed. México: Editorial Prado: 10 –32.

Jin Z, Zhou J, Zing M. 2007. Postconditioning the human heart with adenosine in heart valve replacement surgery. *Annals of Thoracic Surgery* **83**: 2066-2073.

Jones S, Hoffmeyer M, Sharp B. 2003. Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology* **284**: 277-282.

Kabe Y, Ando K, Hirao S, Yoshida M, Handa H. 2005. Redox regulation of NF-kB activation: distinct redox regulation between the plasm and the nucleus. *Antioxidants and Redox Signaling* **7**: 395-403.

Kakinuma Y, Miyauchi T, Yuki K. 2001. Novel molecular mechanism of increased myocardial endothelin-1 expression in the failing heart involving the transcriptional factor hypoxia-inducible factor-1 alpha induced for impaired myocardial energy metabolism. *Circulation* **103**: 2387-2394.

Kamencic H, Lyon A, Paterson P, Juurling B. 2000. Monochlorobimane fluorometric method to measure tissue glutathione. *Analytical Biochemistry* **86**: 35-37.

Kim, YJ, Park KH. Rho HM. 1996. Transcriptional activation of the Cu, Zn-superoxide dismutases in cultured ATII cells and lung fibroblasts. *American Journal of Physiology* **271**: 24539-24543.

Kin H, Wang N, Mykytenko J. 2008. Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor- κ B translocation and TNF α release. *Shock* **29**: 761-768.

Kin H, Zatta AJ, Lofye MT. 2005. Postconditioning reduces infarct size via adenosine receptor activation by endogenous adenosine. *Cardiovascular Research* **67**:124-133.

Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF, Chan PH. 1991. Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proceedings of National Academy of Sciences* **88**: 11158-11166.

Kukreja MC, Kontos KE, Loesser SK. 1994. Heat shock protein 70 mRNA in isolated perfused rat heart. *American Journal of Physiology - Heart and Circulation Physiology* **267**: H2213-H2219.

Laskey WK. 2005. Brief repetitive balloon occlusions enhance reperfusion during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: a pilot study. *Catheterization and Cardiovascular Interventions* **65**:361-367.

Lauzier B, Delemasure S, Debin R, Collin B, Sicard P, Acar N, Bretillon L, Joffre C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Vergely C, Rochette L. 2008. Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model. *Transplantation* **85**:1802-1808.

Lecour S. 2009. Multiple protective pathways against reperfusion injury: a SAFE path without action?. *Journal of Molecular Cell Cardiology* **46**: 607-609.

Lesnefsky E, Chen Q, Camara D. 2007. Ischemia and reperfusion mitochondria and decreases myocardial injury during modulation of electron transport protects cardiac. *American Journal of Physiology. Cell Physiology* **292**: C137-C147.

Lim SY, Davidson SM, Hausenly DJ, Yellon DM. 2007. Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research* **75**: 530-535.

Lindquist S, Craig EA. 1988. The heat shock proteins. *Annual Review of Genetics* **22**: 631-637.

Liou W, Chang LY, Geuze HJ. 1993. Distribution of CuZn superoxide dismutase in rat liver. *Free Radical Biology and Medicine* **14**: 201–217.

Lonborg J, Kelbaeck H, Vejstrup N. 2010. Cardioprotective Effects of Ischemic Postconditioning in Patients treated with Percutaneous Coronary Intervention Evaluated by Magnetic Resonance. *Circulation - Cardiovascular Interventions* **3**: 34-41.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall LJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological and Chemical* **193**: 265-275.

Luna P, Pastelín G, Torres J, Martínez M. 2010. Postconditioning to protect the human heart. *Revista Mexicana de Anestesiología*. **33**: 187-199.

Luo W, Li B, Chen R. 2008. Effect of ischemic postconditioning in adult valve replacement. *European Journal of Cardiothoracic Surgery* **33** (2008) 203-208.

Luque J, Herraes A. 2005. Biología Molecular e Ingeniería Genética, Conceptos, Técnicas y Aplicaciones en Ciencias de la Salud, Editorial Harcourt. 150-163.

Manouri B, Montiel V, Balligand JL. 2012. Nitric oxide synthase in postischemic remodeling: new pathways and mechanisms. *Cardiovascular Research* **94**: 304-315

Marín J, Goldenthal M. 2002. La mitocondria y el corazón. 2002. *Revista Española de Cardiología* **55**: 1293-1310.

Merin RG. 1988. The isolated heart preparation. *British Journal of Anaesthesia* **60**: 28S-34S.

Mewton N, Ivanov F, Cour M. 2010. Postconditioning: from experimental proof to clinical concept. *Disease Models and Mechanisms* **3**; 39-44.

Morel O, Perret T, Delarche N, Labeque JN, Jouve B, Elbaz M, Piot C, Ovize M. 2012. Pharmacological approaches to reperfusion therapy. *Cardiovascular Research* **94**: 246-252.

Minc E, De Coppet P, Masson P, Thiery L, Dutertre S, Amor M, Jaulin C. 1999. The human copper-zinc superoxide dismutase gene (SOD1) proximal promoter is regulated by Sp1, Egr-1 and WT1 via non canonical binding sites. *Journal of Biological and Chemical* **274**: 503-509.

Miura T, Tanno M, Sato T. 2010. Mitochondrial kinase signaling pathways in myocardial protection from ischemia/reperfusion-induced necrosis, *Cardiovascular Research* **88**: 7-15.

Moretti T, Koons B, Budowle B. 1998. Enhancement of PCR amplification yield and specificity using AmpliTaq Gold DNA polymerase. *Biotechniques* **25**: 716-722.

Murry, C., Jennings, R., Reimer, K. 1986. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* **74**:1124-1136.

Nauta R, Tsimoyiannis E, Uribe M. 1991 The role of calcium ions and calcium channel entry blockers in experimental ischemia-reperfusion. *Annals of Surgery* **213**: 137-142.

Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, Crea F. 2009. Myocardial No-Reflow in Humans *Journal of American College Cardiology* **54**: 281-292.

Odile O, Ovize M, 2006. Mitochondrial permeability transition pore and postconditioning. *Cardiovascular Research* **70**: 264-273.

Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD. 1986. Studies of controlled reperfusion after ischemia: XIV. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* **92**: 613–620.

Otani H, Tanaka H, Inoue T, Umemoto M, Omoto K, Tanaka K, Sato T, Osako T, Masuda A, Nonoyama A. 1984. In Vitro study on contribution of oxidative metabolism of isolated

rabbit heart mitochondria to myocardial reperfusion injury. *Circulation Research* **55**: 168-175.

Ovize M, Baxter G, Di Lisa F, Ferdinandy P, García D. 2010. Postconditioning and protection from reperfusion injury: where do we stand?. Position Paper from the Working Group of Cellular Biology of the Heart of the European Society of Cardiology. *Cardiovascular Research* **87**: 406-423.

Paillard M, Gómez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnefsky EJ, Ovize M. 2009. Ve phosphorylation and membrane potential. Postconditioning inhibits mPTP opening independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **46**: 902-909.

Pasceri V, Pristipino C, Pelliccia F. 2005. Effects of the nitric oxide donor nitroprusside on no-reflow phenomenon during coronary interventions for acute myocardial infarction. *American Journal of Cardiology* **95**: 1358–1361.

Pendergrass K, Varghese S, Rafferty KM, Brown M, Taylor WR, Davies M. 2011. Temporal Effects of Catalase Overexpression on Healing Following Myocardial Infarction, *Circulation-Heart Failure* **4**: 98-106.

Penna C, Mancarde D, Rastaldo R, Pagliaro P. 2009a. Cardioprotection: A radical view. Free radicals in pre and postconditioning; *Biochimica et Biophysica Acta* **1787**: 781-793.

Penna C, Perrelli M, Raimondo S, Tullio F, Merlino A, Moro F, Geuna S, Mancardi D, Pagliaro P. 2009b. Postconditioning induces an anti-apoptotic effect and preserves mitochondrial integrity in isolated rat hearts. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1787**: 794-801.

Penna C, Perrelli MG, Tullio F, Moro F, Parisella ML, Merlino A, Pagliaro P. 2011. Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant

enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation. *Pflugers Archiv* **462**: 219-233.

Pérez I, Roque P, El Hafidi M, Diaz E, Baños G. 2009. Association of renal damage and oxidative stress in a rat model of metabolic syndrome. Influence of gender, *Free Radical Research* **43**: 761-771.

Pérez I, El-Haffidi M, Infante O. 2008. Effects of sex hormone levels on aortic vascular reactivity and variables associated with metabolic syndrome in sucrose-fed female rats. *Journal of Physiology and Pharmacology* **86**: 25-35.

Poyton R, Ball K, Castello P. 2009. Mitochondrial generation of free radicals and hypoxic signaling. *Trends in Endocrinology and Metabolism* **20**: 332-340.

Pravdic D. 2010. Isoflurane protects cardiomyocytes and mitochondria by immediate and cytosol-independent action at reperfusion. *British Journal of Pharmacology* **160**: 220-232.

Predmore B, Lefer D. 2011. Hydrogen sulfide-mediated myocardial pre and postconditioning. *Expert Review of Clinical Pharmacology* **4**: 83-96.

Raedschelders K, Ansley D, Chen D. 2012. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion. *Pharmacology and Therapeutics* **133**: 230-255.

Rajagopalan S, Kurz S, Münzel T, Tarpey M, Freeman BA, Griending KK, Harrison DG. 1996, *Journal of Clinical Investigation* **97**: 1916-1923.

Ramachandran A, Moellering D, Go YM, Shiva S, Levonen AL, Jo H, Patel RP, Parthasarathy S, and Darley-Usmar VM. 2002. Activation of c-Jun N-terminal kinase and apoptosis in endothelial cells mediated by endogenous generation of hydrogen peroxide. *Journal of Biological and Chemical* **383**: 693–701.

Rasola A, Bernardi P. 2007. The mitochondrial permeability transition pore and its involvement in cell death disease pathogenesis. *Apoptosis* **12**: 815-833.

Reaven G, Ho H, Sugar-Induced Hypertension in Sprague-Dawley Rats. 1991 *American Journal of Hypertension* **4**: 610-614.

Reffelmann T, Kloner R. 2002. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* **283**: H1099-H1107.

Riascos D, Baltaxe E, Pascual G. 2004. La Preparación de Langendorff: Corazón de Mamífero perfundido. *Universitas Médica* **45** :111-118.

Rojo A, Salinas M, Martin D, Perona R, Cuadrado A. 2004. Regulation of Cu/Zn-superoxide dismutase expression via the phosphatidylinositol 3 kinase/Akt pathway and NfκB *Journal of Neuroscience* **24**: 9324-9334.

Rothstein EC, Byron KL, Reed RE. 2002. H₂O₂-induced Ca²⁺ overload in NRVM involves ERK1/2 MAP kinases: role for an NHE-1-dependent pathway. *American Journal of Physiology – Heart and Circulatory Physiology* **283**: H598–H605.

Sasaki H, Galang N, Maulik N. 1999. Redox regulation of NfκB and AP-1 in ischemic reperfused heart. *Antioxidant and Redox Signaling*. **1**: 317-324.

Schultz A, Lavie L, Hochberg I. 1999. Interindividual heterogeneity in the hypoxic regulation of VEGF:significance for the development of the coronary artery collateral circulation. *Circulation* **100**: 547-552.

Şengül I, Sengül D. 2010. Ischemic preconditioning and postconditioning in cardiovascular surgery. *Cumhuriyet Medical Journal* **32**: 365-373.

Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, Altomare E, Fiore T, Vendemiale G. 2005. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing. *Federation of American Societies of Experimental Biology Journal* **19**: 354-361.

Shah Z, Rung L, Thimmulappa R, Kensler T. 2007. Role of Reactive Oxygen Species in Modulation of Nrf2 following Ischemic Reperfusion Injury. *Neuroscience* **147**: 53-59.

Shah Z, Zahoor A, Rung-chi L, Rajesh K, Thimmulapp G. 2007. Role of Reactive Oxygen Species in Modulation of Nrf2 following Ischemic Reperfusion Injury. *Neuroscience* **147**: 53–59.

Sheng K, Yuejin Y. 2007. Coronary microvascular reperfusion injury and no reflow in acute myocardial infarction. *Clinical and Investigative Medicine* **30**: E133-E145.

Staat P, Rioufol G, Piot C. 2005. Postconditioning the human heart. *Circulation* **112**: 2143–2148.

Stone D, Darley VM, Martin JF. 1992. Calcium fluxes and reperfusion damage: the role of mitochondria. In: *Myocardial Response to Acute Injury*. edited by Parratt JR. Basingstoke, UK: Macmillan. 111-117.

Suh J, Swapna V, Dixon B, Liu H, Jaiswal A, Min R, Hagen T. 2004. Decline in transcriptional activity of Nrf2 causes age-related loss of glutathione synthesis, which is reversible with lipoic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**: 3381–3386.

Sutherland FJ, Hearse DJ. 2000. The isolated blood and perfusion fluid perfused heart. *Pharmacology Research* **41**: 613-627.

Szczepanek K, Chen Q, Derecka M, Salloum FN, Zhang Q, Szelag M. 2011. Mitochondrial targeted signal transducer and activator of transcription 3 (STAT 3) protects against ischemia-induced changes in the electron transport chain and the

generation of reactive oxygen species. *The Journal of Biological Chemistry* **286**: 29610-29620.

Tanaka H, Nishimaru K, Aikawa T, Hirayama K. 2002. Effect of SEA0400, a novel inhibitor of sodium-calcium exchanger on myocardial ionic currents. *British Journal of Pharmacology* **135**: 1096-1100.

Tanno M, Kuno A, Yano T, Miura R, Hisahara S, Ishikawa S, Shimamoto K, Horio Y. 2010. Induction of Manganese Superoxide Dismutase by Nuclear Translocation and Activation of SIRT1 Promotes Cell Survival in Chronic Heart Failure. *The Journal of Biological Chemistry* **285**: 8375-8382.

Tapia E, Dolores J, Sánchez D. 2008. Treatment with pyrrolidine dithiocarbamate improves proteinuria, oxidative stress, and glomerular hypertension in overload proteinuria *American Journal of Renal Physiology* **295**: F1431–F1439.

Temashm M, Nethicadan T, Chapman D. 1999. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic reperfused rat heart. *The American Physiological Society* **277**: H584 H594.

Terashima Y, Sato T, Yano Y, Maas O, Itoh T, Miki T. 2010. Roles of phospho-GSK-3 β in myocardial protection afforded by activation of the mitochondrial K_{ATP} channel. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* **49**: 762-770.

Thibault H, Piot C, Staat P. Staat P, Bontemps L, Sportouch C, Rioufol G, Cung T, Bonnefoy E, Angoulvant D, Aupetit F, Finet G, André X, Macia J, Raczka F, Rossi R, Kirkorian G, Derumeaux G, Ovize M. 2008. Long-Term Benefit of Postconditioning. *Circulation* **117**:1037-1044.

Townsend DM, Tew KD, Tapiero H. 2003. The importance of glutathione in human disease. *Biomedicine and Pharmacotherapy* **57**: 145-155

Tsutsumi Y, Yokoyama T, Horikawa Y, Roth D, Patel H. 2007. Reactive oxygen species trigger ischemic and pharmacological postconditioning: In vivo and in vitro characterization. *Life Sciences* **81**: 1223-1227.

Valko M, Leibfritz D, Moncol J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry and Cellular Biology* **39**: 44–84.

Vinten J. 2004. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovascular Research* **61**: 481-497.

Vinten J. 2007. Postconditioning: a mechanical maneuver that triggers biological and molecular cardioprotective responses to reperfusion. *Heart Failure Reviews* **12**: 235-244.

Wang QD, Swardh A, Sjoquist PO. 2001. Relationship between ischemic time and ischaemia/reperfusion injury in isolated Langendorff-perfused mouse hearts. *Acta Physiologica Scandinavica* **171**: 123-128.

Warner HR. 1994. Superoxide dismutase, aging and degenerative diseases. *Free Radical Biology and Medicine* **7** :249-258.

Xiaorong H, Hong J, Fenna M. 2008. Similarities between ischemic preconditioning and postconditioning in myocardial ischemia/reperfusion injury. *International Journal of Cardiology* **12**: 119.

Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV. 2004. Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *Journal of American College of Cardiology* **44**: 1103-1110.

Yasuo M, Tsutsumi A, Kazuaki M, Yutaka N, Katsuya T, Shuzo O. 2011. Compound K, a metabolite of ginsenosides, induces cardiac protection mediated nitric oxide via Akt/PI3K pathway. *Life Sciences* **88**: 725-729.

Yellon D, Hausenloy D. 2007. Myocardial reperfusion injury. *New England Journal of Medicine* **357**: 1121-1135.

Yellon 2005. Realizing the clinical potential of ischemic preconditioning and postconditioning Review. *Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine* **2**: 568-575.

Yong Q, Hu L, Wang S, Huang D, Song J. 2010. Hydrogen sulfide interacts with nitric oxide in the heart: possible involvement of nitroxylo. *Cardiovascular Research* **88**: 482-491.

Yoon S, McMillin J, Michael L. 1985. Protection of canine cardiac mitochondrial function by verapamil-cardioplegia during ischemic arrest. *Circulation Research* **56**: 704-748.

Ytehus K. 2000. The ischemic heart-experimental models. *Pharmacology Research* **41**: 193-203.

Yue TL, Wang C, Gu JL. 2000. Inhibition of extracellular signal-regulated kinase enhances ischemia/reoxygenation-induced apoptosis in cultured cardiac myocytes and exaggerates reperfusion injury in isolated perfused heart. *Circulation Research* **86**: 692–699.

Zahoor A, Rung-chi L, Rajesh K, Thomas W, Kensler W, Masayuki Y, Shyam B, Sylvain D. 2007. Role of Reactive Oxygen Species in Modulation of Nrf2 following Ischemic Reperfusion Injury, *Neuroscience* **147**:53-59.

Zelko I, Mariani T, Folz R. 2002. Superoxide Dismutase Multigene Family: A Comparison of the CuZn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2), and EC-SOD (SOD 3) Gene Structures, Evolution, and Expression. *Free Radical Biology and Medicine* **33**: 337-349.

Zhao Z, Corvera J, Halkos M. 2003. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *American Journal of Physiology* **285**: H579-H588.

Zhongua X, Xue G, Bing Z. 2008. Effectos of ischemia postconditioning on ischemia-reperfusion injury and reperfusion injury salvage kinase signal transduction pathways in isolated mouse hearts. *Journal of European of Pharmacology* **36**: 161-166.

Zhou X, Zhai X, Ashraf M. 1996. Direct evidence that initial oxidative stress triggered by preconditioning contributes to second window of protection by endogenous antioxidant enzyme in myocytes. *Circulation* **93**: 1177-1184.

Zhu C, Huang Y, Oberley L. 1998. A family of AP-2 proteins down-regulate manganese superoxide dismutase gene. *DNA Cell Biology* **17**: 921-930.

Zhu H, Itoh K, Yamamoto M, Zweier JL, Li Y. 2005. Role of Nrf2 signaling in regulation of antioxidants and phase 2 enzymes in cardiac fibroblasts: protection against reactive oxygen and nitrogen species-induced cell injury. *Federation of European Biological Societies Journal* **579**: 3029-3036.

Zimmer HG. 1998. The isolated perfused heart and its pioneers. *News in Physiological Sciences* **13**: 203-210.

Zorov D, Juhaszova M, Yaniv Y. 2009. Regulation and pharmacology of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovascular Research* **83**: 213-225.

Zorov DB, Filburn CR, Klotz LO, Zweier JL, Sollott SJ. 2000. Reactive oxygen species (ROS)-induced ROS release: a new phenomenon accompanying induction of the mitochondrial permeability transition in cardiac myocytes *Journal of Experimental Medicine* **192**: 1001–1014.

Zweier J, Hassan T. 2006. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. A Review. *Cardiovascular Research* **70**: 181-190.

Research Paper

Attenuation of oxidant damage in the postconditioned heart involves non-enzymatic response and partial catalytic protection

Francisco Arreguín¹, Noemi García^{1,2}, Sauri Hernández-Reséndiz¹, Mabel Buelna-Chontal¹, Francisco Correa¹, Viridiana Olín-Sandoval¹, Omar Noel Medina-Campos³, José Pedraza-Chaverrí³ and Cecilia Zazueta¹

¹Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, 14080 México, Distrito Federal

²Cátedra de Cardiología y Medicina Vascular, División Ciencias de la Salud, Escuela de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Campus Monterrey, Avenida Morones Prieto No. 3000 Poniente Colonia Los Doctores, 64710 Monterrey, Nuevo León, Mexico

³Departamento de Biología, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México, Distrito Federal

Oxidant stress, among other effectors, is implicated in the sequel of myocardial reperfusion injury. It is generally accepted that maintaining the balance between oxidant and antioxidant signalling within the cell provides protection against reperfusion damage. The cardioprotective strategy of postconditioning (PC) reduces reperfusion injury through complex mechanisms; however, the contribution of the antioxidant system has not been fully investigated. In this study, isolated rat hearts were subjected to PC after 30 min global ischaemia, and then to 5 min (IR5) or 60 min of reperfusion (IR60). Postconditioning significantly increased the left ventricular developed pressure and the double product (heart rate \times left ventricular developed pressure) for both early (PC5) and prolonged reperfusion (PC60, PC before 60 min of reperfusion). Necrotic tissue diminished to 10.8% in PC60 hearts, compared with 49% of infarct size measured in IR60 hearts ($P < 0.05$ versus IR60). Also, protein carbonylation and malondialdehyde levels decreased and were correlated with a significant augmentation in CuZn superoxide dismutase activity ($P < 0.05$, PC60 versus IR60) and increased glutathione redox state (GSH:GSSG ratio; $P < 0.05$, PC60 versus IR60). Diethylthiocarbamate, a non-selective superoxide dismutase inhibitor, significantly diminished the protection afforded by PC when administered throughout the protocol. However, administration of this inhibitor only during reperfusion had no effect on PC-induced cardioprotection. These results indicate that non-enzymatic antioxidants account for the protective effect of PC, modifying the oxidant stress caused by ischaemic reperfusion in rats. The contribution of CuZn superoxide dismutase activity in the observed cardioprotective effect is less clear, and could be relevant if acting in concert with other PC-activated mechanisms.

(Received 5 March 2012; accepted after revision 2 May 2012; first published online 4 May 2012)

Corresponding author C. Zazueta: Instituto Nacional de Cardiología, Ignacio Chávez, Departamento de Bioquímica, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, México 14080, Distrito Federal Email: azazueta@yahoo.com

Oxidative stress is one of the most important mechanisms that contribute to myocardial damage during ischaemia and reperfusion (Ferrari *et al.* 1991). The main sources of reactive oxygen species (ROS) are xanthine–xanthine oxidase (Chambers *et al.* 1985), NADPH oxidase (Misra *et al.* 2009), complex I and III of the mitochondrial electron transport chain (Chen *et al.* 2003) and

nitric oxide synthase (NOS). Physiologically, ROS are maintained at normal levels by enzymatic antioxidants, including superoxide dismutase (SOD), which transforms superoxide anion ($O_2^{\bullet-}$) to H_2O_2 , catalase and glutathione peroxidases (GPx), which reduce H_2O_2 to H_2O , and glutathione reductase (GR), which converts the oxidized form of glutathione (GSSG) back to its reduced form

(GSH). Reduced glutathione is the most abundant non-enzymatic antioxidant present in the tissues (Meister, 1984; Pompella *et al.* 2003); it removes H_2O_2 , $\text{O}_2^{\bullet-}$ and alkoxy radicals (Baudry *et al.* 2008), maintains membrane protein thiols and acts as a substrate for GPx and glutathione S-transferase (Townsend *et al.* 2003). Other thiol–disulfide oxidoreductase systems, such as the cytosolic protein thioredoxin-1, along with thioredoxin reductase (TrxR), reduce intramolecular or intermolecular protein disulfides. The current picture is that cells should be protected against ischaemia–reperfusion injury if detrimental ROS are neutralized. Paradoxically, antioxidant treatments against ROS-induced myocardial damage have shown contradictory effects in different experimental settings and in translational approaches (Sochman *et al.* 1996; Dhalla *et al.* 2000; Besse *et al.* 2006; Venardos *et al.* 2007; Correa *et al.* 2010).

In this sense, postconditioning (PC) has emerged as a powerful strategy to contend against reperfusion injury in *ex vivo* and *in vivo* animal models (Zhao *et al.* 2003; Kin *et al.* 2004; Hausenloy & Yellon, 2008; Correa *et al.* 2008a), as well as in some clinical studies (Sorensen *et al.* 2010). Postconditioning consists of the application of brief periods of ischaemia–reperfusion, immediately before prolonged reperfusion, and results in infarct size reduction. Several mechanisms have been related to the cardioprotection, i.e. participation of protein kinase C (Philipp *et al.* 2006), mitochondrial ATP-sensitive K^+ (mito K_{ATP}) channels opening (Yang *et al.* 2004), the inhibition of the mitochondrial transition pore (Argaud *et al.* 2005) and glycolytic activation during early reperfusion (Correa *et al.* 2008a). Surprisingly, little is known about the activity of antioxidant enzymes and redox balance during postconditioning. In this respect, a recent report demonstrated that the activity of SOD is downregulated by early acidosis in cardiac ischaemic postconditioning (Penna *et al.* 2011), whereas H_2O_2 diminution and prevention of GSH oxidation has been associated with hypoxic postconditioning (Serviddio *et al.* 2005). In the present study, we sought to establish a correlation between early and long-lasting cardioprotection afforded by PC and changes of the antioxidant machinery.

Methods

Ethical approval

This investigation was performed in accordance with the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* published by the US National Institutes of Health (NIH publication no. 85-23, revised 1996) and approved by the Ethical committee of the National Institute of Cardiology Ignacio Chávez.

Reagents

Anti-CuZnSOD (Ab13498), anti-MnSOD (Ab8867), anti-GPx (Ab16798), anti-catalase (Ab52477) and anti-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH; Ab9485) polyclonal antibodies were purchased from Abcam (San Francisco, CA, USA). Secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase were from Santa Cruz Biotechnology, Inc. (Santa Cruz, CA, USA). OxyBlot™ protein oxidation detection kit was from Millipore Chemicon® (Billerica, MA, USA) and RNeasy minikit from Qiagen Sciences (Valencia, CA, USA). The TrxR Assay Kit was from Cayman Chemicals (Ann Arbor, MI, USA).

Isolated heart preparations

Sixty male Wistar rats (400–450 g) were anaesthetized with sodium pentobarbital (60 mg kg^{-1} i.p.), and complete lack of pain response was assessed by determining pedal withdrawal reflex. Then, sodium heparin was injected (1000 U kg^{-1}), and 5 min later a midsternal thoracotomy was performed. The heart was rapidly excised and placed in ice-cold Krebs–Henseleit buffer solution (pH 7.4) containing (mM): 118 NaCl, 4.75 KCl, 1.18 KH_2PO_4 , 1.18 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 CaCl_2 , 25 NaHCO_3 , 5 glucose and 0.1 sodium octanoate, and mounted onto a Langendorff heart perfusion system. Hearts (average weight 1 g) were perfused retrogradely, via the aorta, at a constant rate flow of 12 ml min^{-1} with Krebs–Henseleit solution, which was continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C. Cardiac performance was measured at a left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP) of 10 mmHg using a latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer (de Jesús García-Rivas *et al.* 2005).

Throughout the experiment, left ventricular pressure was continuously recorded using a computer data acquisition system designed by the Instrumentation and Technical Development Department of the National Institute of Cardiology (México, Distrito Federal, México). Heart rate (HR) was counted from the left ventricular pressure waveform. Cardiac contractile function was calculated by subtracting LVEDP from left ventricular peak systolic pressure, yielding left ventricular developed pressure (LVDP). The double product was calculated by multiplying HR by LVDP.

We included in this study hearts of healthy rats and excluded all those in which heart rhythm disturbances (ventricular fibrillation, ventricular tachycardia and/or atrial fibrillation) were detected during equilibration of the hearts in the isolated system.

Baseline characteristics of the isolated heart model, gas analysis and pH of the perfusates were evaluated at several time points and are presented in Fig. S1.

Experimental groups

Krebs–Henseleit buffer was perfused for 30 min to allow the heart to reach a steady state. The hearts were subjected to global ischaemia for 30 min by turning off the pumping system. The postconditioning manoeuvre consisted of five cycles of ischaemia–reperfusion (30 s ischaemia and 30 s reperfusion per cycle), followed by 5 or 60 min of reperfusion. The experimental groups are illustrated schematically in Fig. 1, as follows: C, control hearts, continuously perfused for 120 min; I, hearts subjected to ischaemia for 30 min; IR5, hearts subjected to 30 min ischaemia and 5 min of reperfusion; IR60, hearts subjected to 30 min ischaemia and 60 min of reperfusion; PC5, hearts subjected to 30 min of ischaemia and to the postconditioning manoeuvre; PC60, hearts subjected to 30 min of ischaemia, to the postconditioning manoeuvre and 60 min of reperfusion; and PBN, hearts perfused with 3 mM of the antioxidant *N-tert-butyl- α -phenylnitron* (PBN) for 5 min after 30 min of ischaemia and then reperused for 55 min without the compound. Some hearts were perfused with 1 mM diethylthiocarbamate (DETC), a relatively specific inhibitor of SOD, throughout the protocol or during reperfusion only. The dose used in these experiments did not compromise control heart function at any time during the 120 min continuous perfusion.

Measurement of infarct size

Infarct areas were evaluated with triphenyl tetrazolium chloride, as previously described (Buelna-Chontal *et al.* 2011). The differentially stained areas were measured by densitometry, and necrotic tissue was expressed as a percentage of the total cardiac mass (i.e. risk area).

Protein oxidation in postconditioned hearts

In order to evaluate oxidative stress in the postconditioned hearts, we measured protein oxidation in homogenates with the OxyBlot™ protein oxidation detection kit. Briefly, heart tissue was homogenized in PBS (pH 7.0) containing 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride and 50 mM dithiothreitol to prevent further oxidation of proteins after cell lysis. Then, two aliquots of each sample (20 μ g) were transferred to Eppendorf tubes and denatured by adding a final concentration of 6% SDS. One aliquot was derivatized to 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNP) with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), while the aliquot used as the negative control was incubated with the same volume of derivatization control solution. Then, samples were neutralized and separated by SDS-PAGE, transferred to polyvinylidene difluoride membranes and incubated with rabbit anti-DNP antibodies (1:150 dilution) in PBS–Tween containing 1% bovine serum albumin. Horseradish peroxidase-conjugated secondary

antibodies (1:300 dilution) and a chemiluminiscent reagent were used for signal detection.

Determination of lipid peroxidation products in postconditioned hearts

Malondialdehyde (MDA) was measured as described by Guerrero-Beltrán *et al.* (2010). Briefly, 1 mg of cardiac tissue protein was added to a medium containing 1-methyl-2-phenylindole. The reaction was started by adding 37% HCl and incubated for 40 min at 45°C. Then the samples were centrifuged at 3000g for 5 min, and the optical density of the supernatant was measured. The method is based on the formation of a stable chromophore with a maximal intensity of absorbance at 586 nm. Results are expressed in nanomoles of MDA per milligram of protein.

Qualitative RT-PCR

Total ribonucleic acid (RNA) was isolated from cardiac tissue using an RNeasy minikit. The RNA was quantified by optical density at 260 nm. Then, 2 μ g of RNA was transcribed using the enzyme reverse transcriptase (Invitrogen kit). The resulting cDNA was amplified by PCR using the following primers: for CuZnSOD, forward primer, GCG AAG GAT CTG AGC TAA AT and reverse

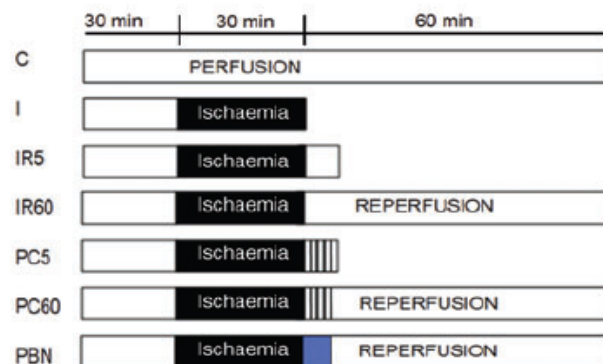


Figure 1. Scheme of the experimental groups

Abbreviations: C, control hearts continuously perfused for 120 min; I, hearts subjected to ischaemia for 30 min; IR5, hearts subjected to 30 min ischaemia and 5 min of reperfusion; IR60, hearts subjected to 30 min ischaemia and 60 min of reperfusion; PC5, hearts subjected to 30 min of ischaemia, to the postconditioning manoeuvre and to 5 min of reperfusion; PC60, hearts subjected to 30 min of ischaemia, to the postconditioning manoeuvre and to 60 min of reperfusion; and PBN, hearts perfused with 3 mM *N-tert-butyl- α -phenylnitron* (PBN) for 5 min after 30 min of ischaemia and then reperused for 55 min without the compound. The postconditioning manoeuvre consisted of five cycles of ischaemia–reperfusion (30 s ischaemia and 30 s reperfusion per cycle).

primer, GCG CCA TGT TTC TTA GAG T; for MnSOD, forward primer, GCG ACC TAC GTG AAC AAT CTG AAC G and reverse primer, TCA ATC CCC AGC AGT GGA ATA AGG C; for catalase, forward primer, TTG AGC GCC CGC CCA ACA AG and reverse primer, CAC GCG AGC ACG GTA GGG AC; for GPx1, forward primer, TGC AAT CAG TTC GGA CAT CA and reverse primer, ACC ATT CAC CTC GCA CTT C; and for GAPDH, forward primer, AAT GCA TCC TGC ACC ACC AAC TGC and reverse primer, GGA GGC CAT GTA GGC CAT GAG GTC. The PCR conditions were as follows: initial denaturation at 72°C, alignment at 60°C and elongation at 72°C (35 cycles). The PCR products were separated on 2% agarose gels and compared against the GAPDH PCR product.

Content of antioxidant enzymes in postconditioned hearts

At the end of the different treatments, some hearts were quickly frozen and stored in liquid nitrogen. Cardiac homogenates were obtained and protein content was determined according to Lowry *et al.* (1951). Proteins (25 µg) were resolved in 12.5% SDS-PAGE reducing gels and electroblotted into a nylon membrane. Immunodetection was performed using specific primary antibodies against CuZnSOD (0.2 µg ml⁻¹); MnSOD (0.2 µg ml⁻¹); catalase (1:1000 dilution) and GPx (1:2000 dilution). Secondary antibodies conjugated with alkaline phosphatase (1:25,000 dilution) were used and detected by using chemiluminiscent substrate for alkaline phosphatase (Millipore). Control loading was determined by incubating the membranes against GAPDH polyclonal antibodies (1:2500 dilution).

Activity of antioxidant enzymes in postconditioned hearts

Heart tissue homogenates were used to measure enzymatic activities. Catalase activity was assayed by a method based on the disappearance of 30 mM H₂O₂ at 240 nm (Barrera *et al.* 2003). The data were expressed as *k* per milligram of protein, where *k* (first-order reaction) can be used as a direct measure of the catalase concentration as described by Aebi (1984). Glutathione reductase activity was assayed using oxidized glutathione as substrate and measuring the disappearance of β-NADPH at 340 nm (Barrera *et al.* 2003). One unit of GR was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol of NADPH per minute. Data were expressed as units per milligram of protein. Glutathione peroxidase activity was measured using GR and NADPH in a coupled reaction (Barrera *et al.* 2003). The disappearance of NADPH was monitored at 340 nm. One unit of GPx was defined as the amount of enzyme that oxidizes 1 µmol of NADPH per minute. Data were expressed as units per milligram of protein. Superoxide

dismutase activity was assayed spectrophotometrically at 560 nm by a previously reported method using nitroblue tetrazolium (NBT) as the indicator reagent (Barrera *et al.* 2003). The method is based on the oxidation of NBT to formazan by superoxide anion, which is generated by the reaction system xanthine–xanthine oxidase; in the presence of SOD, the oxidation of NBT is inhibited. The amount of protein that inhibited NBT reduction to 50% of maximum was defined as one unit of SOD activity. Results were expressed as units per milligram of protein. Thioredoxin reductase activity was evaluated with a TrxR kit. Results were expressed as units per milligram of protein.

Preparation of cytosolic and mitochondrial fractions

At the end of ischaemia–reperfusion, a group of hearts were dismantled from the Langendorff system and placed in cold buffer solution, which contained 250 mM sucrose, 10 mM Tris–HCl and 1 mM EDTA (pH 7.4). The hearts were minced and incubated for 10 min with the same buffer, plus subtilisin A (2 mg (g of tissue)⁻¹) in an ice-bath. Then the tissue was washed, suspended in the same buffer without the enzyme and homogenized. Mitochondria and cytosol fractions were obtained by differential centrifugation (Martínez-Abundis *et al.* 2009).

In-gel activity assay

The in-gel activity assay was performed as described by Tirosh *et al.* (2005). Briefly, mitochondrial or cytosol samples were dissolved in PBS containing Triton X-100 (0.5%) and centrifuged for 5 min (5000g). Supernatants (70 µg protein) were subjected to 10% PAGE. The in-gel assay for MnSOD and CuZnSOD activity was performed under non-denaturing conditions. The gel was incubated in a staining solution containing 0.01% (w/v) riboflavin, 0.02% (w/v) EDTA and 50 mM Tris buffer (pH 7.6) for 10 min. The gel was then incubated in a solution containing 0.025% (w/v) NBT and 0.02% EDTA in 50 mM Tris buffer (pH 7.6) for an additional 10 min. Next, the gel was exposed to ultraviolet light for 1 min and then dried without heating and scanned. The densitometry analysis was performed using the ImageJ (Java-based image processing, NIH, Bethesda, MD, USA) program. The MnSOD and CuZnSOD were identified as two bands of approximately 80 and 30 kDa, respectively, and compared against known amounts of SOD from bovine erythrocytes.

Glutathione content

Total glutathione was obtained by reducing GSSG to GSH in heart homogenates with 1 mM dithiothreitol for 10 min at 4°C. Parallel samples were incubated in

Table 1. Left ventricular developed pressure and heart rate of the experimental groups before ischaemia and after early and prolonged reperfusion

Group	Left ventricular developed pressure (mmHg)			Heart rate (beats min ⁻¹)		
	Before ischaemia	At 5 min of reperfusion	At 60 min of reperfusion	Before ischaemia	At 5 min of reperfusion	At 60 min of reperfusion
Control	100.1 ± 1.9	91.6 ± 1.15	101.8 ± 12	250.0 ± 45.8	261.6 ± 32.6	206.6 ± 6.5*
IR5	111.6 ± 11.6	33.3 ± 10*	–	240.3 ± 44.3	54.0 ± 27.7**	–
IR60	98.6 ± 11.6	15.7 ± 6.6*	26.0 ± 13*	224.6 ± 25.4	89.3 ± 10.5**	28.4 ± 19***
PC5	100.1 ± 1.9	90.2 ± 29.8	–	228.3 ± 49.1	232.0 ± 51.9	–
PC60	111.6 ± 11.6	91.4 ± 8	101.3 ± 15	222.0 ± 20.8	245.0 ± 29.5	199.0 ± 31.5
PBN	98.6 ± 11.6	94.5 ± 5.3	93.6 ± 6.3	213.0 ± 5.2	203.0 ± 11.54	178.0 ± 12.7*

Values represent the means ± SD of seven different experiments. * $P < 0.05$, ** $P < 0.005$, *** $P < 0.001$ versus the same variable before ischaemia. Abbreviations: IR5, hearts subjected to 30 min ischaemia and 5 min of reperfusion; IR60, hearts subjected to 30 min ischaemia and 60 min of reperfusion; PC5, hearts subjected to 30 min of ischaemia and to the postconditioning manoeuvre; PC60, hearts subjected to 30 min of ischaemia, to the postconditioning manoeuvre and 60 min of reperfusion; and PBN, hearts perfused with 3 mM of the antioxidant *N*-tert-butyl- α -phenylnitron (PBN) for 5 min after 30 min of ischaemia and then reperused for 55 min without the compound.

non-reducing conditions to evaluate GSH only. The samples were deproteinized with 3% perchloric acid and centrifuged at 21,000g for 5 min at 4°C. Reduced glutathione was separated by HPLC (Waters, Milford, MA, USA) in a reverse-phase C-18 column (Nucleosil 100 5 μ m; Alltech, Lexington, KY, USA) using an isocratic run containing a mixture of 1% acetonitrile and 99% trifluoroacetic acid solution (0.1% v/v in water) at a rate of 1 ml min⁻¹. Samples were postcolumn derivatized with 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid) and detected spectrophotometrically at 412 nm. Results are expressed in nanomoles per milligram of protein. Oxidized glutathione was determined as the difference between total glutathione and GSH.

Statistical analysis

Data were analysed using unpaired Student's *t* test and one-way ANOVA followed by Tukey's *post hoc* test, using the Origin 5.0 program from OriginLab data analysis and graphing software (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA). Values of $P < 0.05$ were considered statistically significant. Infarct size (as a percentage) was compared between groups using a two-way ANOVA for repeated measures. Statistical analysis was performed using GraphPad version 5.00, Trial (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). Statistical significance was defined at $P < 0.05$.

Results

Baseline and perfusate parameters of the Langendorff preparation

Heart rate, LVDP (Table 1), +dP/dt and -dP/dt (Fig. S1) were maintained constant in Langendorff preparations perfused for 120 min. Arterial P_{CO_2} did not change at any

time, whereas P_{O_2} and pH values increased during the first 30 min and then remain unchanged until the end of the protocol (Fig. S1).

Cardiac performance and infarct size in postconditioned hearts

The double product of hearts subjected to 30 min of ischaemia and 60 min of reperfusion decreased from the first minutes of reperfusion (from 19,216.5 ± 3236.8 mmHg beats min⁻¹ before ischaemia to 12,596 ± 2472 mmHg beats min⁻¹). At the end of reperfusion, values decreased further to 1469 ± 1383 mmHg beats min⁻¹, in remarkable contrast to the hearts subjected to the postconditioning manoeuvres, which maintained double products of 20,910 ± 2381 and 20,509 ± 1173 mmHg beats min⁻¹ after 5 and 60 min of reperfusion, respectively (Fig. 2). Figure 2 also shows that administration of the radical scavenger, PBN, reproduced the protection conferred by postconditioning (20,509 ± 1173 mmHg beats min⁻¹). There was no significant difference between the cardiac performance of control, PC60 and PBN-treated hearts after reperfusion at any time.

The infarct size in the control group was less than 1%. The ischaemic heart necrotic area (22.5 ± 13.7%) was similar to that developed at early reperfusion (IR5), while increased damage was observed in IR60 hearts (49.2 ± 16.2%). Infarct size was significantly less in postconditioned heart groups (4.6 ± 1.6% in PC5 and 10.8 ± 1.2% in PC60), as well as in the PBN-treated group (7.1 ± 6.1%; Fig. 3).

Protein oxidation and lipid peroxidation products in homogenates of postconditioned hearts

Oxidative modification of proteins by oxygen free radicals results in the introduction of carbonyl groups into

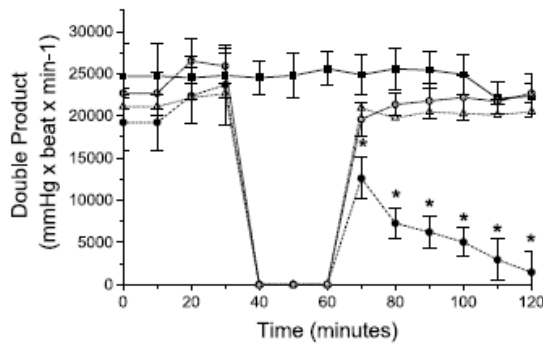


Figure 2. Effect of PBN and postconditioning (PC) on the double product (heart rate \times left ventricular developed pressure) of postischaemic hearts

After 30 min of equilibration in the Langendorff system, hearts were subjected to global ischaemia for 30 min, PC and prolonged reperfusion. Another group received 3 mM of PBN during the first 5 min of reperfusion instead of PC. Filled squares represent control hearts, filled circle ischaemic-reperfused hearts, open triangles postconditioned hearts (PC60) and open circles ischaemic-reperfused hearts + PBN. Data represent the means \pm SD of seven experiments, except for the group in which PBN was administered, where $n = 3$. * $P < 0.05$ versus control, PC60 and PBN.

protein side-chains. Carbonyl groups were derivatized to DNP-hydrazone and detected with primary antibodies specific to the DNP moiety of the proteins. Oxidative modification of proteins was initiated during ischaemia and increased dramatically in early reperfusion (IR5). With a longer reperfusion time (IR60), the response was slightly diminished, still higher than in ischaemia. Conversely, in the postconditioned hearts, carbonylation diminished after both 5 and 60 min of reperfusion; in the latter group, the oxidative damage to the proteins

was almost undetectable (Fig. 4A). Lipid peroxidation was assessed by measuring levels of MDA. Maximal MDA production was detected at 5 min of reperfusion and remained high in the group subjected to 60 min reperfusion. The MDA content in postconditioned hearts was comparable to control levels (Fig. 4B).

The content of CuZnSOD, MnSOD, catalase and GPx1 was compared in all groups (Fig. 5). A significant increase related to postconditioning was observed only for CuZnSOD content after prolonged reperfusion (Fig. 5A). Other enzymes, such as catalase (Fig. 5C) and GPx (Fig. 5D), were slightly augmented in PC60 hearts compared with IR60 hearts, but the differences were not statistically significant. We also evaluated the transcription levels of the four enzymes. We found a threefold increase in CuZnSOD transcription in PC60 hearts compared with IR60 hearts ($P < 0.05$; Fig. 6A) and a twofold increase in GPx1 transcripts in PC60 hearts ($P < 0.05$ versus IR60 hearts; Fig. 6D).

Activity of antioxidant proteins in postconditioned hearts

Diminution of oxidative stress markers was correlated with an increase in activity of CuZnSOD in PC60 heart homogenates. Upregulation was 47.3 ± 2.6 U (mg protein) $^{-1}$ in PC60 versus 3.7 ± 2.8 U (mg protein) $^{-1}$ in control hearts versus 30.0 ± 5.4 U (mg protein) $^{-1}$ in IR60 hearts (Table 2). Using cytosolic and mitochondrial fractions to determine in-gel activities, we confirmed that ischaemia-reperfusion increases the activity of both SOD isoforms; however, additional upregulation related to postconditioning was observed only in the activity of CuZnSOD (Fig. 7A).

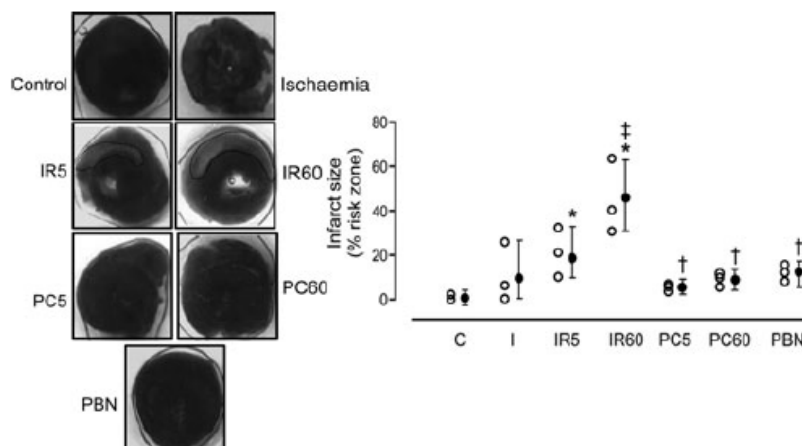


Figure 3. Myocardial infarct size in PC hearts

Data represent the means \pm SD of three experiments. * $P < 0.05$ versus C; ‡ $P < 0.05$ versus I; † $P < 0.05$ versus IR60.

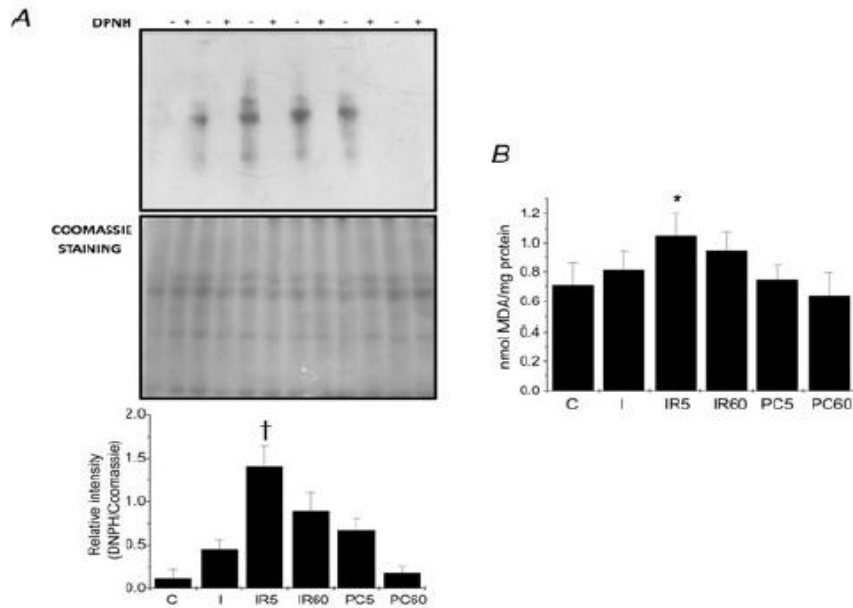


Figure 4. Protein and lipid oxidant damage in homogenates from postconditioned hearts
 A, representative image of protein carbonylation in homogenates derivatized with DNP (+) and without DNP (–). Coomassie Blue staining of the gels used for immunoblotting was performed to detect changes in protein loading. The ratio between staining and total luminescence signal for each sample is also shown. B, malondialdehyde (MDA) content in postconditioned hearts. Data represent the means ± SD of six experiments. **P* < 0.05 versus control (C), PC5 and P60; †*P* < 0.05 versus all groups.

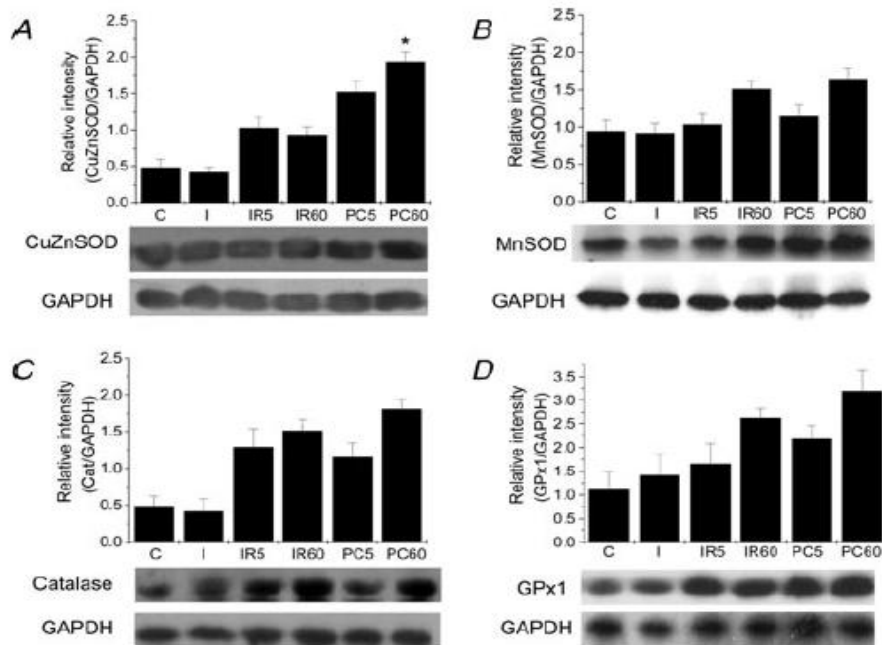


Figure 5. Relative content of antioxidant enzymes in postconditioned hearts
 Representative Western blots of CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD; A), MnSOD (B), catalase (C) and glutathione peroxidase 1 (GPx1; D) normalized to glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH). The bars represent the means + SD of three experiments. **P* < 0.05 versus IR60.

Functional role of SOD in postconditioning-conferred cardioprotection

To determine whether upregulation of the level and activity of CuZnSOD may play a physiological role in protecting hearts against ischaemia–reperfusion injury, we perfused DETC, a relatively specific inhibitor of both SODs, throughout the reperfusion protocol. There was a partial but significant decrease in cardiac double product after DETC administration compared with the postconditioned hearts ($P < 0.05$), demonstrating a partial participation of SOD in postconditioning-conferred cardioprotection. Interestingly, when DETC was administered only during reperfusion, heart function was augmented and did not show a significant difference from postconditioned hearts (Fig. 8). To rule out any effect of DETC on cardiac function, some hearts were perfused continuously with DETC without further treatment. At the doses used, DETC did not compromise cardiac function.

Measurement of GSH:GSSG ratio in homogenates from postconditioned hearts

Homogenates from hearts subjected to ischaemia and prolonged reperfusion showed lower GSH content than control hearts, which is consistent with the idea that in conditions of enhanced oxidative stress, GSH:GSSG ratio diminution impacts on protein function by modification

of critical thiol groups. Conversely, GSH content and thereby the GSH:GSSG ratio was higher in the PC60 group compared with the IR60 group (Table 3).

Discussion

Reactive oxygen species are attractive mechanistic targets for cardioprotection. It has been suggested that at low levels ROS modulate cardioprotective signalling pathways (Penna *et al.* 2009), although the identification of the site of ROS generation, as well as the mechanisms for the induction of protective signal transduction, are not yet known. Recent studies indicate that moderate uncoupling could play a protective role in mitochondria damaged by ischaemia, decreasing ROS production and mitochondrial calcium uptake (Paillard *et al.* 2009), whereas other groups propose that the targets of postconditioning protective signalling are mitochondria damaged by ischaemia (Chen *et al.* 2011). In contrast, cardioprotection is associated with oxidant-injury contention (Kin *et al.* 2004). In this regard, diminished $O_2^{\cdot-}$ levels were determined close to the risk area of PC hearts as compared with ischaemic and reperfused hearts (Iliodromitis *et al.* 2006). Lauzier *et al.* (2008) reported that PC significantly reduced dysfunction after reperfusion in isolated working hearts of senescent mice, associated with a reduction in heart $O_2^{\cdot-}$ staining, while PC in an *in vivo* model reduced the plasma malondialdehyde content and decreased the generation

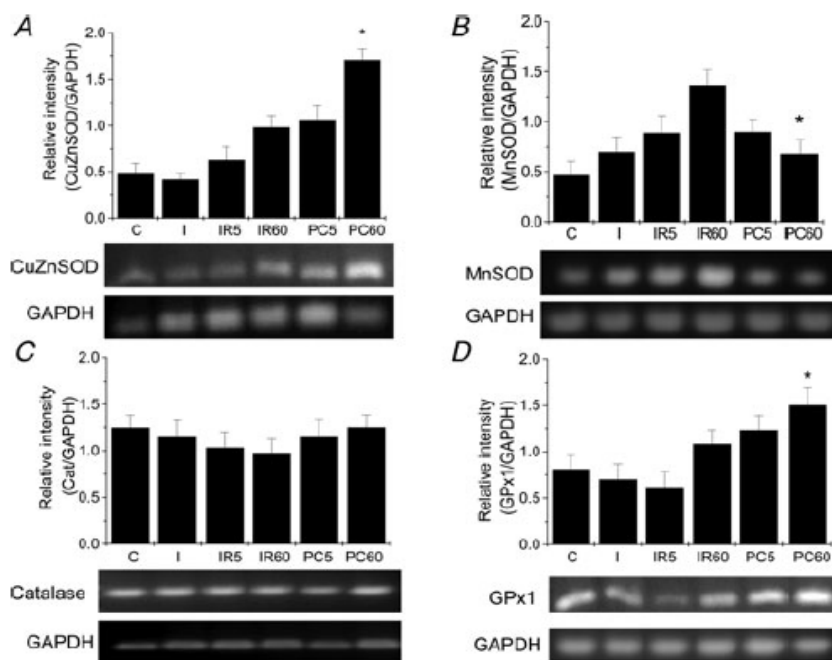


Figure 6. Expression of antioxidant enzymes in postconditioned hearts

Representative PCRs of CuZnSOD (A), MnSOD (B), catalase (C) and glutathione peroxidase (GPx1; D) normalized to GAPDH transcript. The bars represent the means \pm SD of three experiments. * $P < 0.05$ versus IR60.

Table 2. Activities of antioxidant enzymes in postconditioned hearts

Group	Catalase (k (mg protein) ⁻¹)	CuZnSOD (U (mg protein) ⁻¹)	MnSOD (U (mg protein) ⁻¹)	Glutathione peroxidase (U (mg protein) ⁻¹)	Glutathione reductase (U (mg protein) ⁻¹)	Thioredoxin reductase (U (mg protein) ⁻¹)
Control	0.04 ± 0.01	3.7 ± 2.8	4.4 ± 2.2	0.19 ± 0.04	0.02 ± 0.003	0.14 ± 0.04
Ischaemia	0.04 ± 0.01	13.6 ± 3.2	7.6 ± 3.2	0.21 ± 0.04	0.01 ± 0.003	0.21 ± 0.06†
IR5	0.04 ± 0.02	20.1 ± 4.0	17.1 ± 2.8	0.19 ± 0.05	0.01 ± 0.004	0.11 ± 0.03
IR60	0.02 ± 0.01	30.0 ± 5.4	23.0 ± 4.0	0.20 ± 0.03	0.02 ± 0.004	0.12 ± 0.02
PC5	0.04 ± 0.01	30.8 ± 3.7	11.4 ± 2.8	0.18 ± 0.05	0.01 ± 0.004	0.12 ± 0.05
PC60	0.03 ± 0.01	47.3 ± 2.6*	18.2 ± 2.6	0.19 ± 0.03	0.01 ± 0.003	0.15 ± 0.02

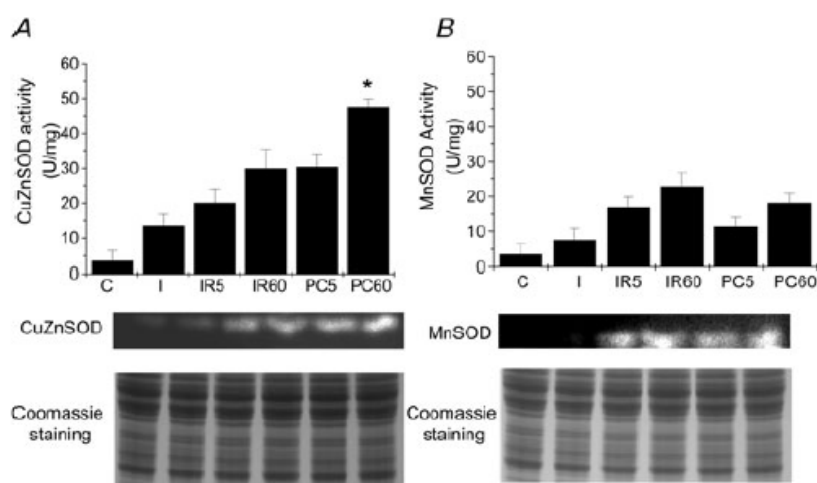
Catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase and thioredoxin reductase activities were evaluated in homogenates, CuZn superoxide dismutase (CuZnSOD) activity was evaluated in the cytosol and Mn superoxide dismutase (MnSOD) in mitochondria from postconditioned hearts. Values represent the means ± SD of three different experiments in duplicate. **P* < 0.05 versus IR60 and †*P* < 0.05 versus all groups.

of superoxide radical in the myocardial area at risk (Kin *et al.* 2008). In addition, aconitase activity was preserved in mitochondria isolated from PC cardiac tissue, suggesting a close dependence between mitochondrial integrity and a diminution of oxidative stress (Correa *et al.* 2008b).

Surprisingly, little is known about the contribution of the antioxidant enzymes against oxidant damage in PC hearts. A recent study showed that PC was associated with significant decreases in total SOD activity with respect to ischaemia–reperfusion, although increased levels of the enzyme were detected (Penna *et al.* 2011). Thus, the aim of the present study was to provide further evidence on the endogenous antioxidant status of postconditioned hearts. Our results showed that PC-conferred protection was associated with a significant diminution in malondialdehyde levels and protein carbonylation. Furthermore, in contrast with report of Penna *et al.* (2011), we found increases in

transcription, protein levels and activity of CuZnSOD in PC hearts after prolonged reperfusion.

A possible explanation for this discrepancy is that the activity of compartmentalized isoenzymes measured in Penna's report would not necessarily be reflected in total SOD activity. Also, the complexity of the antioxidant defense system working as an integrated system, along with the different experimental conditions employed, could account for such differences. Superoxide dismutases are important antioxidant enzymes that combat the toxicity of O₂⁻. Their protective role against myocardial ischaemia and reperfusion damage has been demonstrated in gene-targeted mice. Overexpression of MnSOD significantly attenuated myocardial necrosis after ischaemia–reperfusion (Jones *et al.* 2003), and CuZnSOD overexpression abolished the reperfusion-associated burst of superoxide generation, decreasing cellular injury (Wang *et al.* 1998). Also, it has been

**Figure 7. In-gel activity of CuZnSOD and MnSOD**

Cytosolic (A) and mitochondrial zymograms (B) of postconditioned hearts. The lower panels show Coomassie staining of the gels. The bars represent the means ± SD of relative activity of six experiments expressed as units per milligram of protein. **P* < 0.05 versus all groups.

shown that moderate overexpression of CuZnSOD at a targeted intracellular location of vascular cells protected the heart against ischaemia–reperfusion damage in *TgN(SOD1)^{3Cje}* transgenic mice (Chen *et al.* 2000). In other tissues, recombinant adenoviruses overexpressing CuZnSOD or MnSOD afforded protection from focal cerebral ischaemia–reperfusion injury with delayed induction of nuclear factor- κ B and abrogated the response of activator protein-1 in mice (Kinouchi *et al.* 1991).

However, augmented CuZnSOD without a concomitant increase in catalase or GPx could be harmful, instead of beneficial, because it may favour intracellular H₂O₂ accumulation. In our experiments, we observed a relative increase in GPx1 levels during postconditioning, although we did not find changes in the activity of the enzyme. Again, the contrasting results between the activities and levels of the antioxidant enzymes supports the proposal of redox environment compartmentalization during reperfusion (Penna *et al.* 2009). Intriguingly, we observed a partial, although significant, diminution in PC heart function when the organ was perfused with the SOD inhibitor throughout the protocol, but this effect was lost when the compound was administered after the PC cycles. We conclude that the contribution of CuZnSOD to overall cardioprotection could be limited spatially and temporally to a concerted action of other PC-activated mechanisms.

Steady-state concentrations of GSSG and ratios of GSH to GSSG are widely recognized to be sensitive indicators of oxidative stress in tissues (Schafer & Buettner, 2001; Jones, 2002). The rate of GSSG formation and its reconversion to GSH or extrusion from cells is reflected in the GSSG content, while the GSH:GSSG

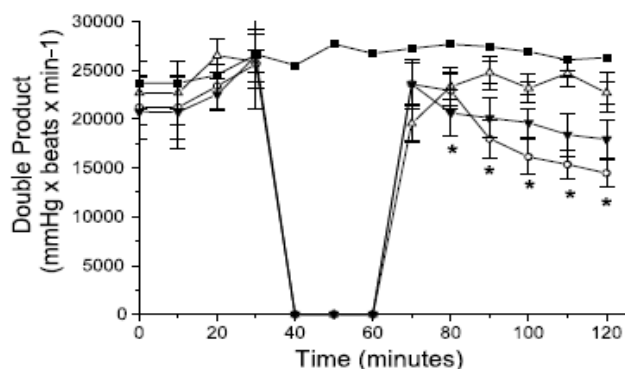


Figure 8. Effect of diethylthiocarbamate on PC-conferred cardioprotection

Diethylthiocarbamate was supplemented in the Krebs–Henseleit solution and administered throughout the protocol (open circles) or during reperfusion only (inverted filled triangles). The data represent the means \pm SD of three experiments. Filled squares represent control conditions and open triangles PC60. * $P \leq 0.05$ versus control and PC60 groups.

Table 3. Glutathione redox status in postconditioned hearts

Conditions	GSH (nmol (mg protein) ⁻¹)	GSSG (nmol (mg protein) ⁻¹)	GSH:GSSG ratio
Control	4 \pm 0.3	0.6	6.6
Ischaemia	3 \pm 0.6	0.7	4.3
IR5	3 \pm 0.4*	1.3	2.3
IR60	2 \pm 0.1	2.5	0.8
PC5	3 \pm 0.3*	1.4	2.1
PC60	3 \pm 0.2*	0.6†	5†

Abbreviations: GSH, reduced glutathione; and GSSG, oxidized glutathione. Values represent the mean of three different experiments. * $P < 0.05$ versus control conditions and † $P < 0.05$ versus IR60.

ratio is indicative of the overall redox state. Our results showed that postconditioning (PC60) maintains higher a GSH:GSSG ratio than that observed after long reperfusion; thus, GSH, reacting either as an electron donor to neutralize hydrogen peroxides and lipoperoxides or as a direct oxygen free radical scavenger, could avoid H₂O₂ accumulation in the conditions described here. In this respect, a correlation between the GSH content and decrease in H₂O₂ production has been reported in cultured cardiomyocytes subjected to short cycles of hypoxia–normoxia after prolonged hypoxia (Serviddio *et al.* 2005).

The present findings should be interpreted within the constraints of potential limitations. We are conscious that the *ex vivo* heart model takes any study further away from clinical relevance than *in vivo* studies and, furthermore, that blood-perfused isolated heart preparations demonstrate comparatively minor perturbations in metabolism compared with buffer-perfused preparations (Pasini *et al.* 1999). However, as it has been demonstrated that PC protection is not dependent on circulating blood factors or cells (Yang *et al.* 2005), we consider that the isolated model as presented here is adequate to study cardiac response in terms of oxidative stress.

In conclusion, the present study shows that postconditioning decreases the ROS-mediated damage to lipids and proteins. A reduction in oxidative stress markers was correlated with recovery of cardiac function, increased CuZnSOD activity and maintenance of the ratio of GSH:GSSG. We conclude that maintenance of the thiol–disulfide redox status may be important in the context of cardioprotection mediated by postconditioning and that CuZnSOD activity could be relevant if acting in concert with other PC-activated mechanisms.

References

Aebi H (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol* **105**, 121–126.

- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raïsky O, Loufouat J, Robert D & Ovize M (2005). Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation* **111**, 194–197.
- Barrera D, Maldonado PD, Medina-Campos ON, Hernández-Pando R, Ibarra-Rubio ME, Pedraza-Chaverri J (2003). Protective effect of SnCl₂ on K₂Cr₂O₇-induced nephrotoxicity in rats: the indispensability of HO-1 preinduction and lack of association with some antioxidant enzymes. *Life Sci* **73**, 3027–3041.
- Baudry N, Laemmel E & Vicaute E (2008). In vivo reactive oxygen species production induced by ischemia in muscle arterioles of mice: involvement of xanthine oxidase and mitochondria. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**, H821–H828.
- Besse S, Bulteau AL, Boucher F, Riou B, Swynghedauw B & de Leiris J (2006). Antioxidant treatment prevents cardiac protein oxidation after ischemia-reperfusion and improves myocardial function and coronary perfusion in senescent hearts. *J Physiol Pharmacol* **57**, 541–552.
- Buelna-Chontal M, Correa F, Hernández-Reséndiz S, Zazueta C & Pedraza-Chaverri J (2011). Protective effect of α -mangostin on cardiac reperfusion damage by attenuation of oxidative stress. *J Med Food* **14**, 1370–1374.
- Chambers DE, Parks DA, Patterson G, Roy R, McCord JM, Yoshida S, Parmley LF & Downey JM (1985). Xanthine oxidase as a source of free radical damage in myocardial ischemia. *J Mol Cell Cardiol* **17**, 145–152.
- Chen Z, Oberley TD, Ho Y, Chua CC, Siu B, Hamdy RC, Epstein CJ & Chua BH (2000). Overexpression of CuZnSOD in coronary vascular cells attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* **29**, 589–596.
- Chen Q, Vazquez EJ, Moghaddas S, Hoppel CL & Lesnfsky EJ (2003). Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III. *J Biol Chem* **278**, 36027–36031.
- Correa F, García N, Gallardo-Pérez JC, Carreño-Fuentes L, Rodríguez-Enriquez S, Marín-Hernández A & Zazueta C (2008a). Post-conditioning preserves glycolytic ATP during early reperfusion: a survival mechanism for the reperfused heart. *Cell Physiol Biochem* **22**, 635–644.
- Correa F, García N, Robles C, Martínez-Abundis E & Zazueta C (2008b). Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart. *J Bioenerg Biomembr* **40**, 599–606.
- Correa E, Martínez-Abundis E, Hernández-Reséndiz S, García N, Buelna-Chontal M, Arreguín F & Zazueta C (2010). Pharmacological strategies to contend against myocardial reperfusion damage: diverse chemicals for multiple targets. *Curr Med Chem* **17**, 2261–2273.
- de Jesús García-Rivas G, Guerrero-Hernández A, Guerrero S, Rodríguez-Zavala JS & Zazueta C (2005). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in the post-ischemic heart. *FEBS J* **272**, 3477–3488.
- Dhalla N, Elmoselhi A, Hata T & Makino N (2000). Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* **47**, 446–56.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Pasini E, De Giuli F & Albertini A (1991). Role of oxygen free radicals in ischemic and reperfused myocardium. *Am J Clin Nutr* **53**, 215S–222S.
- Guerrero-Beltrán CE, Calderón-Oliver M, Tapia E, Medina-Campos ON, Sánchez-González DJ, Martínez-Martínez CM, Ortiz-Vega KM, Franco M & Pedraza-Chaverri J (2010). Sulforaphane protects against cisplatin-induced nephrotoxicity. *Toxicol Lett* **192**, 278–285.
- Hausenloy DJ & Yellon DM (2008). Preconditioning and postconditioning: underlying mechanisms and clinical application. *Atherosclerosis* **10**, 129–134.
- Iliodromitis EK, Georgiadis M, Cohen MV, Downey JM, Bofilis E & Kremastinos DT (2006). Protection from post-conditioning depends on the number of short ischemic insults in anesthetized pigs. *Basic Res Cardiol* **101**, 502–507.
- Ji LL, Statman FW & Lardy HA (1988). Antioxidant enzyme systems in rat liver and skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* **263**, 150–160.
- Jones DP (2002). Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance. *Methods Enzymol* **348**, 93–112.
- Jones SP, Hoffmeyer MR, Sharp BR, Ho YS & Lefer DJ (2003). Role of intracellular antioxidant enzymes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **284**, H277–H282.
- Kin H, Wang NP, Mykytenko J, Reeves J, Deneve J, Jiang R, Zatta AJ, Guyton RA, Vinten-Johansen J & Zhao ZQ (2008). Inhibition of myocardial apoptosis by postconditioning is associated with attenuation of oxidative stress-mediated nuclear factor- κ B translocation and TNF α release. *Shock* **29**, 761–768.
- Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Guyton RA & Vinten-Johansen J (2004). Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* **62**, 74–85.
- Kinouchi H, Epstein CJ, Mizui T, Carlson E, Chen SF & Chan PH (1991). Attenuation of focal cerebral ischemic injury in transgenic mice overexpressing CuZn superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**, 11158–11166.
- Lauzier B, Delemasure S, Debin R, Collin B, Sicard P, Acar N, Bretillon L, Joffre C, Bron A, Creuzot-Garcher C, Vergely C, Rochette L (2008). Beneficial effects of myocardial postconditioning are associated with reduced oxidative stress in a senescent mouse model. *Transplantation* **85**, 1802–1808.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL & Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265–275.
- Martínez-Abundis E, Correa F, Pavón N & Zazueta C (2009). Bax distribution into mitochondrial detergent-resistant microdomains is related to ceramide and cholesterol content in postischemic hearts. *FEBS J* **276**, 5579–5588.
- Meister A (1984). New aspects of glutathione biochemistry and transport-selective alteration of glutathione metabolism. *Nutr Rev* **42**, 397–410.
- Misra MK, Sarwat M, Bhakuni P, Tuteja R & Tuteja N (2009). Oxidative stress and ischemic myocardial syndromes. *Med Sci Monit* **15**, RA209–RA219.
- Paillard M, Gomez L, Augeul L, Loufouat J, Lesnfsky EJ & Ovize M (2009). Postconditioning inhibits mPTP opening

- independent of oxidative phosphorylation and membrane potential. *J Mol Cell Cardiol* **46**, 902–909.
- Pasini E, Solfrini R, Bachetti T, Marino M, Bernocchi P, Visioli F & Ferrari R (1999). The blood perfused isolated heart: characterization of the model. *Basic Res Cardiol* **94**, 215–222.
- Penna C, Mancardi D, Rastaldo R & Pagliaro P (2009). Cardioprotection: a radical view. Free radicals in pre and postconditioning. *Biochim Biophys Acta* **1787**, 781–793.
- Penna C, Perrelli MG, Tullio F, Moro F, Parisella ML, Merlino A & Pagliaro P (2011). Post-ischemic early acidosis in cardiac postconditioning modifies the activity of antioxidant enzymes, reduces nitration, and favors protein S-nitrosylation. *Pflugers Arch* **462**, 219–233.
- Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM & Cohen MV (2006). Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A_{2b} receptor cascade. *Cardiovasc Res* **70**, 308–314.
- Pompella A, Visvikis A, Paolicchi A, De Tata V & Cassini AF (2003). The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. *Biochem Pharmacol* **66**, 1499–1503.
- Schafer FQ & Buettner GR (2001). Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. *Free Radic Biol Med* **30**, 1191–1212.
- Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, Altomare E, Fiore T & Vendemiale G (2005). Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxide production and glutathione depletion. *FASEB J* **19**, 354–361.
- Sochman J, Vrbská J, Musilova B & Rolec M (1996). Infarct size limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients. *Clin Cardiol* **19**, 94–100.
- Sörensson P, Saleh N, Bouvier F, Böhm F, Settergren M, Caidahl K, Tornvall P, Arheden H, Rydén L & Pernow J (2010). Effect of postconditioning on infarct size in patients with ST elevation myocardial infarction. *Heart* **96**, 1710–1715.
- Tirosh O, Pardo M, Schwartz B & Miskin R (2005). Long-lived α MUPA transgenic mice show reduced SOD2 expression, enhanced apoptosis and reduced susceptibility to the carcinogen dimethylhydrazine. *Mech Ageing Dev* **126**, 1262–1273.
- Townsend DM, Tew KD & Tapiero H (2003). The importance of glutathione in human disease. *Biomed Pharmacother* **57**, 145–155.
- Venardos KM, Perkins A, Headrick J & Kaye D (2007). Myocardial ischemia-reperfusion injury, antioxidant enzyme systems and selenium: a review. *Curr Med Chem* **14**, 1539–1549.
- Wang P, Chen H, Qin H, Sankarapandi S, Becher MW, Wong PC & Zweier JL (1998). Overexpression of human copper-zinc-superoxide dismutase (SOD1) prevents postischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **14**, 4556–4560.
- Yang XM, Philipp S, Downey JM & Cohen MV (2005). Postconditioning's protection is not dependent on circulating blood factors or cells but involves adenosine receptors and requires PI3-kinase and guanylyl cyclase activation. *Basic Res Cardiol* **100**, 57–63.
- Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM & Cohen MV (2004). Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* **44**, 1103–1110.
- Zhao ZLQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA & Vinten-Johansen J (2003). Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **285**, H579–H588.

Acknowledgements

This work was partially supported by grant 80791 to C.Z. from the National Council of Science and Technology (CONACyT), Mexico and PAPIIT IN201910 to J.P.-C. Francisco Arreguin was partially supported by the Doctoral Program in Medical Sciences, School of Medicine, National Autonomous University of Mexico (UNAM) and a scholarship from CONACyT.

Supporting Information

The following supporting information is available in the online version of this article.

Figure S1. PO₂, PCO₂, pH and \pm dP/dt IN coronary effluents of isolated heart preparations. PaO₂ was evaluated *in situ* using an oxygen electrode (Instech Laboratories, Inc., Plymouth Meeting, PA) placed in the right pulmonary artery during all the experiment. PCO₂ was indirectly determined by measuring changes in pH). Briefly, aliquots of the perfusate taken from the arterial cannula were mixed with 10 mM Na₂CO₃ (1:1, v/v) for 1 min and pH was measured to evaluate carbonic acid formation. Pressure signals were recorded and analyzed in the Lab-Trax system with integrated software Data-Trax (World Precision Instruments, Sarasota, FL). One-way ANOVA followed by Tukey test was performed to detect changes between means. No significant differences were found.

Please note: Wiley-Blackwell are not responsible for the content or functionality of any supporting materials supplied by the authors. Any queries (other than missing material) should be directed to the corresponding author for the article.

Pharmacological Strategies to Contend Against Myocardial Reperfusion Damage: Diverse Chemicals for Multiple Targets

F. Correa, E. Martínez-Abundis, S. Hernández-Reséndiz, N. García, M. Buelna-Chontal, F. Arreguín and C. Zazueta*

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez", Juan Badiano No. 1., Col. Sección XVI, Mexico 14080, D.F., Mexico

Abstract: Acute myocardial infarction is a frequent and disabling disease. Paradoxically, reperfusion, the most effective treatment to reduce infarct size, can both protect and kill. Although reperfusion protects by preventing lesions occurring during prolonged ischemia, it causes damage because reflow is associated with an unbalance between oxygen availability and metabolic demand, altered ionic homeostasis, and reactive oxygen species (ROS) generation. Recently, more players in myocardial reperfusion injury have been described: protein kinase C (PKC) and members of the MAP kinase, which activate downstream cascades that may activate intricate processes compromising cardiac recovery after ischemia. All together, such mechanisms promote endothelial and vascular dysfunction, sequels of impaired blood flow, metabolic and contractile dysfunction, dysrhythmia, cellular necrosis and apoptosis. Different pharmacological agents, as well as mechanical strategies, have been used to challenge the outcome of the complex interactions among these mechanisms and with others. In this review, we focused on the potential of different compounds used in animal models and in the clinical practice to improve the prognosis after post-ischemic reperfusion. We also review mechanisms activated during reperfusion injury and the structure-activity relationship between some of the cardioprotective chemicals and their cellular targets.

Keywords: Reperfusion injury, cardioprotection, calcium, oxidative stress, apoptosis.

INTRODUCTION

Myocardial ischemia occurs when the oxygen demand exceeds blood supply, after an event of coronary occlusion. Reopening of the occluded coronary artery, by pharmacological or invasive methods, is the most effective treatment to reduce infarct size resulting from myocardial ischemia. Paradoxically, this procedure has the potential to introduce an additional lethal injury known as reperfusion injury (reviewed in [1, 2]). For many years reperfusion injury was considered as a laboratory curiosity, but this concept changed when Vinten-Johansen's group [3] described that reperfusion damage could be inhibited by short and repetitive cycles of ischemia in the early minutes after revascularization of myocardial infarction in dog hearts. Later, Staat *et al.* [4] added compelling evidence vanquishing any reservations about the existence of reperfusion damage in humans by testing the concept of post-conditioning in a randomized, multicenter study. As a result of these exciting findings, the endogenous cardioprotective strategies activated by post-conditioning are being exhaustively studied by several groups and a renewed interest in pharmacological compounds that protect against reperfusion damage has emerged.

I. PRESERVING IONIC BALANCE

I.1. Ca²⁺ Channel Blockers

Calcium homeostasis undergoes fluctuations in balance during reperfusion, largely due to the release of calcium from intracellular stores, particularly from the sarcoplasmic reticulum [5, 6]. Pre-treatment of ischemic-reperfused hearts

with Ca²⁺ antagonists, like verapamil and diltiazem, lowers the increased left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), developed by the entry of Ca²⁺ into the myocardium via sarcolemmal L-type Ca²⁺ channels [7]. The chemical interaction between these compounds and the channel is encoded in their pore-forming α_1 -subunits (Ca_v1.1–Ca_v1.4 α_1) that contain a number of unique amino acid residues critical for the formation of a binding pocket for different chemical classes of Ca²⁺ antagonists. Detailed molecular analyses of the distinct drug binding domains indicate that the binding residues of 1,4-dihydropyridines (e.g., isradipine and nifedipine), phenylalkylamines (e.g., verapamil and gallopamil), and benzothiazepines (diltiazem), are located within the same regions on α_1 subunits. A multisubsite domain binding model was proposed in which the noncompetitive interactions, observed among different classes of calcium channel blockers, result from steric interactions rather than drug-induced conformational changes. This multisubsite binding domain is located in the pore-forming regions of repeats III and IV of the α_1 -subunit (Fig. 1). It allows drug binding to a domain interface, thus facilitating stabilization of closed channel conformations. Mutation of residue Thr-1066 to tyrosine eliminates high affinity for dihydropyridines assessed by radioligand binding and functional studies [8, 9].

I.2. Beta Adrenergic Receptor Antagonists

Beta-adrenergic receptor (β -AR) antagonists have been shown to protect against ischemia-reperfusion injury [10]. Although the exact mechanisms for the cardioprotective action of these agents are not yet fully understood, it has been suggested that cytosolic Ca²⁺ plays a role in mediating the β -adrenergic receptor signals to mitochondrion. Carvedilol inhibits the calcium-dependent superoxide production by damaged respiratory complex I, demonstrating that this blocker acts directly on isolated mitochondria [11,

*Address correspondence to this author at the Instituto Nacional de Cardiología, I. Ch., Departamento de Bioquímica, Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, 14080, D.F., México; Tel: (+52-55) -5573-2911 (1465); Fax: (+52-55) -5573-0926; E-mail: azazueta@yahoo.com

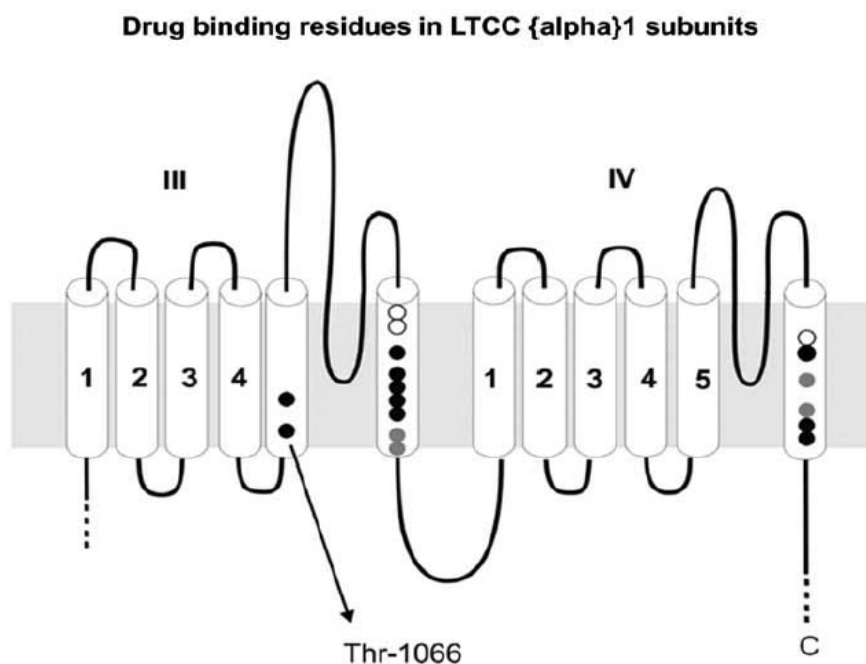


Fig. (1). Drug binding residues in L-type calcium channel 1 subunits (LTCC1). Conventional putative folding structure on LTCC 1 subunits, with circles indicating the position of residues crucial for (DPH) dihydropyridines (black); (PAA) phenylalkylamines (gray), and both DHP and PAA (open) binding affinity. Only repeats III and IV are illustrated. (Taken from Huber *et al.* [9]. Copyright © 2004, by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.)

12]. In addition, a recent study indicates that β -AR blockers exert antioxidant effects and preserve sarcoplasmic reticulum's function during the ischemic period through a lipid peroxidation-reducing effect and by suppressing the increase in phospholamban phosphorylation [13].

A common feature in the chemical structure of β -blockers is, at least, one aromatic ring structure attached to a side alkyl chain possessing a secondary hydroxyl and amine functional group (Fig. 2). Each of the available β -blockers has one or more chiral centers in its structure, and, in all cases, at least one of the chiral carbon atoms residing in the alkyl side chain is directly attached to a hydroxyl group. With the recent determination of the crystal structure of the human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor [14], new insights in the structural interactions between this receptor and its ligands have been proposed. Carazolol is a partial inverse agonist that binds with picomolar affinity to the β_2 adrenergic receptor (β_2 AR), producing a reduction of basal activity of the receptor. Shukla *et al.* [15] described extensive interactions between the receptor and this compound in the light of existing data obtained from mutagenesis and biochemical approaches. For example, Asp113 was found previously to be crucial for ligand binding to the β_2 AR. Mutation of Asp113 to asparagine leads not only to complete ablation of antagonist binding but also to decreases in the potency of agonists by several orders of magnitude [16]. It has also been described that Val114 and Phe290 interact with the C₈-to-C₁₃ ring of the carbazole moiety of carazolol and form a hydrophobic sandwich with this aryl group. These interactions could explain the loss of affinity for aryl moiety-containing antagonists, like alprenolol.

I.3. The Na⁺/K⁺ ATPase Inhibitors

External energy sources are required in addition to the selective opening of ion channels to maintain concentrations of ions in extracellular and intracellular compartments against their concentration gradients.

In excitable tissues, the activity of the sarcolemmal Na⁺/K⁺ ATPase is crucial for the maintenance of normal electrical activity and ion gradients. In cardiac muscle, the sarcolemma sodium (Na⁺) gradient established by Na⁺/K⁺ ATPase activity is essential not only for generating the rapid upstroke of the action potential but also for driving a number of ion-exchange and transport processes crucial for normal cellular function, ion homeostasis, and the control of cell volume. Hence, interventions that influence either the activity of the Na⁺/K⁺ ATPase or indirectly the transmembrane Na⁺ gradient can affect profoundly normal cell function [17]. Among the pharmacological agents that inhibit the action of the pump is the vanadate ion, which binds to the phosphorylation sites on the cytoplasmic side and, thus, inhibits enzyme phosphorylation. In the post-ischemic heart, vanadate has not effect on the intracellular sodium concentration, but slows sodium recovery during reperfusion. The presence of vanadate during ischemia results in attenuation of acidosis and diminution of lactate accumulation. Thereby, vanadate alters glucose utilization and Na⁺/K⁺ ATPase activity [18]. At low concentrations (1 - 4 μ M), vanadate has been found to attenuate cardiac dysfunction and changes in sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ uptake, as well as ryanodine receptor (RyR)-binding activities, due to ischemia-reperfusion (I/R) in isolated rat hearts [19].

In humans (EXPEDITION trial), the administration of cariporide at the onset of ischemia reduced myocardial ischemia-reperfusion, although collateral neurologic effects preclude its use at the present time. The timing of Na^+/H^+ exchange inhibitor administration seems to be a key factor in clinical cardioprotection (reviewed in [29]). In GUARDIAN and EXPEDITION clinical trials, cariporide infusion was started before the ischemia, whereas eniporide failed to reduce the infarct size when administered at the time of reperfusion [30].

I.5. Potassium Channel Activators

ATP-sensitive potassium (K_{ATP}) channels are located in the sarcolemmal membrane and in the mitochondrial membrane of cardiomyocytes. K_{ATP} channels are inhibited by intracellular ATP and activated by intracellular nucleoside diphosphates. Under normoxic conditions, the sarcolemmal channel remains in a closed state. However, during myocardial ischemia, it opens as the intracellular ATP concentration decreases and ADP and lactate increase, hyperpolarizing the cell membrane. Under this condition, the myocardial action potential is shortened and the voltage-dependent calcium currents decrease, events that have been associated with cardioprotection in myocardial ischemic diseases [31].

By using potassium channel openers (nicorandil and pinacidil) and specific blockers of mitochondrial (5-hydroxydecanoate) and sarcolemmal (HMR 1883) K_{ATP} channels, Das and Sharkar [32] investigated whether opening of the sarcolemmal or mitochondrial K_{ATP} (mK_{ATP}) was related primarily to cardioprotection during ischemia and reperfusion in rabbit hearts. They found that nicorandil or pinacidil administration prior to coronary occlusion improved cardiac outcome after ischemia-reperfusion due to activation of cardiomyocyte mitochondrial K_{ATP} channels, since 5-hydroxydecanoate (5-HD) but not HMR 1883 abolished the beneficial effects of nicorandil and pinacidil. However, the conclusion that mK_{ATP} channel opening is related to cardioprotective effects is based solely on pharmacological evidence. Determination of the structure of the pore-forming protein underlying mK_{ATP} conductance will resolve many of the controversial issues about this channel, such as those concerning non-specific effects of K_{ATP} channel openers. To this respect, reconstitution of K^+ uniport activity in liposomes with a 53-kDa mitochondrial protein was reported by Diwan *et al.* [33], whereas a 54-kDa was tentatively identified as a component of the mK_{ATP} channel, based on its sensitivity to glibenclamide [34]. It has been suggested that the mK_{ATP} might be composed of an inward rectifier potassium channel subunit (Kir) and a sulfonylurea receptor (SUR). Evidence includes the recognition of a 51-kDa mitochondrial protein by Kir6.1 antibodies [35] and low-affinity sulfonylurea binding sites in mitochondrial preparations [36]. Although the combination of mitochondrial SUR1/ Kir6.1 has similar pharmacological features to known plasma membrane isoforms of K_{ATP} [37], the dominant-negative knock-out of Kir6.1 or Kir6.2 had no effect on mK_{ATP} responses in isolated myocytes [38]. However, a recent functional characterization of mitochondrial splicing variants of SUR2 indicates that a 130-kDa protein can form ATP-sensitive conductance and could contribute to cardioprotection [39].

I.6. Mitochondrial Calcium Uptake Inhibitors

Experimental observations on calcium signal transmission between the endoplasmic reticulum and mitochondria suggest the existence of a stable mitochondria-reticulum interaction, where mitochondria could accumulate a large fraction of the calcium released through the ryanodine receptor and the IP₃ receptor [40]. According to this proposal, fluorescence calcium image analysis shows evidence of the existence of high calcium concentration microdomains, susceptible of being sensed by mitochondria [41]. Since calcium accumulation in mitochondria has been proposed to play a key role in triggering irreversible damage in the reperfused heart [42, 43, 44], many groups have suggested that interventions aimed at reducing mitochondrial calcium overload (Fig. 4) and, hence, membrane potential depolarization, matrix swelling, and abolition of ATP synthesis, due to the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), should prevent cellular injury induced by reperfusion.

Evidences highlighting post-ischemic electrical dysfunction and mitochondrial bioenergetics include experiments with inhibitors of the mitochondrial benzodiazepine receptor (a putative component of the mPTP) that blocks depolarization of the mitochondrial membrane potential and prevents reperfusion arrhythmias [45]. Our group demonstrated that Ru360 , a highly specific inhibitor of the mitochondrial calcium uniporter, avoids I/R-related arrhythmias in isolated working rat hearts, by maintaining the mitochondrial calcium concentration low during reperfusion and, in consequence, favoring the closed state of the mPTP [46].

Other drugs, such as diazoxide and ruthenium red (RR) have been used as modulators of the mitochondrial calcium content. Diazoxide is a mitochondrial K^+ -ATP channel opener that exerts an impressive recovery during reperfusion in isolated hearts, when used at low concentrations (30-100 μM) [47-49]. This compound only partially protects at concentrations up to 625 μM in a whole rat model [50]. RR also exerts protection in isolated hearts at 0.025-10 μM [51,43], but, in a whole rat model, it shows protective effect at doses close to 30 μM [52]. At these concentrations, both compounds show collateral effects, not only in the heart but also in other organs [53, 54]. Mitochondrial integrity could also be maintained after reperfusion by inhibiting the opening of the mPTP. In this context, a wide variety of molecules that inhibit this mega-channel, including cyclosporine A (CSA) (Fig. 4), have been used as protectors against reperfusion injury [55,56]. Other examples are sangliferrin A [57] and, more recently, NIM811 [58] and octylguanidine [59].

II. OXIDATIVE STRESS

ROS have long been recognized to cause oxidative protein modification and to be major mediators of reperfusion injury [60]. Myocardial oxidative stress is generated by various enzymes, e.g., NADPH oxidases (NOXs), xanthine oxidase (XO), mitochondrial electron transport chain complexes, and NOS (nitric oxide synthase). Free radical scavenging enzymes, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidases (GPx), are known to be the first line of cellular defense against oxidative damage, removing $\text{O}_2^{\cdot -}$ and H_2O_2 prior to their interaction to form the

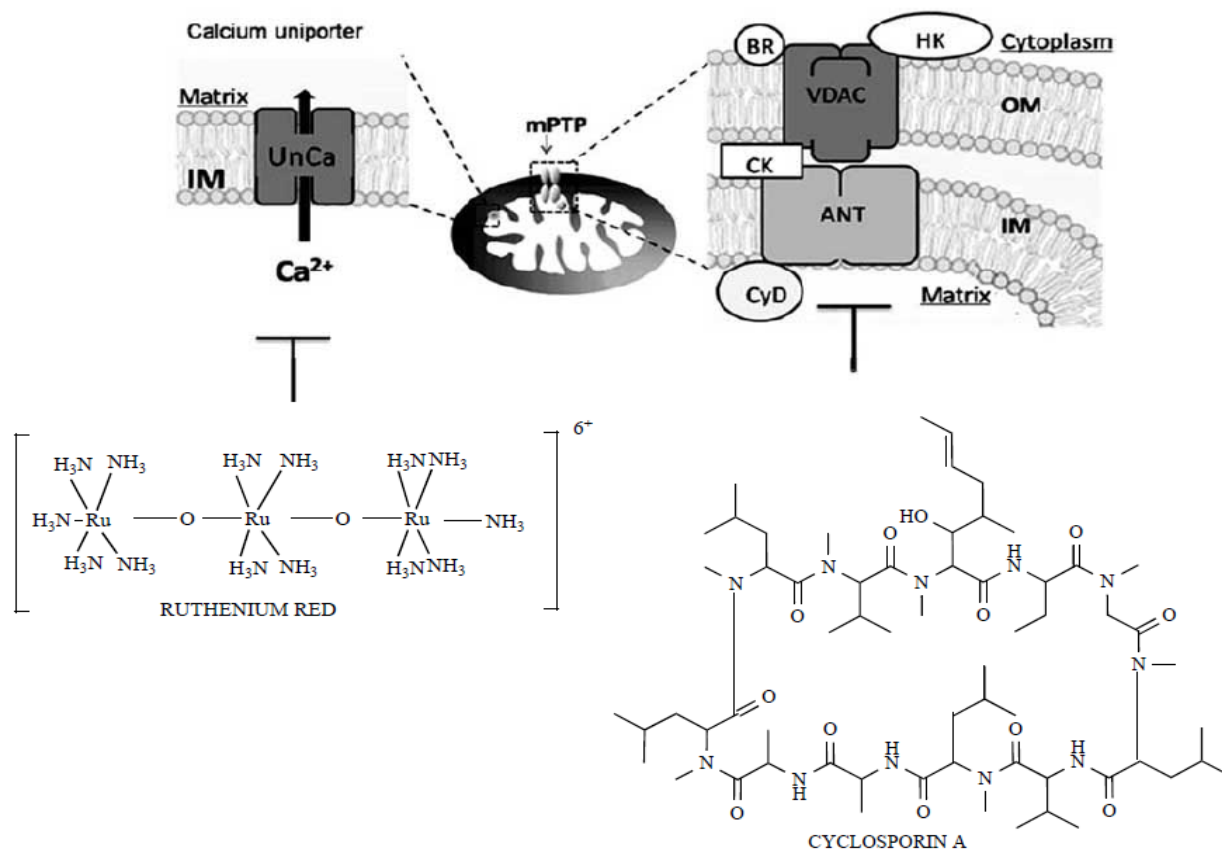


Fig. (4). Chemical regulation of calcium transport in mitochondria from reperfused heart. Ruthenium compounds inhibit calcium uniporter (UnCa) with high affinity, preventing from calcium overload and, thereby, avoiding mPTP opening. Another strategy to maintain heart function after reperfusion is by inhibiting the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). The chemical structure of both compounds and the main components of the mPTP are shown. OM, outer membrane; IM, inner membrane; VDAC, voltage-dependent anion channel; ANT, adenine nucleotide translocator; CK, creatine kinase; CyD, cyclophilin D; HK, hexokinase; BR, benzodiazepine receptor.

more harmful hydroxyl (OH^\bullet) radical. Reduced glutathione is one of the most abundant non-enzymatic antioxidant biomolecules found in tissues [61]. Its functions are removal of free oxygen species such as H_2O_2 , superoxide anions and alkoxy radicals, maintenance of membrane protein thiols, and to act as a substrate for GPx and glutathione *S*-transferase (GST) [62]. As mentioned, it is agreed that an imbalance between the production and removal of ROS might contribute to the functional damage resulting from ischemia and reperfusion.

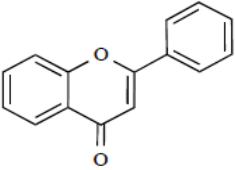
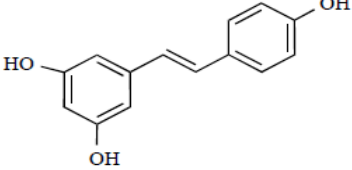
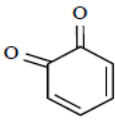
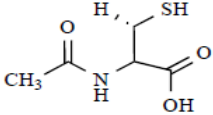
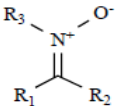
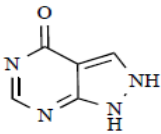
II.1. Reactive Oxidative Species Scavengers

Many free radical scavengers have been used to contend against reperfusion injury in animal models. Melatonin, which at 100 μM significantly reduces the duration of ventricular tachycardia and ventricular fibrillation in isolated reperfused hearts, is an example of an endogenously produced antioxidant. Its cardioprotective effects has been associated to a significant reduction of OH^\bullet generation [63] and to stimulation of gene expression and activities of the superoxide dismutases, catalase and glutathione peroxidase (GPx) [64, 65]. It also increases the levels of glutathione, an impor-

tant intracellular antioxidant, by stimulating its rate-limiting enzyme, gamma-glutamylcysteine synthetase [66]. The efficacy of melatonin was compared with that of another free radical scavenger, i.e., vitamin C. At a concentration of 500 μM , vitamin C was significantly less effective than melatonin in preventing the cardiac arrhythmias in an ischemia reperfusion rat model [67].

Exogenous compounds have also been used to scavenge reactive oxygen species in the reperfused heart (Table 1). The flavonoids, catechin, baicalein, and procyanidin B2, react preferentially with superoxide, whereas baicalein scavenges the hydroxyl radical [68]. Flavonoids also inhibit the activity of xanthine oxidase and reinforce cellular antioxidant capacity [69]. Some of them, like quercetin, myricetin, and delphinidin, protect the heart from ischemia-reperfusion injury by their capacity to inhibit STAT1 (signal transducer and activator of transcription-1) that has been proposed to be a general molecular target for antioxidants in the ischemic myocardium [70]. Resveratrol, a polyphenol with antioxidant properties, exerts cardioprotective effects by multiple mechanisms, it scavenges hydroxyl radicals with a reaction rate constant of $9.45 \times 10^8 \text{ M}^{-1}\cdot\text{sec}^{-1}$ [71]; it also reacts with

Table 1. Exogenous Scavengers Used in Reperfusion Protocols. The Chemical Structure and the Proposed Mechanism of Action are Depicted

Name	Structure	Action mechanism	References
Flavonoids: Flavone backbone		Scavengers of transition metals and ROS. Inhibitors of xanthine oxidase and restorers of antioxidant capacity	[68-70]
Polyphenols: Resveratrol		Antioxidant activity: Scavengers of hydroxyl radical and superoxide anion. Inhibitor of xanthine oxidase Upregulation of NO	[71-74]
Ubiquinones: 1,2 Benzoquinone		Electron carriers	[121, 122]
Thiol reagents: N-acetyl-cysteine		Reducers of disulfide bonds formed within proteins.	[123, 124]
Nitrones: PBN (phenyl N-tert-butyl nitron)		Scavengers of superoxide and hydroxyl radicals.	[125, 126]
Allopurinol		Inhibitor of Xanthine Oxidase	[127, 128]

superoxide anions and inhibits xanthine oxidase [72]. On the other hand, resveratrol increases nitric oxide (NO) synthesis that directly neutralizes superoxide radicals. In the ischemic-reperfused heart, resveratrol induces NO synthesis and lowers oxidative stress [73]. Resveratrol also scavenges peroxy and hydroxyl radicals in the reperfused myocardium, lowering malonaldehyde formation [74] and upregulating the activity of catalase in the myocardium [75].

In a global ischemia model, rat hearts treated with N-acetyl-cysteine (NAC) showed attenuation in malondialdehyde content and an increment in the relation glutathione redox potential [76], suggesting that thiol-compounds could be part of the potent defense systems against ischemia-reperfusion. In clinical trials, the administration of NAC during thrombolysis has been related with reduction in the infarct size and preservation of left ventricular function [77].

Several questions in this field remain to be answered; for example, the observation that ROS signaling may trigger delayed cardioprotection. To this respect, ROS generation was found to be protective when acetylcholine, bradykinin,

opioids, and phenylephrine were administered prior to ischemia. As indicated by Gross & Gross [29], the agents that generate an initial burst of ROS, activating cardioprotective pathways that neutralize further ROS generation during reperfusion, must be re-examined in different animal species with different free radical scavenging mechanisms to determine whether ROS can trigger cardioprotective signaling events.

III. METABOLIC THERAPY

III.1. Glucose-Insulin-Potassium

Metabolic modulation with glucose-insulin-potassium (GIK) in acute myocardial infarction (AMI) has a long and controversial history. Originally, GIK therapy intended to prevent intra-myocardial hypokalemia during ischemia and reperfusion, but now it is mainly advocated to diminish hyperglycemia and hyperlipidemia. It has been suggested that contradictory results in clinical trials depend on glucose levels after GIK infusion and that impairment of myocardial

activation of PI 3-kinase-Akt signaling by glucose could be one of the involved mechanisms [78]. As it is known that hyperglycemia can induce oxidative stress and increase the generation of free radicals and pro-inflammatory cytokines in cardiomyocytes, some research groups have evaluated the effect of GIK supplemented with antioxidants or anti-inflammatory compounds, obtaining additive protective effects in ischemia-reperfusion injury [79].

III.2. Adenosine

Four adenosine receptor subtypes are present in the heart: A₁, A_{2A}, A_{2B}, and A₃. Evidence from genetically modified mice suggests that the A₁ and A₃ receptors may contribute to cardioprotection, since overexpression of either receptor improved functional recovery from ischemia [80]. Besides, the A₁ receptor agonist GR79236 (N-[1S, (trans)-2-hydroxycyclopentyl] adenosine) and the A₃ agonist 2-chloro-IB-MECA (CLIB-MECA) reduce infarct size in pigs [81] and in rats [82], respectively, when administered before reperfusion. The adenosine A_{2A} receptor agonist, CGS21680, also diminishes infarct size in rabbits [83] and reduces post-ischemic inflammation [84]. Preliminary results of a clinical trial indicate that adenosine administration before, during, and after aortic clamping reduces the incidence of perioperative infarction [85]. Despite the relevance of adenosine as a cardioprotective molecule, the main contribution of each of the adenosine receptor subtypes to cardioprotection during ischemia and/or reperfusion has to be defined.

IV. SIGNALING CASCADE INHIBITORS

During ischemia, signal transduction mechanisms, including the complex mitogen activated protein kinase (MAPK), are activated. This evolutionary conserved pathway involves the control of many fundamental cellular processes such as apoptosis [86, 87]. Reactive oxygen species produced during reperfusion activate the p38 MAPK α -isoform [88] and the JNK pathways resulting in cellular death [89]. In fact, the selective inhibitor of p38 MAPK, SB 203580, has been shown to reduce the number of apoptotic cells in neonatal cardiac myocytes [90].

Pando *et al.* [91] demonstrated that S-farnesyl thiosalicylic acid (FTS, Salirasib), an effective inhibitor of Ras signaling, reduced heart damage during reperfusion. This group also showed that the inhibition of Ras caused a significant and short-term decrease in JNK expression. JNK diminution has been associated with heart recovery after reperfusion by other groups [92]. Erythropoietin attenuates reperfusion myocardial injury by a mechanism that involves the activation of NF κ B, followed by the opening of K_{ATP} channels. The administration of glibenclamide, a selective K_{ATP} channel blocker, abolished the cardioprotective effects of erythropoietin [33].

Apelin, an endogenous ligand of the orphaned G protein-coupled receptor APJ, has been also used to reduce myocardial reperfusion injury. Apelin is widely represented in the heart and vasculature, it has the ability to enhance myocardial contractility in rats [93, 94]. This effect is independent from angiotensin II, endothelin-1, catecholamines, and nitric oxide release [95], but seems to involve the activation of the

sarcolemmal Na⁺/H⁺ exchanger (NHE), probably through phospholipase C and protein kinase C-dependent pathways. The cardiovascular profile of the apelin-APJ system makes it an attractive therapeutic prospect for preserving myocardial function in the face of chronic cardiac stress and to grant protection during acute myocardial injury (reviewed in [96]). Other signaling pathways that seem to play central roles in myocyte damage are the protein kinase C (PKC) signaling cascades. PKC ϵ has been considered the main player in cardioprotective pathways [97], but recent studies demonstrated, for the first time, that PKC δ inhibition also protects the human myocardium *ex vivo* from ischemic-reperfusion injury [98]. Interestingly, PKC δ is translocated to mitochondrion in response to ROS signaling. Therefore, it has been suggested that activated PKC δ may have direct effects on protein substrates involved in mitochondrial energetics, pH regulation, and in apoptosis [99].

V. ANTI-APOPTOTIC THERAPY

Necrotic cell death was a hallmark of reperfusion damage until 1994, when an additional type of death was described in isolated heart [100]. Nucleosomal DNA fragmentation was reported and, since then, other apoptotic events have been described associated to reperfusion damage, including TNF- α release, caspases activation, and cytochrome c release from mitochondria. Mitochondrial apoptotic signaling is regulated by different mechanisms. Detailed description of the mitochondrial pathway activation in reperfusion-induced apoptosis (RIA) is out of the scope of this review; however, Fig. (5) summarizes the main events occurring in the cell to achieve this activation.

V.1. Cytochrome c Release Inhibitors

Two different pores have been described as pathways for cytochrome c release (reviewed in [101]). The first one is the mitochondrial apoptosis-induced channel (MAC) formed by Bax and VDAC proteins [102]. There are reports indicating that only Bax-forming channels could account for cytochrome c release [103]. In this sense, the contribution of Bax channels to cytochrome c release after reperfusion has been explored by Bombrun *et al.* [104].

A second possible pathway described for cytochrome c release is the mitochondrial permeability transition pore (mPTP). The classical accepted components of the mPTP are the voltage-dependent anion channel (VDAC) in the outer membrane (OM), the adenine nucleotide translocator (ANT) in the inner membrane, and cyclophilin D (CypD) in the mitochondrial matrix [105]. These proteins could be assembled into a continued unspecific channel, promoting mitochondrial swelling, OM rupture, and pro-apoptotic proteins release [106]. It has been demonstrated that the mPTP participates in post-ischemic apoptotic signaling [107, 108]. Accordingly, cyclosporine A (CSA) preserved heart function after reperfusion [109]. Recently, apoptosis activation during ischemia and reperfusion was inhibited *in vivo* [110]. The protective effect of CSA has been related to its interaction with cyclophilin in the matrix, preventing the binding of this peptidyl-prolyl *cis-trans*- isomerase with ANT and the establishment of the "open pore" conformation [111]. Other in-

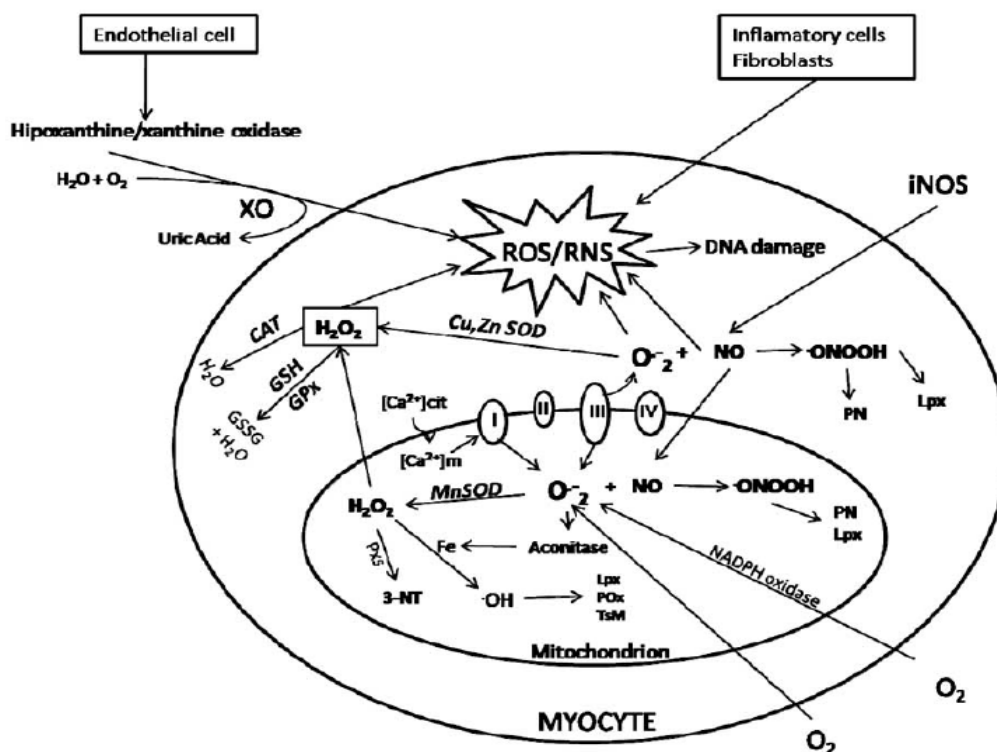


Fig. (5). Oxidative stress and antioxidant response in the ischemic-reperfused heart. Reactive oxygen species and reactive nitrogen species (ROS/RNS) are produced by endothelial, inflammatory cells and fibroblasts. Inside the cells, ROS is mainly produced by mitochondria. NO, nitric oxide; ONOO⁻, peroxynitrite anion; O₂⁻, superoxide anion; H₂O₂, hydrogen peroxide; XO, xanthine oxidase; CAT, catalase; GPx, glutathione peroxidase; SOD, superoxide dismutase; iNOS, inducible nitric oxide synthase; I, II, III, IV, Respiratory Complexes; Lpx, lipoperoxidation; PN, protein nitration; TSM, thiols modification; 3-NT; 3-nitrotyrosine; Pxs, peroxidases; Pox, protein oxidation.

inhibitors of the mPTP, like NIM811, also provide full protection against necrotic and apoptotic activation in a rabbit model of ischemia/reperfusion [58].

V.2. Ceramide Pathway Inhibitors

Ceramide increases in the ischemic-reperfused myocardium as the result of the activation of the membrane-associated sphingomyelinase [112]. Ceramide is translocated to mitochondrion by an unknown mechanism, inducing hydrogen peroxide generation [113]. Besides, it has been demonstrated that ceramide has pore-forming properties that could account for an alternative pathway for cytochrome c release [114]. Argaud *et al.* [115] demonstrated that administration of the sphingomyelinase blocker, tricyclodecan 9 γ -xanthate (D609), reduces ceramide increase and diminishes apoptotic markers in an *in vivo* model of ischemia reperfusion.

V.3. Caspases Inhibitors

Contradictory results about caspase inhibition and myocardial function recovery have been reported in different models of myocardial ischemia and reperfusion. On one hand, Grunenfelder *et al.* [116] reported that caspase 3-specific inhibitor DEVD-CHO diminished reperfusion injury and up-regulated Bcl-2 expression in transplanted rat hearts, without affecting cytochrome c release. Other reports indi-

cate that these inhibitors reduced infarct size and cardiomyocyte positive TUNEL staining, but did not improve myocardial function in rats [117]. Broad-spectrum caspase inhibitors do not reduce infarct size, but reduce post-infarct ventricular remodeling myocardial infarction in pigs [118]. Finally, in an isolated rabbit model of ischemia-reperfusion and in cardiomyocytes, the non-peptidic caspase 3/7 inhibitor (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl) sulfonyl] isatin (MMPST) significantly reduced infarct size and reduced simulated ischemia-reperfusion-induced apoptosis [119].

CONCLUDING REMARKS

A large amount of experimental drugs and protocols against ischemia and reperfusion have been accumulated over the years. However, many of them did not match the approaches that show promising results in clinical evaluations. The failed clinical trials are reflected by the poor track record for cardioprotective drugs in the literature as a whole, although excellent revisions of antioxidant-based strategies, cascade signaling inhibitors, mitochondrial therapy, and Na⁺/H⁺ regulation have been published.

In this review, we present several chemical approaches that have been used in *ex vivo* and *in vivo* animal models, as well as in clinical trials, to improve the recovery of the post-ischemic heart. We also describe the chemical interaction between some of these agents and their molecular targets. As

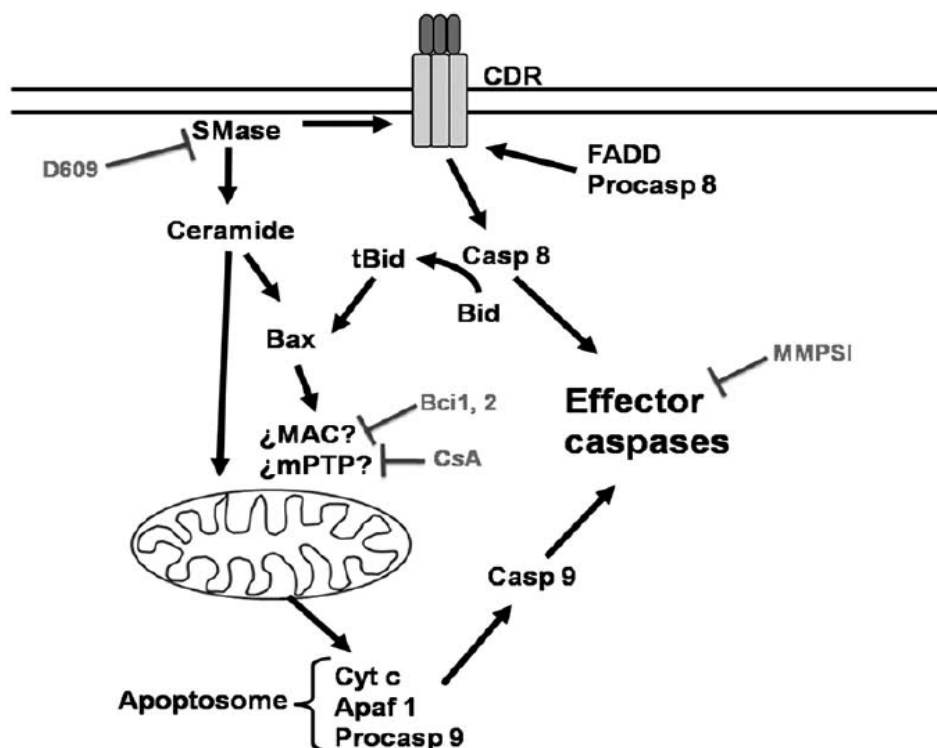


Fig. (6). Mitochondrial death pathway. Activation of cell death receptor (CDR) induces the recruitment of cytosolic proteins, like the adaptor protein FADD (Fas-associated dead domain) and pro-caspase 8. The association of these proteins results in caspase 8 release as an active caspase, whose substrates are either the Bcl-2 family member Bid, or effector caspases. Activated Bid (tBid) induces cytosolic Bax redistribution to the mitochondrial outer membrane. There, Bax promotes cytochrome c (Cyt c) release through the activation of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP) and/or through the mitochondrial apoptosis-activated channel (MAC). Membrane associated sphingomyelinases (SMase) are activated by CDR, releasing ceramide from sphingomyelin hydrolysis. Ceramide reaches mitochondria inducing cytochrome c release by itself or activating Bax. Once in the cytosol, cytochrome c forms the apoptosome along with Apaf-1, pro-caspase 9, and dATP. Pro-caspase 9 subunits are auto-activated and subsequently activate effector caspases producing apoptosis amplification and cell dismantling. In gray, are shown some compounds that interact with apoptotic targets.

shown, the diversity of intracellular pathways linked to reperfusion damage provides, in many cases, redundancy in the cardioprotective response. This demonstrates that intricate relationships exist among different mechanisms. To this respect, more basic studies are needed to establish the connection among these mechanisms; for example, between calcium homeostasis and ROS production, or between mK_{ATP} channels and mPTP opening. In addition, knowing how the opening of the mK_{ATP} channel could protect cardiomyocytes against post-ischemic injury is another pending issue.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by grant 80791-M to C. Zazueta, grant 090742 to F. Correa, and grant 82709 to N. García, from the National Council of Science and Technology (CONACYT), Mexico.

REFERENCES

- [1] Forman, M.; Virmani, R.; Puett, D. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation*, **1990**, *81*, 69-78.
- [2] Hearse, D.; Bolli, R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms and clinical relevance. *Cardiovasc. Res.*, **1992**, *26*, 101-8.
- [3] Zhao, Z.; Corvera, J.; Halkos, M.; Kerendi, F.; Wang, N.; Guyton, R.; Vinten-Johansen, J. Inhibition of myocardial injury by ischemic post-conditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **2003**, *285*, H579-88.
- [4] Statt, P.; Rioufol, G.; Piot, C.; Cottin, Y.; Tri-Cung, T.; L'Huillier, I.; Aupetit, J.; Bonnefory, E.; Finet, G.; Andre-Fouet, X.; Ovize, M. Postconditioning the human heart. *Circulation*, **2005**, *112*, 2143-48.
- [5] Krause, E.G.; Bartel, S.; Beyerdörfer, I.; Freier, W.; Gerber, K.; Obst, D. Transient changes in cyclic AMP and in the enzymic activity of protein kinase and phosphorylase during the cardiac cycle in the canine myocardium and the effect of propranolol. *Mol. Cell. Biochem.*, **1989**, *89*, 181-86.
- [6] Temsah, R.M.; Netticadan, T.; Chapman, D.; Takeda, S.; Mochizuki, S.; Dhalla, N.S. Alterations in sarcoplasmic reticulum function and gene expression in ischemic-reperfused rat heart. *Am. J. Physiol.*, **1999**, *277*, H584-94.
- [7] Makazan, Z.; Saini, H.; Dhalla, N. Role of oxidative stress in alterations of mitochondrial function in ischemic-reperfused hearts. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2007**, *292*, H1986-94.
- [8] He, M.; Bodi, I.; Mikala, G.; Schwartz, A. Motif III55 of L-type calcium channels is involved in the dihydropyridine binding site. A combined radioligand binding and electrophysiological study. *J. Biol. Chem.*, **1997**, *272*, 2629-33.
- [9] Huber, I.; Wappler-Kornherr, E.; Sinnegger-Brauns, M.; Hoda, J.C.; Walter-Bastl, D.; Striessnig, J. Opposite Effects of a Single III55 Mutation on Phenylalkylamine and Dihydropyridine Interaction with L-type Ca^{2+} Channels. *J. Biol. Chem.*, **2004**, *279*, 55211-17.

- [10] Hammerman, H.; Kloner, R.A.; Briggs, L.L.; Braunwald, E. Enhancement of salvage of reperfused myocardium by early beta adrenergic blockade (timolol). *J. Am. Coll. Cardiol.*, **1984**, *3*, 1438-1443.
- [11] Kametani, R.; Miura, T.; Harada, N.; Shibuya, M.; Wang, R.; Tan, H.; Fukagawa, Y.; Kawamura, S.; Matsuzaki, M. Carvedilol inhibits mitochondrial oxygen consumption and superoxide production during calcium overload in isolated heart mitochondria. *Circ. J.*, **2006**, *70*, 321-26.
- [12] Oliveira, P.J.; Bjork, J.A.; Santos, M.S.; Leino, R.L.; Froberg, M.K.; Moreno, A.J.; Wallace, K.B. Carvedilol-mediated antioxidant protection against doxorubicin-induced cardiac mitochondrial toxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **2004**, *200*, 159-68.
- [13] Kimura-Kurosawa, S.; Kanaya, N.; Kamada, N.; Hirata, N.; Nakayama, M.; Namiki, A. Cardioprotective effect and mechanism of action of landiolol on the ischemic reperfused heart. *J. Anesth.*, **2007**, *21*, 480-89.
- [14] Cherezov, V.; Rosenbaum, D.; Hanson, M.; Rasmussen, S.; Thian, F.; Kobilka, T.; Choi, H.; Kuhn, P.; Weis, W.; Kobilka, B.; Stevens, R. High-resolution crystal structure of an engineered human β_2 -adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **2007**, *318*, 1258-65.
- [15] Shukla, A.; Sung, J.; Lefkowitz, R. Crystallizing thinking about the β_2 -Adrenergic Receptor. *Mol. Pharmacol.*, **2008**, *73*, 1333-38.
- [16] Strader, C.D.; Candelore, M.R.; Hill, W.S.; Dixon, R.A.; Sigal, I.S. A single amino acid substitution in the β -adrenergic receptor promotes partial agonist activity from antagonists. *J. Biol. Chem.*, **1988**, *264*, 16470-77.
- [17] Mullins, L.J. Ion transport in the heart. New York: Raven Press, **1981**.
- [18] Geraldès, C.; Castro, M.; Sherry, D.; Ramasamy, R. Influence of vanadate on glycolysis, intracellular sodium, and pH in perfused rat hearts. *Mol. Cell Biochem.*, **1997**, *170*, 53-64.
- [19] Takeda, S.; Prajapati, D.; Mochizuki, S.; Elimban, V.; Dhalla, N.S. Attenuation of ischemia-reperfusion induced changes in cardiac performance and sarcoplasmic reticulum function by vanadate. *Exp. Clin. Cardiol.*, **2003**, *8*, 134-38.
- [20] Knight, D.R.; Smith, A.H.; Flynn, D.M.; MacAndrew, J.T.; Ellery, S.S.; Kong, J.X.; Marala, R.B.; Wester, R.T.; Guzman-Perez, A.; Hill, R.J.; Magee, W.P.; Tracey, W.M. A novel sodium hydrogen exchanger isoform 1 inhibitor, zoniporide, reduces ischemic myocardial injury *in vitro* and *in vivo*. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **2001**, *297*, 254-59.
- [21] Klein, H.; Pich, S.; Bohle, R.; Lindert-Heimberg, S.; Nebendahl, K. Na⁺/H⁺ exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation*, **2000**, *102*, 1977-82.
- [22] Yoshizumi, M.; Kitagawa, T.; Masuda, Y.; Horike, K.; Ogawa, Y.; Suzuki, Y.; Tamaki, T.; Katoh, I. Effect of amiloride on ischemia and reperfusion injury in isolated perfused hearts. *Scand. Cardiovasc. J.*, **1998**, *32*, 167-72.
- [23] Murtazina, R.; Booth, B. J.; Bullis, B. L.; Singh, D. N.; Fliegel, L. Functional analysis of polar amino-acid residues in membrane associated regions of the NHE1 isoform of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger. *Eur. J. Biochem.*, **2001**, *268*, 4674-85.
- [24] Khadilkar, A.; Iannuzzi, P.; Orlowski, J. Identification of sites in the second exomembrane loop and ninth transmembrane helix of the mammalian Na⁺/H⁺ exchanger important for drug recognition and cation translocation. *J. Biol. Chem.*, **2001**, *276*, 43792-800.
- [25] Pedersen, S.F.; King, S.A.; Nygaard, E.B.; Rigor, R.R.; Cala, P.M. NHE1 inhibition by amiloride- and benzoylguanidine-type compounds. Inhibitor binding loci deduced from chimeras of NHE1 homologues with endogenous differences in inhibitor sensitivity. *J. Biol. Chem.*, **2007**, *282*, 19716-27.
- [26] Prendes, M.G.; Torresin, E.; González, M.; Fernández, M.A.; Perazzo, J.C.; Savino, E.A.; Varela, A. Protection of ischaemic-reperfused rat heart by dimethylamiloride is associated with inhibition of mitochondrial permeability transition. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*, **2008**, *35*, 201-6.
- [27] Hattori, R.; Otani, H.; Moriguchi, Y.; Matsubara, H.; Yamamura, T.; Nakao, Y.; Omiya, H.; Osako, M.; Imamura, H. NHE and ICAM-1 expression in hypoxic/reoxygenated coronary microvas-
- cular endothelial cells. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2001**, *280*, H2796-803.
- [28] Chen, L.; Chen, C.X.; Gan, X.T.; Beier, N.; Scholz, W.; Karmazyn, M. Inhibition and reversal of myocardial infarction-induced hypertrophy and heart failure by NHE-1 inhibition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2004**, *286*, H381-87.
- [29] Gross, E.; Gross, G.J. Ligand triggers of classical preconditioning and postconditioning. *Cardiovasc. Res.*, **2006**, *70*, 212-221.
- [30] Zeymer, U.; Suryapranata, H.; Monassier, J.P.; Opolski, G.; Davies, J.; Rasmanis, G.; Linssen, G.; Tebbe, U.; Schroder, R.; Tiemann, R.; Machnig, T.; Neuhaus, K.L. ESCAMI Investigators. The Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchange inhibitor eniporide as an adjunct to early reperfusion therapy for acute myocardial infarction. Results of the evaluation of the safety and cardioprotective effects of eniporide in acute myocardial infarction (ESCAMI) trial. *J. Am. Coll. Cardiol.*, **2001**, *3*, 1644-1650.
- [31] Fujita, A.; Kurachi, Y.; Molecular aspects of ATP-sensitive K⁺ channels in the cardiovascular system and K⁺ channel openers. *Pharmacol. Ther.*, **2000**, *85*, 39-53.
- [32] Das, B.; Sarkar, C. Cardiomyocyte mitochondrial K_{ATP} channels participate in the anti-arrhythmic and anti-infarct effects of K_{ATP} activators during ischemia and reperfusion in an intact anesthetized rabbit model. *Pol. J. Pharmacol.*, **2003**, *55*, 771-86.
- [33] Diwan, V.; Kant, R.; Jaggi, A.S.; Singh, N.; Singh, D. Signal mechanism activated by erythropoietin preconditioning and remote renal preconditioning-induced cardioprotection. *Mol. Cell. Biochem.*, **2008**, *315*, 195-201.
- [34] Pauczek, P.; Mironova, G.; Mahdi, F.; Beavis, A.D.; Woldegiorgis, G.; Garlid, K.D. Reconstitution and partial purification of the glibenclamide sensitive, ATP-dependent K_v channel from rat liver and beef heart mitochondria. *J Biol Chem.*, **1992**, *267*, 26062-69.
- [35] Suzuki, M.; Kotake, K.; Fujikura, K.; Inagaki, N.; Suzuki, T.; Gono, T.; Seino, S.; Takata, K. Kir6.1: a possible subunit of ATP-sensitive K_v channels in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1997**, *241*, 693-97.
- [36] Szweczyk, A.; Wojcik, G.; Lobanov, N.A.; Nalecz, M.J. The mitochondrial sulfonylurea receptor: identification and characterization. *Biochem Biophys Res Commun.* **1997**, *230*, 611-15.
- [37] Liu, Y.; Ren, G.; O'Rourke, B.; Marbán, E.; Seharaseyon, J. Pharmacological comparison of native mitochondrial K_{ATP} channels with molecularly defined surface K_{ATP} channels. *Mol. Pharmacol.*, **2001**, *59*, 225-30.
- [38] Seharaseyon, J.; Ohler, A.; Sasaki, N.; Fraser, H.; Sato, T.; Johns, D.C.; O'Rourke, B.; Marbán, E. Molecular composition of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels probed by viral Kir gene transfer. *J. Mol. Cell Cardiol.*, **2000**, *32*, 1923-1930.
- [39] Ye, B.; Kroboth, S. L.; Pu, J.; Sims, J.J.; Aggarwal, N.; McNally, E.; Makielski, J.; Shi, N. Molecular identification and functional characterization of a mitochondrial sulfonylurea receptor 2 splice variant generated by intraexonic splicing. *Circ. Res.*, **2009**, *105*, 1083-1093.
- [40] Hajnóczky, G.; Csordás, G.; Madesh, M.; Pacher, P. Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals. *Cell. Calcium*, **2000**, *28*, 349-63.
- [41] Garcia-Pérez, C.; Hajnóczky, G.; Csordás, G. Physical coupling supports the local Ca²⁺ transfer between sarcoplasmic reticulum subdomains and the mitochondria in heart muscle. *J. Biol. Chem.*, **2008**, *283*, 32771-80.
- [42] Miyata, H.; Lakatta, E.G.; Stern, M.D.; Silverman, H.S. Relation of mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circ. Res.*, **1992**, *71*, 605-13.
- [43] Miyamae, M.; Camacho, S.A.; Weiner, M.W.; Figueredo, V.M. Attenuation of posts ischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca²⁺]_i overload in rat hearts. *Am. J. Physiol.*, **1996**, *271*, H2145-53.
- [44] Garcia-Rivas, G. de J.; Guerrero-Hernández, A.; Guerrero-Serna, G.; Rodríguez-Zavala, J.S.; Zazueta, C. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear ruthenium amine complex (Ru₃₆₀) prevents from irreversible injury in posts ischemic rat heart. *FEBS J.*, **2005**, *272*, 3477-88.
- [45] Akar, F.G.; Aon, M.A.; Tomaselli, G.F.; O'Rourke, B. The mitochondrial origin of posts ischemic arrhythmias. *J. Clin. Invest.*, **2005**, *115*, 3527-35.

- [46] Garcia-Rivas, G. de J.; Carvajal, K.; Correa, F.; Zazueta, C. Ru₃₆₀, a specific mitochondrial calcium uptake inhibitor, improves cardiac post-ischaemic functional recovery in rats *in vivo*. *Br. J. Pharmacol.*, **2006**, *149*, 829-37.
- [47] Wang, Y.; Kudo, M.; Xu, M.; Ayub, A.; Ashraf, M. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2001**, *33*, 2037-46.
- [48] Garlid, K.D.; Paucek, P.; Yarov-Yarovoy, V.; Murray, H.N.; Darbenzio, R.B.; D'Alonzo, A.J.; Lodge, N.J.; Smith, M.A.; Grover, G.J. Cardioprotective effect of diazoxide and its interaction with mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels. Possible mechanism of cardioprotection. *Circ. Res.*, **1997**, *81*, 1072-82.
- [49] Hausenloy, D.J.; Yellon, D.M.; Mani-Babu, S.; Duchon, M.R. Preconditioning protects by inhibiting the mitochondrial permeability transition. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2004**, *287*, H841-49.
- [50] Fryer, R.M.; Eells, J.T.; Hsu, A.K.; Henry, M.M.; Gross, G.J. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2000**, *278*, H305-12.
- [51] Ferrari, R.; di Lisa, F.; Raddino, R.; Visioli, O. The effects of ruthenium red on mitochondrial function during post-ischaemic reperfusion. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **1982**, *14*, 737-40.
- [52] Carry, M.M.; Mrak, R.E.; Murphy, M.L.; Peng, C.F.; Straub, K.D.; Fody, E.P. Reperfusion injury in ischemic myocardium: protective effects of ruthenium red and of nitroprusside. *Am. J. Cardiovasc. Pathol.*, **1989**, *2*, 335-44.
- [53] Balazs, T.; Herman, E.H.; Earl, F.L.; Wolff, F.W. Cardiotoxicity studies with diazoxide, reserpine, guanethidine, and combinations of diazoxide and propranolol in dogs. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **1975**, *33*, 498-504.
- [54] Belmar, E.; Garcia-Ugalde, G.; Tapia, R. Motor alterations and neuronal damage induced by intracerebral administration of ruthenium red: effect of NMDA receptor antagonists and other anticonvulsant drugs. *Mol. Chem. Neurobiol.*, **1995**, *26*, 285-99.
- [55] Arteaga, D.; Odor, A.; López, R.M.; Contreras, G.; Pichardo, J.; Garcia, E.; Aranda, A.; Chávez, E. Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sci.*, **1992**, *51*, 1127-34.
- [56] Duchon, M.R.; McGuinness, O.; Brown, L.A.; Crompton, M. On the involvement of a cyclosporin A sensitive mitochondrial pore in myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **1993**, *27*, 1790-94.
- [57] Clarke, S.J.; McStay, G.P.; Halestrap, A.P. Sangliferin A acts as a potent inhibitor of the mitochondrial permeability transition and reperfusion injury of the heart by binding to cyclophilin-D at a different site from cyclosporin A. *J. Biol. Chem.*, **2002**, *277*, 34793-99.
- [58] Argaud, L.; Gateau-Roesch, O.; Muntean, D.; Chalabreysse, L.; Loufouat, J.; Robert, D.; Ovize, M. Specific inhibition of the mitochondrial permeability transition prevents lethal reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2005**, *38*, 367-74.
- [59] Parra, E.; Cruz, D.; Garcia, G.; Zazueta, C.; Correa, F.; Garcia, N.; Chávez, E. Myocardial protective effect of octylguanidine against the damage induced by ischemia reperfusion in rat heart. *Mol. Cell. Biochem.*, **2005**, *269*, 19-26.
- [60] Ambrosio, G.; Flaherty, J.T.; Duilio, C.; Triotto, I.; Santoro, G.; Elia, P.P.; Condorelli, M.; Chiariello, M. Oxygen radicals generated at reflow induce peroxidation of membrane lipids in reperfused hearts. *J. Clin. Invest.*, **1991**, *87*, 2056-66.
- [61] Meister, A. New developments in glutathione metabolism and their potential application in therapy. *Hepatology*, **1984**, *4*, 739-42.
- [62] Townsend, D.M.; Tew, D.K. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. *Oncogene*, **2003**, *22*, 7369-75.
- [63] Kaneko, S.; Okumura, K.; Numaguchi, Y.; Matsui, H.; Murase, K.; Mokuno, S.; Morishima, I.; Hira, K.; Toki, Y.; Ito, T.; Hayakawa, T. Melatonin scavenges hydroxyl radical and protects isolated rat hearts from ischemic reperfusion injury. *Life Sci.*, **2000**, *67*, 101-12.
- [64] Okatani, Y.; Wakatsuki, A.; Shinohara, K.; Kaneda, C.; Fukaya, T. Melatonin stimulates glutathione peroxidase activity in human chorion. *J. Pineal Res.*, **2001**, *30*, 199-205.
- [65] Reiter, R.J.; Tan, D.X.; Osuna, C.; Gitto, L. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. *J. Biomed. Sci.*, **2001**, *7*, 444-58.
- [66] Reiter, R.J.; Tan, D.X. Melatonin: a novel protective agent against oxidative injury of the ischemic/reperfused heart. *Cardiovasc. Res.*, **2003**, *58*, 10-19.
- [67] Tan, D.X.; Manchester, L.C.; Reiter, R.J.; Qi, W.; Kim, S.J.; El-Sokkary, G.H. Ischemia/reperfusion-induced arrhythmias in the isolated rat heart: Prevention by melatonin. *J. Pineal Res.*, **1998**, *25*, 184-91.
- [68] Chang, W.T.; Shao, Z.H.; Yin, J.J.; Mehendale, S.; Wang, C.Z.; Qin, Y.; Li, J.; Chen, W.J.; Chien, C.T.; Becker, L.B.; Vanden-Hoek, T.L.; Yuan, C.S. Comparative effects of flavonoids on oxidant scavenging and ischemia-reperfusion injury in cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, **2007**, *566*, 58-66.
- [69] Akhlaghi, M.; Bandy, B. Mechanisms of flavonoid protection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **2009**, *46*, 309-17.
- [70] Scarabelli, T.M.; Mariotto, S.; Abdel-Azeim, S.; Shoji, K.; Darra, E.; Stephanou, A.; Chen-Scarabelli, C.; Marechal, J.D.; Knight, R.; Ciampa, A.; Saravolatz, L.; de Patri, A.C.; Yuan, Z.; Cavalieri E.; Menegazzi, M.; Latchman, D.; Pizza, C.; Perahia, D.; Suzuki, H. Targeting STAT1 by myricetin and delphinidin provides efficient protection of the heart from ischemia/reperfusion-induced injury. *FEBS Lett.*, **2009**, *583*, 531-41.
- [71] Leonard, S.; Xia, C.; Jiang, B.H.; Stinefelt, B.; Klandorf, H.; Harris, D.K.; and Shi, X. Resveratrol scavenges reactive oxygen species and affects radical-induced cellular responses. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **2003**, *309*, 1017-26.
- [72] Jia, Z.; Zhu, H.; Misra, B.R.; Mahaney, J.E.; Li, Y.; Misra, H.P. EPR studies on the superoxide-scavenging capacity of the nutraceutical resveratrol. *Mol. Cell. Biochem.*, **2008**, *313*, 187-94.
- [73] Hattori, R.; Otani, H.; Maulik, N.; Das, D.K. Pharmacological preconditioning with resveratrol: role of nitric oxide. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2002**, *282*, H1988-95.
- [74] Shen, M.; Jia, G.L.; Wang, Y.M.; Ma, H. Cardioprotective effect of resveratrol pretreatment on myocardial ischemia-reperfusion induced injury in rats. *Vasc. Pharmacol.*, **2006**, *45*, 122-26.
- [75] Shigematsu, S.; Ishida, S.; Hara, M.; Takahashi, N.; Yoshimatsu, H.; Sakata, T.; Korthuis, R.J. Resveratrol, a red wine constituent polyphenol, prevents superoxide-dependent inflammatory responses induced by ischemia-reperfusion, platelet-activating factor, or oxidants. *Free Radic. Biol. Med.*, **2003**, *34*, 810-17.
- [76] Dhalla, N.; Elmoselhi, A.; Hata, T.; Makino, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, **2000**, *47*, 446-56.
- [77] Sochman, J.; Vrbska, J.; Musilova, B.; Róček, M. Infarct size limitation: acute N-acetylcysteine defense (ISLAND trial): preliminary analysis and report after the first 30 patients. *Clin. Cardiol.*, **1996**, *19*, 94-100.
- [78] Su, H.; Sun, X.; Ma, H.; Zhang, H.; Yu, Q.; Huang, C.; Wang, X.; Luan, R.; Jia, G.; Wang, H.; Gao, F. Impairment of myocardial activation of PI 3-kinase-Akt signaling is a likely mechanism that accounts for the findings that hyperglycemia blunts the cardioprotection effect afforded by GIK. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metabol.*, **2007**, *293*, E629-35.
- [79] Bertuglia, S.; Giusti, A.; Fedele, S.; Picano, E. Glucose-insulin-potassium treatment in combination with dipyridamole inhibits ischaemia-reperfusion-induced damage. *Diabetologia*, **2001**, *44*, 2165-70.
- [80] Reichelt, M.E.; Willems, L.; Molina, J.G.; Sun, C.X.; Noble, J.C.; Ashton, K.J.; Schnermann, J.; Blackburn, M.R.; Headrick, J. Genetic deletion of the A1 adenosine receptor limits myocardial ischemic tolerance. *Circ. Res.*, **2005**, *96*, 363-7.
- [81] Louttit, J.B.; Hunt, A.A.; Maxwell, M.P.; Drew, G.M. The time course of cardioprotection induced by GR79236, a selective adenosine A1-receptor agonist, in myocardial ischaemia-reperfusion injury in the pig. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **1999**, *33*, 285-91.
- [82] Maddock HL, Mocanu MM, Yellon DM. Adenosine A(3) receptor activation protects the myocardium from reperfusion/reoxygenation injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **2002**, *283*, H1307-13.
- [83] Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R, Forman MB. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A1-receptor and A2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. *Am. Heart J.*, **1992**, *123*, 332-8.
- [84] Glover, D.; Riou, L.; Ruiz, M.; Sullivan, G.; Linden, J.; Rieger, J.; Macdonald, T.; Watson, D.; Beller, G. Reduction of infarct size and

- post-ischemic inflammation from ATL-146e, a highly selective adenosine A_{2A} receptor agonist, in reperfused canine myocardium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2005, 288, H1851-58.
- [85] Mentzer, R.M. Jr.; Birjiniuk, V.; Khuri, S.; Lowe, J.E.; Rahko, P.S.; Weisel, R.D.; Wellons, H.A.; Barker, M.L.; Lasley, R.D. Adenosine myocardial protection: preliminary results of a phase II clinical trial. *Ann. Surg.*, 1999, 229, 643-649.
- [86] Walter, K. Coordinating ERK/MAPK signaling through scaffolds and inhibitors. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2005, 6, 827-37.
- [87] Edwin, W.; Luis, H.; Walsh, J.; Lopez, F.; Anaya, R. The role of MAP kinases in trauma and ischemia-reperfusion. *J. Investig. Surg.*, 2004, 17, 45-53.
- [88] Wang, Y.; Huang, S.; Sah, V.; Ross, J.; Brown, J.; Han, J.; and Chien, K. Cardiac muscle cell hypertrophy and apoptosis induced by distinct members of the p38 mitogen-activated protein kinase family. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273, 2161-2168.
- [89] Ferrandi, C.; Ballerio, R.; Guillard, P.; Giachetti, C.; Carboni, S.; Vitte, P.A.; Gotteland, J.P.; Cirillo, R. Inhibition of c-Jun N-terminal kinase decreases cardiomyocyte apoptosis and infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in anaesthetized rats. *Br. J. Pharmacol.*, 2004, 142, 953-60.
- [90] Mackay, K.; Mochly-Rosen, D. An inhibitor of p38 mitogen-activated protein kinase protects neonatal cardiac myocytes from ischemia. *J. Biol. Chem.*, 1999, 100, 2100-7.
- [91] Pando, R.; Cheporko, Y.; Haklai, R.; Maysel-Auslender, S.; Keren, G.; George, J.; Porat, E.; Sagie, A.; Kloog, Y.; Hochhauser, E. Ras inhibition attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Biochem. Pharmacol.*, 2009, 77, 1593-601.
- [92] Obata, T.; Brown, G.E.; Yaffe, M.B. MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. *Crit. Care Med.*, 2000, 28, N67-77.
- [93] Berry, M.F.; Pirolli, T.J.; Jayasankar, V.; Burdick, J.; Morine, K.J.; Gardner, T.J. Apelin has *in vivo* inotropic effects on normal and failing hearts. *Circulation*, 2004, 110, 187-93.
- [94] Atluri, P.; Morine, K.J.; Liao, G.P.; Panlilio, C.M.; Berry, M.F.; Hsu, V.M. Ischemic heart failure enhances endogenous myocardial apelin and APJ receptor expression. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2007, 12, 127-38.
- [95] Szokodi, I.; Tavi, P.; Foldes, G.; Voutilainen-Myllyla, S.; Ilves, M.; Tokola, H. Apelin, the novel endogenous ligand of the orphan receptor APJ, regulates cardiac contractility. *Circ. Res.* 2002, 91, 434-40.
- [96] Japp A.G.; Newby, D.E. The apelin-APJ system in heart failure: pathophysiologic relevance and therapeutic potential. *Biochem. Pharmacol.*, 2008, 75, 1882-92.
- [97] Murriel, L. C. and Mochly-Rosen, D. Opposing roles of δ and ϵ PKC in cardiac ischemia and reperfusion: targeting the apoptotic machinery. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2003, 15, 246-54.
- [98] Sivaraman, V.; Hausenloy, D.; Kolvekar, S.; Hayward, M.; Yap, J.; Lawrence, D.; Di Salvo, C.; Yellon, M. D. The divergent roles of protein kinase C epsilon and delta in simulated ischaemia-reperfusion injury in human myocardium. *J. Mol. Cell Cardiol.*, 2009, 46, 758-64.
- [99] Li, L.; Lorenzo, P. S.; Bogi, K. Blumberg, P. M.; Yuspa, S. H. Protein kinase C delta targets mitochondria, alters mitochondrial membrane potential, and induces apoptosis in normal and neoplastic keratinocytes when overexpressed by an adenoviral vector. *Mol. Cell Biol.*, 1999, 19, 8547-58.
- [100] Gottlieb, R.; Bursleson, K.; Kloner, R.; Babior, B.; Engler, R. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J. Clin. Invest.*, 1994, 94, 1621-28.
- [101] Kinnally, K.W.; Antonsson, B. A tale of two mitochondrial channels, MAC and PTP, in apoptosis. *Apoptosis*, 2007, 12, 857-68.
- [102] Shimizu, S.; Ide, T.; Yanagida, T.; Tsujimoto, Y. Electrophysiological study of a novel large pore formed by Bax and the Voltage-dependent Anion Channel that is permeable to cytochrome c. *J. Biol. Chem.*, 2000, 275, 12321-25.
- [103] Kuwana, T.; Mackey, M.R.; Perkins, G.; Ellisman, M.H.; Latterich, M.; Schneider, R.; Green, D.R.; Newmeyer, D.D. Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell*, 2002, 111, 331-42.
- [104] Bombrun, A.; Gerber, P.; Casi, G.; Terradillos, O.; Antonsson, B.; Halazy, S. 3,6-Dibromocarbazole piperazine derivatives of 2-propanol as first inhibitors of cytochrome c release via Bax channels modulation. *J. Med. Chem.*, 2003, 46, 4365-68.
- [105] Crompton, M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem. J.*, 1999, 341, 233-49.
- [106] Machida, K.; Osada, H. Molecular interaction between cyclophilin D and adenine nucleotide translocase in cytochrome c release: does it determine whether cytochrome c release is dependent on permeability transition or not?. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 2003, 1010, 182-85.
- [107] Correa, F.; Soto, V.; Zazueta, C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2007, 39, 787-98.
- [108] Halestrap, A.P.; Connern, C.P.; Griffiths, E.J.; Kerr, P.M. Cyclosporin A binding to mitochondrial cyclophilin inhibits the permeability transition pore and protects heart from ischemia/reperfusion injury. *Mol. Cell. Biochem.*, 1997, 174, 167-72.
- [109] McGuinness, O.; Yafei, N.; Costi, A.; Crompton, M. The presence of two classes of high-affinity cyclosporin A sites in mitochondria. Evidence that the minor component is involved in the opening of an inner-membrane Ca(2+)-dependent pore. *Eur. J. Biochem.*, 1990, 194, 671-79.
- [110] Xie, J.R.; Yu, L.N. Cardioprotective effects of cyclosporine A in an *in vivo* model of myocardial ischemia and reperfusion. *Acta Anaesthesiol. Scand.*, 2007, 51, 909-13.
- [111] Halestrap, A.P.; Davidson, A.M. Interaction of Ca²⁺-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. *Biochem. J.*, 1990, 268, 153-60.
- [112] Zhang, D.X.; Fryer, R.M.; Hsu, A.K.; Zou, A.P.; Gross, G.J.; Campbell, W.B.; Li, P.L. Production and metabolism of ceramide in normal and ischemic-reperfused myocardium of rats. *Basic Res. Cardiol.*, 2001, 96, 267-74.
- [113] Garcia-Ruiz, C.; Colell, A.; Mari, M.; Morales, A.; Fernandez-Checa, J.C. Direct effect of ceramide on the mitochondrial electron transport chain leads to generation of reactive oxygen species. Role of mitochondrial glutathione. *J. Biol. Chem.*, 1997, 272, 11369-77.
- [114] Siskind, L.J.; Kolesnick, R.; Colombini, M. Ceramide channels increase the permeability of the mitochondrial outer membrane to small proteins. *J. Biol. Chem.*, 2002, 277, 26796-803.
- [115] Argaud, L.; Prigent, A.F.; Chalabreysse, L.; Loufouat, J.; Lagarde, M.; Ovize, M. Ceramide in the antiapoptotic effect of ischemic preconditioning. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2004, 286, H246-51.
- [116] Grunenfelder, J.; Miniati, D.; Murata, S.; Falk, V.; Hoyt, E.; Kown, M.; Koransky, M.L.; Robbins, R. Upregulation of Bcl-2 through caspase-3 inhibition ameliorates ischemia/reperfusion injury in rat cardiac allografts. *Circulation*, 2001, 104, 1-202-26.
- [117] Perrin, C.; Ecarnot-Laubriet, A.; Vergely, C.; Rochette, L. Calpain and caspase-3 inhibitors reduce infarct size and post-ischemic apoptosis in rat heart without modifying contractile recovery. *Cell. Mol. Biol.*, 2003, 49, 497-505.
- [118] Yarbrough, W.M.; Mukherjee, R.; Escobar, G.P.; Sample, J.A.; McLean, J.E.; Dowdy, K.B.; Hendrick, J.W.; Gibson, W.C.; Hardin, A.E.; Mingoia, J.T.; White, P.C.; Stiko, A.; Armstrong, R.C.; Crawford, F.A.; Spinale, F.G. Pharmacologic inhibition of intracellular caspases after myocardial infarction attenuates left ventricular remodeling: a potentially novel pathway. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, 2003, 126, 1892-99.
- [119] Chapman, J.G.; Magee, W.P.; Stukenbrok, H.A.; Beckius, G.E.; Milici, A.J.; Tracey, W.R. A novel nonpeptidic caspase-3/7 inhibitor, (S)-(+)-5-[1-(2-methoxymethylpyrrolidinyl)sulfonyl]isatin reduces myocardial ischemic injury. *Eur. J. Pharmacol.*, 2002, 456, 59-68.
- [120] Orłowski, J.; Kandasamy, R.A. Delineation of transmembrane domains of the Na⁺/H⁺ exchanger that confer sensitivity to pharmacological antagonists. *J. Biol. Chem.*, 1996, 271, 19922-27.
- [121] Lekli, I.; Das, S.; Das, S.; Mukherjee, S.; Bak, I.; Juhasz, B.; Bagchi, D.; Trimurtulu, G.; Krishnaraju, A.V.; Sengupta, K.; Tosaki, A.; Das, D.K. Coenzyme Q9 provides cardioprotection after converting into coenzyme Q10. *J. Agric. Food Chem.*, 2008, 56, 5331-37.
- [122] Maulik, N.; Yoshida, T.; Engelman, R.M.; Bagchi, D.; Otani, H.; Das, D.K. Dietary coenzyme Q(10) supplement renders swine hearts

- resistant to ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, 2000, 278, H1084-90.
- [123] Collis, C.S.; Davies, M.J.; Rice-Evans, C. Comparison of *N*-methyl hexanoylhydroxamic acid, a novel antioxidant, with desferrioxamine and *N*-acetyl cysteine against reperfusion-induced dysfunctions in isolated rat heart. *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, 1993, 22, 336-42.
- [124] Dhalla, N.; Elmoselhi, A.; Hata, T.; Makino, N. Status of myocardial antioxidants in ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.*, 2000, 47, 446-56.
- [125] Vergely, C.; Tabard, A.; Maupoil, V.; Rochette, L. Isolated perfused rat hearts release secondary free radicals during ischemia reperfusion injury: cardiovascular effects of the spin trap alpha-phenyl *N*-tert-butyl nitron. *Free Radic. Res.*, 2001, 35, 475-89.
- [126] Kim, S.; de A Vilela, G.V.; Bouajila, J.; Dias, A.G.; Cyrino, F.Z.; Bouskela, E.; Costa, P.R.; Nepveu, F. Alpha-phenyl-*N*-butyl nitron (PBN) derivatives: synthesis and protective action against microvascular damages induced by ischemia/reperfusion. *Bioorg. Med. Chem.*, 2007, 15, 3572-78.
- [127] Kang, S.M.; Lim, S.; Song, H.; Chang, W.; Lee, S.; Bae, S.M.; Chung, J.H.; Lee, H.; Kim, H.G.; Yoon, D.H.; Kim, T.W.; Jang, Y.; Sung, J.M.; Chung, N.S.; Hwang, K.C. Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca²⁺ overload in ischemia-reperfusion heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur. J. Pharmacol.*, 2006, 535, 212-19.
- [128] Kinugasa, Y.; Ogino, K.; Furuse, Y.; Shiomi, T.; Tsutsui, H.; Yamamoto, T.; Igawa, O.; Hisatome, I.; Shigemasa, C. Allopurinol improves cardiac dysfunction after ischemia-reperfusion via reduction of oxidative stress in isolated perfused rat hearts. *Circ. J.*, 2003, 67, 781-87.

Received: January 27, 2010

Revised: April 25, 2010

Accepted: April 27, 2010