

00551



UNIVERSIDAD NACIONAL **UNAM**  
AUTÓNOMA DE MÉXICO POSGRADO 

---

---

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO  
EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

EFEECTO CARDIOPROTECTOR DE LA  
OCTILGUANIDINA

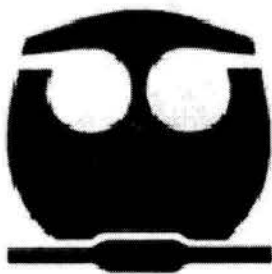
**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE :  
**MAESTRO EN CIENCIAS (BIOQUÍMICAS)**

**P R E S E N T A :**

**ELÍAS PARRA HERNÁNDEZ**

Tutor: DR. EDMUNDO CHÁVEZ COSSÍO



MÉXICO, D. F.

MAYO 2004



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

# EFFECTO CARDIOPROTECTOR DE LA OCTILGUANIDINA

## RECONOCIMIENTOS

Esta tesis de maestría se realizó bajo la dirección del Dr. Edmundo Chávez Cossío en el Departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez".

El Comité Tutorial que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Blas Lotina Henssen	Facultad de Química, UNAM
Dr. Salvador Uribe Carbajal	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Dr. Edmundo Chávez Cossío	Instituto Nacional de Cardiología

El proyecto fue apoyado parcialmente por CONACYT (36606-N). Durante parte de los estudios de maestría goce de una beca otorgada por CONACYT para la realización de la presente tesis.

El Jurado de Examen Doctoral estuvo constituido por:

Presidente	Dr. José Pedraza Chaverri	Facultad de Química, UNAM
Vocal	Dr. Antonio Peña Díaz	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Secretario	Dr. Guillermo Mendoza Hernández	Facultad de Medicina, UNAM
Suplente	Dra. Victoria Chagoya de Sánchez	Instituto de Fisiología Celular, UNAM
Suplente	Dr. Rafael Moreno Sánchez	Instituto Nacional de Cardiología

RESUMEN	1
INTRODUCCION	2
ANTECEDENTES	4
Daño por isquemia y reperfusión	4
Función intracelular del Ca <sup>2+</sup>	9
Transporte de Ca <sup>2+</sup> mitocondrial	9
Daño mitocondrial por Ca <sup>2+</sup>	11
HIPÓTESIS	15
OBJETIVOS	15
a) General	15
b) Particular	15
METODOLOGÍA	16
Material biológico	16
Isquemia/reperfusión <i>in vivo</i>	16
Aislamiento de mitocondrias	16
Medio básico	18
Determinación del control respiratorio	18
Análisis por autorradiografía	18
Análisis morfológico	18
Análisis estadístico	19
RESULTADOS	20
DISCUSIÓN	30
CONCLUSIÓN	32
BIBLIOGRAFÍA	33

## RESUMEN

Un creciente cuerpo de evidencias ha demostrado que el daño por reperfusión puede ser mediado, en parte, por una sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  mitocondrial que promueve la permeabilidad no selectiva de la membrana interna. Este estudio muestra que el catión anfifílico, la octilguanidina, protege al miocardio de las lesiones ocasionadas por la reperfusión post-isquémica. Se utilizaron ratas macho Wistar de 280 - 300 gramos. El efecto protector de este compuesto se analizó en los 5 minutos posteriores de reperfusión después de ocluir durante 5 minutos la arteria coronaria izquierda del corazón de las ratas. Los resultados demuestran que la octilguanidina, a dosis de 15 mg/kg, protege al miocardio de la arritmia ventricular y la disfunción contráctil, valorada en el electrocardiograma, ocasionada por la isquemia-reperfusión. Así mismo, al valorar el consumo de oxígeno en presencia de ADP; se observó que las mitocondrias preservaron su integridad por la presencia de octilguanidina. El estudio histológico mostró que las fibras miocárdicas de ratas tratadas se conservaron en buenas condiciones, manteniendo la estructura estriada de un tejido normal, y se observó claramente la ausencia de edema. Proponemos que esta acción protectora, se debe a que la octilguanidina inhibe la permeabilidad no selectiva de la membrana mitocondrial interna.

## Introducción

Alrededor de 17 millones de personas mueren cada año por enfermedad cardiovascular. Se estima que cada 4 segundos ocurre un síndrome coronario agudo y cada 5 segundos un accidente vascular cerebral. Las enfermedades cardiovasculares ocupan el primer lugar en mortalidad del paciente adulto en todo el mundo; en México esta afección también ocupa el primer lugar general con un total de 55,591 defunciones al año (12.6 %) (SSA, 2003; Fuster y cols., 2002).

El síndrome coronario agudo (SCA) es la manifestación clínica de la isquemia miocárdica, en el que se pierde el balance entre el aporte y la demanda de oxígeno, debido a una obstrucción severa o al cierre de la arteria coronaria secundario a la formación de un trombo intracoronario. Si un coágulo llega a ocluir una de las arterias coronarias que irrigan el corazón, se produce un infarto al miocardio, o ataque al corazón (Fuster y cols., 2001).

La identificación y manejo de los factores de riesgo son esenciales para la prevención de la enfermedad cardíaca y del SCA en individuos asintomáticos (prevención primaria) y en pacientes que tengan eventos recurrente con una enfermedad establecida (prevención secundaria). Entre estos factores se encuentran la *Diabetes mellitus* (Haffner y cols., 1998; Grundy y cols., 1999), obesidad (Eckel y Krauss, 1998), dieta rica en grasas (Shekelle y Stamler, 1989), niveles elevados de lipoproteínas de baja densidad (LDL, >160 mg/dL), niveles bajos de lipoproteínas de alta densidad (HDL, <35 mg/dL) (NCEP, 1994), hábito de fumar (Castelli y cols., 1981), hipertensión (MacMahon y cols., 1990), inactividad física (Fletcher y cols., 1996), consumo de alcohol (Stampfer y cols., 1988; Rimm y cols., 1991), historia familiar de enfermedad coronaria (EC) prematura (Hopkins y Williams, 1989).

Las causas de las enfermedades cardiovasculares son múltiples y variadas, y su interrelación, juega un papel importante en la aparición de estos desórdenes; factores tales como el sexo y la edad son determinantes en el desarrollo de la enfermedad; sin embargo, la presencia de otros agentes, como los desórdenes metabólicos, puede acelerar el proceso, o bien desencadenarlo abruptamente (Krzyszinski y cols., 1988). El grado en estos elementos participa en la patogénesis del síndrome coronario agudo no puede establecerse con

certeza, ya que la contribución de cada uno parece estar estrechamente relacionada con la presencia o ausencia de otros, haciendo el origen de estos padecimientos una entidad compleja.

En este trabajo se reportan resultados obtenidos de la administración del catión anfifílico octilguanidina, el cual tiene la capacidad de prevenir los daños inducidos por la reperfusión post-isquémica.

## **ANTECEDENTES**

### **Daño por isquemia y reperfusión**

La isquemia miocárdica se desarrolla cuando el flujo coronario es inadecuado para suministrar oxígeno y sustratos metabólicos requeridos para mantener un adecuado funcionamiento cardiaco. La isquemia cardiaca puede resultar de: 1) un incremento en el trabajo cardiaco causado por placas ateroscleróticas, que origina una demanda mayor de oxígeno, 2) por la reducción del flujo coronario debido a una constricción vascular o por una trombosis aguda (Fuster y cols., 2001). La restitución del flujo sanguíneo en el área tisular isquémica constituye el proceso de reperfusión. Entre las alteraciones que asociadas a este fenómeno están: edema tisular, arritmias de reperfusión, formación de bandas de contracción y lisis celular, entre otras (Guadalajara, 1991) .

La isquemia miocárdica aguda causa una serie de cambios metabólicos, iónicos y neurohumorales que resultan de fenómenos tales como: a) la ausencia del flujo arterial que produce hipoxia y una considerable falta de aporte de sustratos metabólicos, que favorece un metabolismo anaeróbico, así como la hidrólisis de los fosfatos de alta energía, b) la falta del flujo venoso, que conduce a la acumulación de los productos finales del metabolismo anaeróbico en el espacio extracelular y, c) la activación de los reflejos neurohumorales, que produce un aumento de los neurotransmisores circulantes del tejido cardiaco (Ferrari y cols., 1986; Gettes y cols., 1991).

En la isquemia cardiaca, si la oclusión coronaria persiste, la disminución del flujo sanguíneo da como resultado un daño estructural irreversible que lleva al tejido cardiaco a la muerte celular por necrosis. Si la reperfusión ocurre antes de que el daño se presente, la integridad estructural de la célula puede recuperarse. Sin embargo, contrariamente a lo esperado, la reintroducción de los elementos ausentes durante la isquemia, como el calcio ( $Ca^{2+}$ ) y el oxígeno, ocasiona un mayor daño al tejido, a pesar de que el flujo coronario se restablezca (Opie, 1989).

Durante los últimos años las evidencias clínicas y experimentales acumuladas indican que existe un daño secundario a la reperfusión, pero persiste la interrogante de si la reperfusión por sí misma es la que produce el



daño, o bien si agudiza el deterioro ocasionado por la isquemia. Dicho se ha caracterizado por medio de la descripción de sus características metabólicas, electrofisiológicas, morfológicas y funcionales (Opie, 1989).

A fin de dar una explicación adecuada al daño ocasionado por la reintroducción del flujo sanguíneo (reperfusión), se han propuesto dos teorías. Una de ellas considera que el agente más importante es el  $\text{Ca}^{2+}$  y que una sobrecarga de este ión conduce a la célula a la necrosis o citólisis (Fig. 1). En la isquemia celular disminuye la concentración de ATP, aumenta el fosfato y se restringe la salida de  $\text{Ca}^{2+}$  celular, alterando la regulación de éste; al reoxigenar la célula, la concentración citoplasmática de  $\text{Ca}^{2+}$  se incrementa ocasionando un flujo masivo de éste ión a la mitocondria, provocando aumento en la permeabilidad de sus membranas, inhibición en la síntesis de ATP, alteraciones en la excitación y contracción celular, alterando de esta forma la integridad estructural de la misma y la microvasculatura miocárdica (Benzi y Lerch, 1992; Hüser y Blatter, 1999).

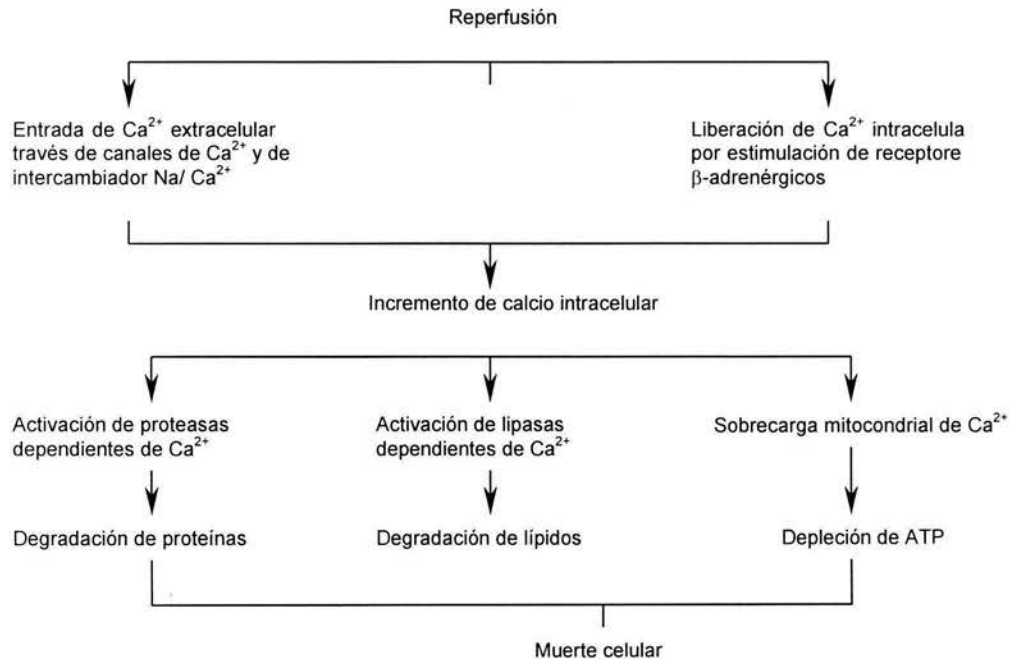


Figura 1. Fisiopatología del daño celular inducido por calcio durante la perfusión.

La otra teoría considera que en la patogénesis de la isquemia y/o reperfusión cardiaca hay cambios rápidos o graduales en los sistemas membranosos que son resultado de la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS) como el anión superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $\cdot OH$ ) (Fig. 2), los cuales inducen daño celular afectando no solo lípidos membranales sino también a proteínas intramembranales, como la ATPasa de  $Na^+/K^+$ , alterando la permeabilidad de las mismas y desestabilizando el metabolismo de  $Ca^{2+}$  celular. (Opie, 1989; Dhalla y cols., 1999; Asano y cols., 2003). Además de esto, hay alteraciones en el manejo del oxígeno por la cadena respiratoria mitocondrial y en la síntesis de ATP. Banerjee y cols., (1991) reportaron que durante el periodo de isquemia se observó una disminución de la actividad de la enzima creatina cinasa (CK), enzima que regula el metabolismo energético, argumentando que esto se debió al aumento en la concentración de  $H_2O_2$ .

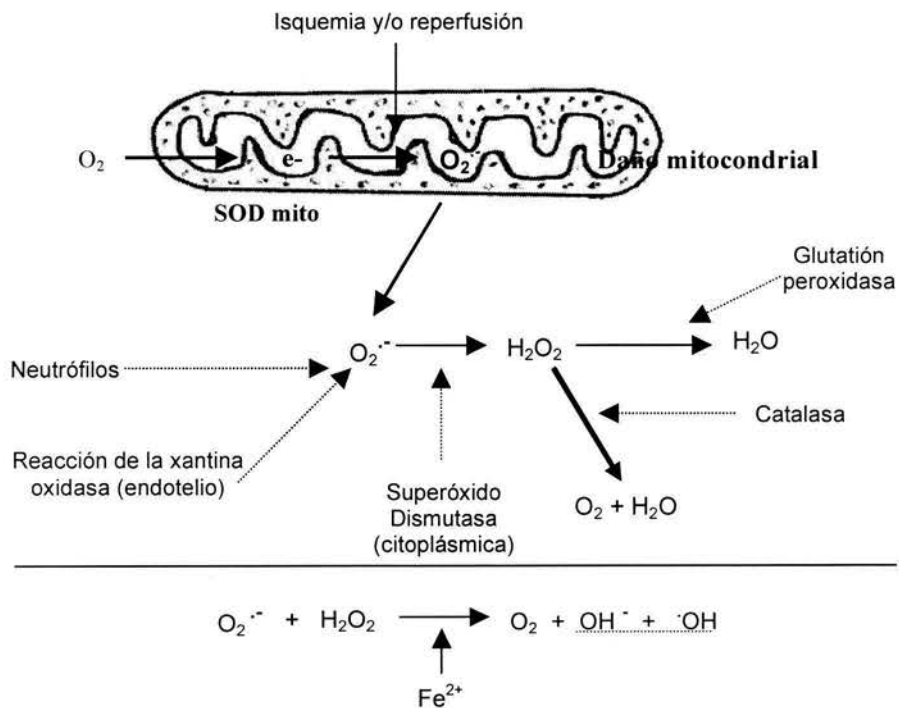


Figura 2. Metabolismo de radicales libres en el daño isquémico del miocardio. SOD mito: superóxido dismutasa mitocondrial. (Asano y cols., 2003)

La marcada actividad de radicales libres probablemente se amplifique por la intervención de iones metálicos liberados por las células durante la isquemia, como el hierro y cobre. Lo anterior causa un daño reversible o

irreversible, dependiendo del tiempo de isquemia y reperfusión, que incluye la muerte celular necrótica y/o apoptótica (Peterson y cols., 1985; Maxwell, 1995; Asano y cols., 2003).

Entre los fenómenos fisiológicos observados durante el restablecimiento del flujo sanguíneo se encuentra la aparición de arritmias ventriculares. En diversos estudios ha quedado demostrado que las oscilaciones en el contenido de calcio intracelular durante la reperfusión post-isquémica tiene efectos electrofisiológicos que incluyen la aparición de ritmos cardiacos anormales. Consecuentemente, el uso de agentes que modifiquen los movimientos intracelulares de éste ión, tendrá un impacto significativo sobre las anomalías metabólicas, iónicas y eléctricas que caracterizan este tipo de daño (Brooks y cols., 1995).

Otro de los fenómenos asociados con el daño vascular inducido por la reperfusión es el “no reflujo”, que se presenta cuando a pesar de haber removido la oclusión arterial el flujo sanguíneo no se restaura; esta alteración también se presenta en modelos animales. Algunas de las explicaciones a dicho efecto es que el daño vascular y la migración de neutrófilos producen edema celular en el endotelio y con ello, el “no reflujo”; por otra parte está la formación de agregados plaquetarios y de trombos. Por último se menciona que la contractura isquémica del miocardio puede comprimir las arterias coronarias, impidiendo así la restauración del flujo sanguíneo (Engler y cols., 1986; Lucchesi, 1990).

Con el fin de atenuar estos acontecimientos, en los últimos años se han realizado numerosos estudios encaminados a la utilización de agentes farmacológicos con el propósito de disminuir el daño por reperfusión. Se han utilizado bloqueadores de los canales de calcio, como la nifedipina, el verapamil y el diltiazem (Mitchell y cols., 1982; Low y cols., 1982; Roden y George, 1996); y agentes antioxidantes como la superóxido dismutasa (SOD), la catalasa, el ascorbato y el alfa-1-tocoferol (Przylenk y Kloner, 1986; Massey y Burton, 1989; Pyke y Chan, 1990), entre otros. En el caso de los últimos se ha observado que su administración antes del daño por isquemia previene la disminución de ATP, la liberación de enzimas marcadoras de daño celular, como la creatina cinasa (CK) y la lactato deshidrogenasa (LDH), la incidencia de arritmias ventriculares y la falla de la función contráctil del corazón.

Por otro lado, el efecto protector de los antagonistas de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  incluye el ahorro de energía, la disminución de la concentración de calcio intracelular ( $[\text{Ca}^{2+}]_i$ ) y de noradrenalina (Nayler y cols., 1991). Estos últimos fenómenos están relacionados, durante la isquemia miocárdica hay una actividad importante del sistema nervioso autónomo que causa la liberación de noradrenalina del citoplasma de las neuronas al espacio intersticial. Una vez que la NA es liberada actúa sobre adrenergeceptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) post-sinápticos alterando la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  en los miocitos y células marcapaso (Schömig y cols., 1991). La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  eventualmente resulta en disrritmia y contracción descoordinada de los miocitos. Richardt y cols., (1991) y Schömig y cols., (1992) propusieron dos mecanismos por los cuales los antagonistas de canales de calcio actúan: 1) bloqueando el canal liberador de NA en la membrana plasmática de la terminaciones nerviosas del corazón, y 2) bloqueando los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  transmembrana en los miocitos.

Otro de los fármacos que se han empleado con este fin es el inmunosupresor ciclosporina A (Cys A); éste se ha aprovechado por su propiedad de bloquear canales inespecíficos de calcio en la membrana mitocondrial, observándose que disminuye la liberación de enzimas marcadoras de daño miocárdico, como la CK y la LDH, y la aparición de arritmias ventriculares (Arteaga y cols., 1992).

Así mismo, se ha evaluado el efecto protector del Ketorolac, analgésico no esteroideo, que además de tener la propiedad de actuar como ionóforo de calcio en las mitocondrias (Chávez y cols., 1993), atenúa la severidad del daño producido durante la reperfusión post-isquémica, como se observa en la disminución de arritmias, de enzimas marcadoras de daño celular y de alteraciones histológicas del tejido cardiaco. El efecto protector de este fármaco se debe a que evita la acumulación masiva de  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (Chávez y cols., 1996).

De esta misma forma se ha evaluado el Dantrolene como fármaco cardioprotector, debido a que inhibe la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  a través del canal de rianodina en el retículo sarcoplásmico, y las lesiones ocasionadas por la reperfusión post-isquémica (Mitchell y cols., 1993). Por otro lado, se han utilizado los bloqueadores adrenérgicos beta para minimizar el daño por reperfusión, como el propanolol, metropolol, nadalol, debido a que al unirse a los receptores  $\beta$  bloquean, parcial o completamente, la interacción de sus

agonistas, como la adrenalina y noradrenalina. De esta forma evitan el aumento en la  $[Ca^{2+}]_i$  vía activación de canales de  $Ca^{2+}$  previniendo el desarrollo de arritmias (Zucchi y cols., 2001).

### **Función intracelular del $Ca^{2+}$**

Es de interés destacar que el  $Ca^{2+}$ , siendo tan importante, pues regula muchos sistemas celulares, es capaz de desencadenar daños tan severos en la célula. Entre las funciones que regula el  $Ca^{2+}$  se encuentran la contracción muscular, la secreción y la ruptura del glucógeno regulada hormonalmente, donde sus cambios en la concentración citosólica son indispensables para llevar a cabo dichas funciones (Carafoli, 1987). Por otro lado, este ión activa algunas enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs como la  $\alpha$ -cetoglutarato oxidasa, la isocitrato deshidrogenasa, además de la piruvato deshidrogenasa, el transporte de electrones (Denton y McCormack, 1990; Hansford R, 1994), la función del translocador de nucleótidos de adenina (ANT) (Moreno-Sánchez, 1985) y la  $F_1$ -ATPasa (Yamada y Huzel, 1989).

Anteriormente se pensaba que las mitocondrias acumulaban  $Ca^{2+}$  para regular las variaciones en la concentración del mismo en el citosol y así proteger a la célula de la hipercalcemia que existe en condiciones patológicas (Akerman y Nicholls, 1983). En la actualidad se considera que el papel principal del transporte de calcio en la mitocondria consiste en estimular la activación de los procesos metabólicos que dependen de él.

### **Transporte mitocondrial de $Ca^{2+}$**

El sistema de transporte de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana interna mitocondrial es complicado. El  $Ca^{2+}$  se transporta a la matriz en respuesta al potencial de membrana ( $\Delta\Psi$ ), generado por el gradiente electroquímico de  $H^+$  ( $\Delta\mu H^+$ ), que está estrechamente relacionado, tanto con la producción de ATP como con el transporte de  $Ca^{2+}$ , ya sea en condiciones normales como patológicas, tales como la reperfusión post-isquémica. Se ha sugerido que las mitocondrias de tejidos perfundidos utilizan el oxígeno almacenado para transportar  $Ca^{2+}$  en lugar de generar ATP (Ferrari y cols., 1993). La capacidad que tiene la mitocondria para almacenar calcio en la matriz permite exceder la

concentración de 1 M, y su afinidad por el mismo es suficiente para reducir el contenido de  $\text{Ca}^{2+}$  externo libre a 1  $\mu\text{M}$  (Akerman y Nicholls, 1983).

Se conocen al menos cuatro mecanismos por los cuales se transporta el calcio en la mitocondria (Fig. 3) (Gunter y Pfeiffer, 1990; Gunter y cols., 1994). El primero consiste en la entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la matriz mitocondrial a través del uniportador (U) en la membrana interna mitocondrial, utilizando la energía derivada del  $\Delta\Psi$ . Este mecanismo sirve para activar las enzimas mitocondriales dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ , y actúa como un mecanismo de eliminación el exceso de este ión del citosol (Gunter y cols., 1998).

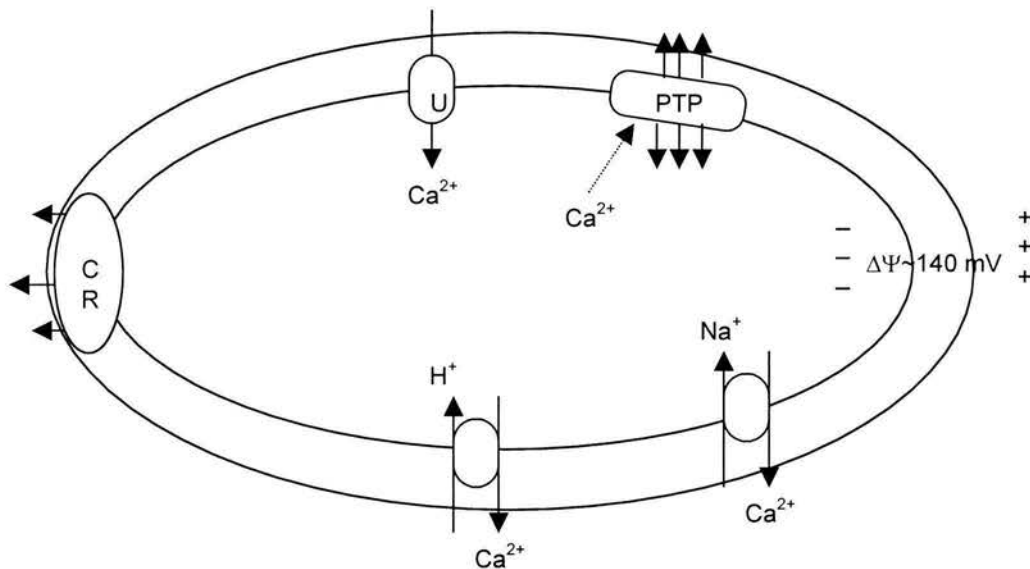


Figura 3. Transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana interna mitocondrial. La entrada de  $\text{Ca}^{2+}$  a la mitocondria se lleva a cabo por medio de un uniportador (U) dependiente del potencial eléctrico transmembranal mantenido por el transporte de protones a través de los complejos de la cadena respiratoria (CR). La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  se efectúa en intercambio con  $\text{Na}^+$  o  $\text{H}^+$ , y a través de un poro inespecífico (PTP) que se forma en la membrana interna mitocondrial cuando la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  es elevada. (Gunter y cols., 1994)

La salida de  $\text{Ca}^{2+}$  ocurre por dos mecanismos diferentes, uno dependiente de  $\text{Na}^+$  y otro independiente de  $\text{Na}^+$ ; el primero intercambia  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{Na}^+$ ,  $3\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  (Hinata y cols., 2002) o  $4\text{Na}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  (Matsuoka, 2002), dependiendo de la concentración de  $\text{Na}^+$ , el segundo intercambia  $\text{Ca}^{2+}$  por  $\text{H}^+$ ,  $2\text{H}^+ : 1\text{Ca}^{2+}$  (Milanick, 1990). El mecanismo dependiente de  $\text{Na}^+$ , también conocido como intercambiador  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  (Gunter y cols., 1998), se encuentra principalmente en las mitocondrias de corazón y cerebro y es un proceso

electrogénico (Baysal y cols., 1994). Por su lado, la salida independiente de  $\text{Na}^+$ , proceso no electrogénico, está presente en mitocondrias de hígado y riñón (Gunter y cols., 1998).

El cuarto mecanismo tiene que ver con el aumento en la permeabilidad de la membrana interna mitocondrial, poro de transición de la permeabilidad (PTP), que permite el movimiento de  $\text{Ca}^{2+}$  y otros solutos. Se ha postulado que el PTP está asociado a la acumulación de  $\text{Ca}^{2+}$  (Dubinsky y Levi, 1998), o que su apertura puede ser una consecuencia de la producción de especies reactivas de oxígeno (Castilho y cols., 1998).

### **Daño mitocondrial por $\text{Ca}^{2+}$**

Los cambios intracelulares de  $\text{Ca}^{2+}$  se han implicado en la muerte celular y se asocian con una gran cantidad de estados patológicos como la isquemia cardiaca, distrofia muscular, daño neuronal asociado a isquemia (Smaili y cols., 2003). El ciclo del transporte de  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria es de suma importancia para mantener un adecuado funcionamiento celular (Berridge y cols., 2000); permite que los cambios en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  (aproximadamente 100 nM) se traduzcan en cambios en la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial ( $[\text{Ca}^{2+}]_m$ ), adecuados para mantener la regulación de las enzimas sensibles a  $\text{Ca}^{2+}$  en la mitocondria, y con ello, el metabolismo oxidativo. Este sistema actúa sobre la contracción muscular del corazón, que requiere de un metabolismo aeróbico. Al aumentar la contracción del tejido cardíaco, se eleva la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  lo que lleva al incremento del metabolismo oxidativo y de la síntesis de ATP (Crompton y Andreeva, 1993).

Las células en reposo tienen  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  y  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  muy similares; sin embargo, cuando hay daño celular (Ferrari y cols., 1993; Richter, 1993; Richter y cols., 1995) y la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  aumenta hasta los 500 nM, la mitocondria tiene la capacidad de remover el exceso de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular (Krieger y Duchon, 2002; Hajnóczky y cols., 2003). Con el aumento sostenido en la  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  se produce un incremento proporcionalmente mayor en la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  (1-3  $\mu\text{M}$ ) hasta que ocurre la sobrecarga de calcio, y el contenido en la mitocondria tiende al infinito (Nicholls y Crompton, 1980).

Se ha demostrado que en la sobrecarga de calcio mitocondrial el inmunosupresor Cys A evita el daño cardíaco ocasionado por reperfusión post-

isquémica (Arteaga y cols., 1992; Chávez y Zazueta, 1998), debido a que ejerce su efecto sobre el flujo de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana mitocondrial. Cuando hay una sobrecarga de éste ión, la mitocondria pierde su capacidad de acumularlo en grandes cantidades, esto ocasiona que sea liberado una vez más al citosol. La Cys A restaura la capacidad de la mitocondria de almacenar  $\text{Ca}^{2+}$ , previniendo el daño ocasionado por la sobrecarga del mismo. El modo de acción de la Cys A es impedir la aparición del PTP ya que interactúa con uno de sus componentes, la ciclofilina D (CyP D), de esta forma cierra el poro y retiene el calcio en el interior de la mitocondria (Fournier y cols., 1987; Altschuld y cols., 1992; Chávez y cols., 1997; Crompton, 2000).

Siguiendo esta línea de investigación, Bobadilla (2001) reportó que el corazón de ratas hipertiroideas es sensible a los daños ocasionados por reperfusión y que el hipotiroidismo ofrece resistencia ante estas alteraciones, que se manifiestan como arritmias severas, lesión tisular y liberación de enzimas. Los autores mencionan que dicho efecto se debe a que la membrana mitocondrial interna de ratas hipotiroideas tienen una concentración menor del fosfolípido cardiolipina, el cual es requerido para conseguir una adecuada actividad de la ANT. Por lo que, la disminución de cardiolipina previene la conversión de la ANT en un poro inespecífico y la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  (Chávez y cols., 1998).

La apertura del PTP fue observada por primera vez por Hunter y Haworth a finales de los 70's. Hoy en día se acepta que la transición de la permeabilidad mitocondrial (PT) tiene que ver con la muerte celular y en especial con el daño por reperfusión en corazón (Fig. 4) (Crompton y cols., 1987; Crompton y Costi, 1990; Gunter y cols., 1994; Crompton, 1999). El PTP se abre en condiciones en las cuales la  $[\text{Ca}^{2+}]_m$  aumente. Varios factores incrementan la sensibilidad del poro a el  $\text{Ca}^{2+}$ , entre los cuales se encuentran el estrés oxidativo, disminución de los nucleótidos de adenina, el incremento en los niveles de fósforo inorgánico (Crompton, 1999). La apertura del PTP tiene dos consecuencias importantes: 1) permeabiliza a la membrana mitocondrial interna a moléculas de hasta 1.5 kDa y a iones, además de disipar el gradiente a través de la membrana, lo cual conduce al colapso de la fuerza protón motriz convirtiendo a la mitocondria de un productor de ATP en un consumidor del mismo (Bernardi y cols., 1994; Gunter y cols., 1994); y 2) la apertura del poro



permite que haya un equilibrio de solutos a través de la membrana que promueve una presión osmótica que causa el hinchamiento de la mitocondria y la ruptura de la membrana externa (Halestrap y cols., 1998; Bernardi, 1999).

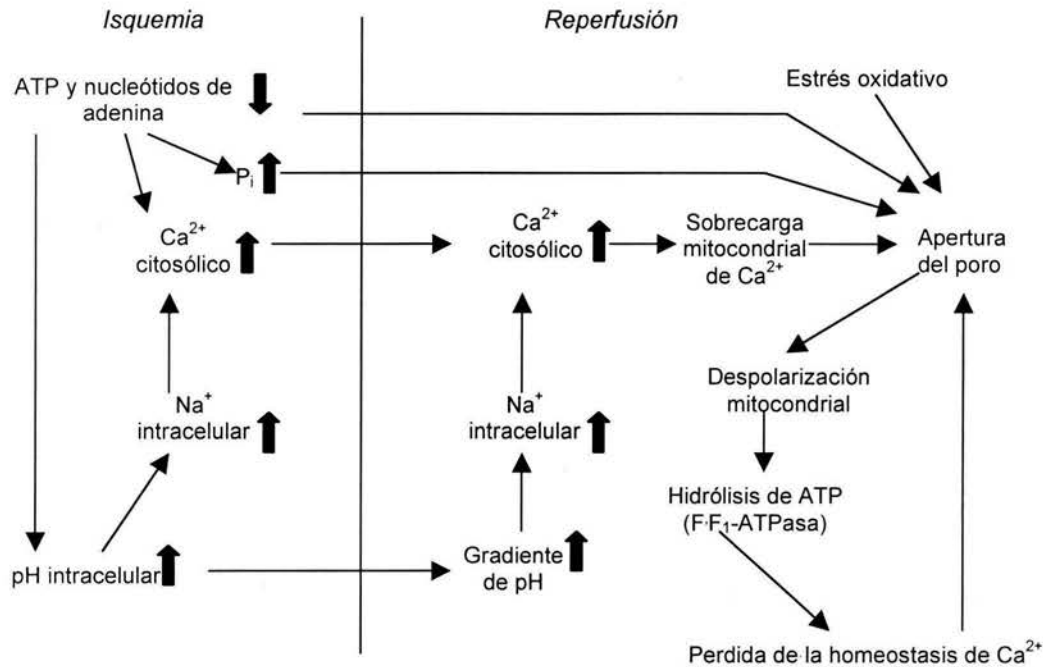


Figura 4. Modo de operar del poro de transición de la permeabilidad en la muerte celular inducida por reperfusión post-ischémica. El agotamiento de ATP durante la isquemia conduce a una elevación de la  $[Ca^{2+}]_i$  libre en el citosol y de  $P_i$ . La reperfusión conduce a una acumulación excesiva de  $Ca^{2+}$  mitocondrial que junto con el estrés oxidativo, la alta concentración de  $P_i$  y los bajos niveles de ATP provocan la apertura del poro de transición de la permeabilidad, iniciando así un ciclo vicioso que conduce a la muerte celular. (Crompton, 1999)

El PTP mitocondrial normalmente se encuentra cerrado, pero puede abrirse en condiciones asociadas con estrés oxidativo y aumento de la  $[Ca^{2+}]_i$ , estas situaciones se pueden observar durante la reperfusión post-ischémica (Kroemer y Reed, 2000).

Existen evidencias que la ANT está implicada en la apertura del PTP (Brustovetsky y Klingenberg, 1996; Rück y cols., 1998; Zazueta y cols., 2000; Kroemer y Reed, 2000). El estrés oxidativo incrementa la sensibilidad del poro a el  $Ca^{2+}$  por dos mecanismos: 1) disminuyendo la unión de los nucleótidos de adenina a la ANT, 2) por incrementar la unión de la CyP D a la misma (Crompton y cols., 1987; Conner y cols., 1994).

Se ha propuesto que el estrés oxidativo conlleva a la oxidación de grupos tioles en la ANT mitocondrial (LêQuôc y LêQuôc, 1989; Bindoli y cols., 1997). Halestrap y cols. (1997), proponen que la oxidación de los tioles de la cisteína<sup>57</sup> (Cys), sitio de unión de la CyP D, Cys<sup>160</sup>, sitio de unión de nucleótidos de adenina, y Cys<sup>257</sup> en la ANT son los responsables del aumento de la sensibilidad a Ca<sup>2+</sup> en el estrés oxidativo. La oxidación de estos grupos estabiliza la conformación abierta de la ANT ocasionando la apertura del PTP sensible a Ca<sup>2+</sup> (McStay y cols., 2002).

Así mismo Chávez y cols., (2000) reportaron que el catión anfifílico octilguanidina (OG) inhibe la transición de la permeabilidad, en mitocondrias aisladas de tejido hepático, inducida por carboxiatractilósido. Propusieron que la OG interactúa, con base en su estructura, de dos formas; por un lado tiene la capacidad de anclarse a la membrana mitocondrial por medio de su cadena carbonada, y por el otro, mediante de su grupo guanido, con el translocador de nucleótidos de adenina. Evitando así el intercambio de iones a través del poro de transición.

La evidencia acumulada durante los últimos años demuestra que el daño por reperfusión puede estar mediado, en parte, por la producción de especies derivadas de oxígeno, formadas por diferentes medios, además de la sobrecarga de Ca<sup>2+</sup> mitocondrial, que promueve la permeabilidad no selectiva de la membrana interna. De interés particular, por diversos estudios realizados, Chávez y colaboradores ha sugerido que el calcio es el factor de mayor relevancia implicado en el daño ocasionado por la reperfusión post-isquémica. Dado que uno de los mecanismos involucrados en este daño es la apertura de un poro inespecífico en la membrana mitocondrial, el poro de transición de la permeabilidad, se propone que la OG, al evitar la formación de este poro de transición puede disminuir los daños ocasionados por la reperfusión post-isquémica.

## **HIPÓTESIS**

De acuerdo con los antecedentes que demuestran que la transición de la permeabilidad mitocondrial está implicada en el daño por reperfusión (Kroemer y Reed,2000), y que la octilguanidina es capaz de inhibirla (Chávez y cols., 2000), proponemos que la octilguanidina evita el daño miocárdico por reperfusión después de un periodo de isquemia.

## **OBJETIVOS**

### **a) General**

Demostrar que la administración pre-isquemia de octilguanidina I.V., es capaz de prevenir las alteraciones inducidas por la reperfusión.

### **b) Particulares**

- Valorar la respuesta cardiaca de ratas tratadas con octilguanidina al daño producido por reperfusión post-isquémica.
- Evaluar el estado fosforilante de las mitocondrias aisladas de corazón de ratas tratadas con octilguanidina.

## **METODOLOGÍA**

### **Material biológico**

Se utilizaron ratas macho *Wistar albino* de 280 – 300 g de peso con alimentación *ad libitum*.

### **Isquemia/reperfusión *in vivo*.**

Se valoraron 20 ratas control y 20 ratas tratadas con octilguanidina, que fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (55 mg/kg) administrado vía intraperitoneal. Los animales se mantuvieron con respiración asistida a través de una bomba tipo Palmer para especies menores, mediante intubación endotraqueal. La OG (15 mg/kg de peso) se administró a través de la arteria femoral 10 minutos antes de realizar la oclusión de la arteria coronaria izquierda. Mediante una toracotomía lateral izquierda se expuso el corazón, y se localizó la arteria coronaria izquierda, la cual se ligó con una seda negra trenzada, calibre 6-0. El periodo de oclusión duró cinco minutos, después de los cuales se retiró la ligadura para dar inicio a la reperfusión cardíaca durante cinco minutos. Se obtuvieron registros electrocardiográficos y de tensión arterial para vigilar los cambios durante las fases de isquemia y reperfusión. La arteria femoral de una de las extremidades se canuló con un catéter conectado a un transductor de presión hidrostática. Los registros se tomaron en un polígrafo tipo Grass. La Figura 5 esquematiza el modelo utilizado para los experimentos de isquemia y reperfusión *in vivo* el cual produce una isquemia total del ventrículo además de que permite evaluar los cambios del electrocardiograma del animal sin necesidad de estimulación externa. Por otro lado este modelo se aproxima en gran manera a lo que sucedería en un organismo superior pues se mantiene la interacción de todos los sistemas del organismo como el humoral y sanguíneo (Curtis y cols., 1987).

### **Aislamiento de mitocondrias**

Se utilizó una técnica de centrifugación diferencial para el aislamiento de mitocondrias de corazón (Moreno-Sánchez, Hansford, 1998). Se extrajo el corazón y se le adicionó 2 mg de enzima Nagarse durante 5 minutos.

Posteriormente se centrifugó el tejido a 9,000 rpm por 10 minutos a 4 °C; se desechó el sobrenadante, y el tejido fue homogenizado en un medio isotónico de sacarosa 0.25 M, HEPES 10 mM y EGTA 1 mM, pH 7.4. Este homogeneizado se centrifugó a 2,500 rpm durante 5 minutos y se recuperó el sobrenadante, que se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C.

La pastilla obtenida se resuspendió e incubó en sacarosa 0.25 M, HEPES 10 mM, EGTA 1 mM y albúmina sérica de bovino libre de ácidos grasos al 0.2%, por 10 min a 4 °C. Después de este periodo la solución se centrifugó a 10,000 rpm por 10 min a 4 °C, el botón formado se resuspendió en el medio isotónico.

La concentración de proteínas se determinó por el método de Lowry (Lowry y cols., 1951).

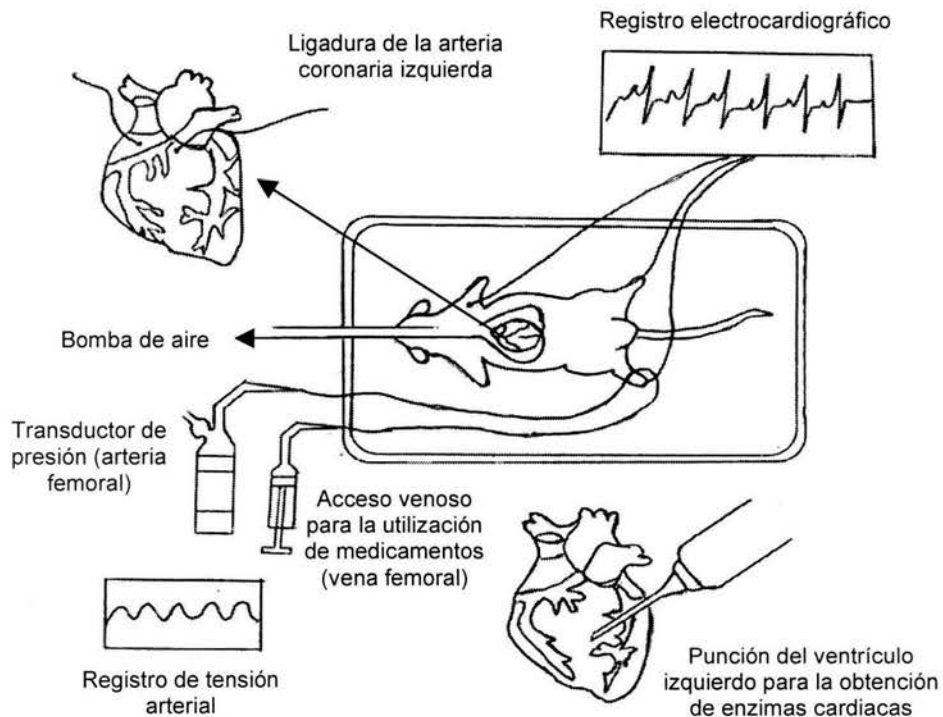


Figura 5. Diagrama representativo del modelo de isquemia reperfusión *in vivo*. La isquemia se produce mediante la ligadura de la arteria coronaria izquierda, después de 5 minutos se retira la ligadura y se inicia la reperfusión. Registros de electrocardiograma y presión sanguínea son tomados durante todo el procedimiento. (Téllez y cols., 1996)

### **Medio básico**

Para los experimentos de oximetría se empleó el siguiente medio: KCl 125 mM, HEPES 10 mM, Pi 2 mM, succinato 5 mM, ADP 200  $\mu$ M, y rotenona 2.5 mM, en un volumen final de 1 ml, pH 7.3 (Chappel, 1963; Davidoff, 1974).

### **Determinación del Control respiratorio**

El control respiratorio se determinó polarográficamente utilizando un electrodo tipo Clark acoplado a un registrador. Las determinaciones se hicieron con 1 mg de proteína mitocondrial en 2 ml de medio básico, sin ADP, a 30 °C. La respiración se estimuló adicionando 10  $\mu$ L de ADP 50 mM. La concentración de oxígeno disuelta en la mezcla de incubación se definió considerando que hay 400  $\eta$ O<sub>2</sub>/ml. El control respiratorio se calculó basándose en la relación existente entre el estado 3 y 4 de la respiración mitocondrial (Chance y William, 1965).

### **Análisis por autorradiografía**

El área de isquemia fue valorada por autorradiografía con <sup>201</sup>Tl. El radionúclido se administró por la cánula en la arteria femoral a una concentración de 250  $\mu$ Ci durante los periodos de isquemia y reperfusión. Se extrajo el ventrículo izquierdo y se hicieron cortes del mismo. Las muestras se colocaron en una caseta y se expusieron ante una película de rayos X durante 6 hrs.

### **Análisis histológico**

El análisis histológico se realizó en el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Se obtuvieron corazones de 30 ratas (10 controles, 10 con isquemia-reperfusión, y 10 con isquemia-reperfusión más tratamiento). Al final de cada experimento, se hicieron cortes transversales de la base, parte media y ápice. Se tomaron muestras de la pared libre del ventrículo izquierdo para estudios de microscopía electrónica, y el resto del tejido se fijó en formalina al 10% en buffer de fosfatos; éstos se incluyeron en parafina, se hicieron cortes de 4  $\mu$ m de los bloques y los cortes

se tiñeron con hematoxilina-eosina y masson tricrómica. Las muestras para microscopía electrónica se fijaron en 2.5% de glutaraldehído, y posteriormente en 1% de tetróxido de osmio en buffer de fosfato. Se realizaron cortes finos de los tejidos, que se tiñeron con citrato y acetato de uranilo. Los cortes se examinaron con un microscopio electrónico Zeiss, EM-9. Las evaluaciones histológicas se hicieron mediante microscopía de luz y electrónica.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) para evaluar las diferencias entre las ratas estudiadas en los ensayos de isquemia y reperfusión, en donde se tomó el tiempo como variable dependiente, y los latidos y la presión sanguínea como respuesta. En los experimentos de reperfusión post-isquémica se evaluó también la incidencia de los diferentes tipos de arritmias ventriculares, mediante un análisis no paramétrico, la distribución Z. La clasificación se reportó de acuerdo con la convención de Lambeth (Walker y cols., 1980). En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando se obtuvo una  $P$  menor o igual a 0.05.

## RESULTADOS

La sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ , como evento principal durante la reperfusión, está estrechamente relacionada con la aparición de arritmias ventriculares (Silverman, 1993; Brooks y cols., 1995). En la Figura 6 se representa el curso temporal de la frecuencia cardiaca, como latidos/minuto (lpm), de las ratas control y las tratadas con octilguanidina (OG); se observa que durante el periodo de isquemia en ambos grupos no se presentó diferencia alguna ( $391 \pm 112$  para las ratas control; y  $362 \pm 43$  para las tratadas). Durante el periodo de reperfusión, la frecuencia cardiaca de las ratas control aumentó notablemente (Tabla I). La concentración de OG que se empleó (15 mg/kg) ocasionó la recuperación del funcionamiento cardiaco, al utilizar concentraciones menores (5 y 10 mg/kg) no se observó mejoría, y el manejo de concentraciones mayores (20 mg/kg) no cambió los registros obtenidos con 15 mg/kg.

Tabla I			
Comparación de la frecuencia cardiaca (latidos/minuto).			
Periodo	Ratas control	Ratas tratadas OG 15 mg /kg	P
<b>Isquemia</b>	$391 \pm 112$	$362 \pm 43$	NS
<b>Reperfusión</b>			
Minuto 1	$627 \pm 227$	$456 \pm 79$	NS
Minuto 2	$621 \pm 133$	$383 \pm 106$	NS
Minuto 3	$763 \pm 136$	$341 \pm 83$	<0.001
Minuto 4	$752 \pm 165$	$306 \pm 41$	<0.001
Minuto 5	$620 \pm 101$	$320 \pm 41$	<0.001



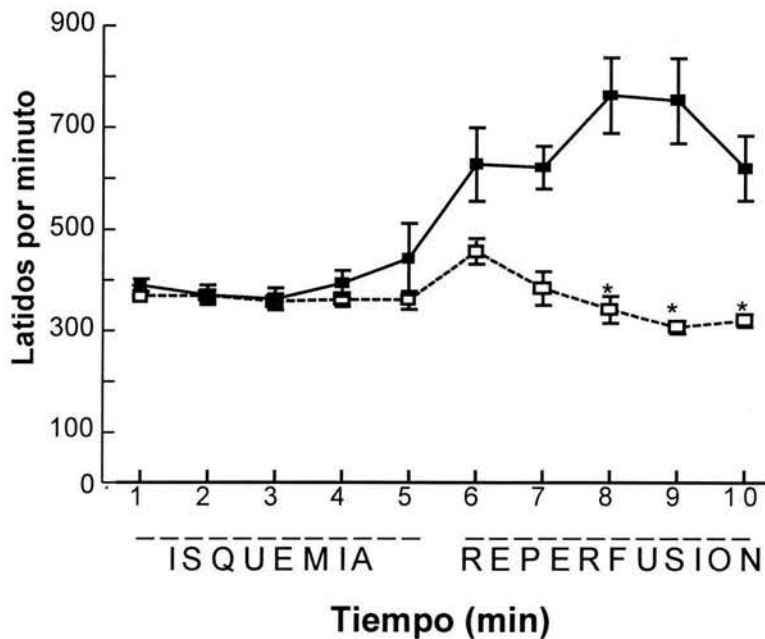


Figura 6. Curso temporal de la frecuencia cardiaca. Las ratas control aparecen en cuadros negros y las tratadas con OG en cuadros blancos. Se muestra el momento de la oclusión (min. 1) y el inicio de la reperfusión (min. 5). Durante la isquemia no hubo diferencias entre ambos grupos. En la reperfusión las ratas tratadas se mantuvieron estables y en las ratas control se elevó la frecuencia cardiaca significativamente (\* $P < 0.001$ ). Se grafica la media  $\pm$  DE.

En el caso de las ratas tratadas, la frecuencia cardiaca sólo tuvo un ligero aumento en el primer minuto de la reperfusión, con una tendencia a mantenerse estable durante todo el experimento. En el periodo de isquemia los trastornos de la repolarización ventricular fueron evidentes; sin embargo, al momento de desligar la arteria coronaria, aparecieron las taquiarritmias ventriculares propias de la reperfusión (Fig. 7A y Fig. 8), y se mantuvieron hasta el final del experimento. En muchos de los experimentos estas taquiarritmias degeneraron a fibrilación ventricular, con la pérdida de la tensión arterial (Fig. 9) en las ratas control.

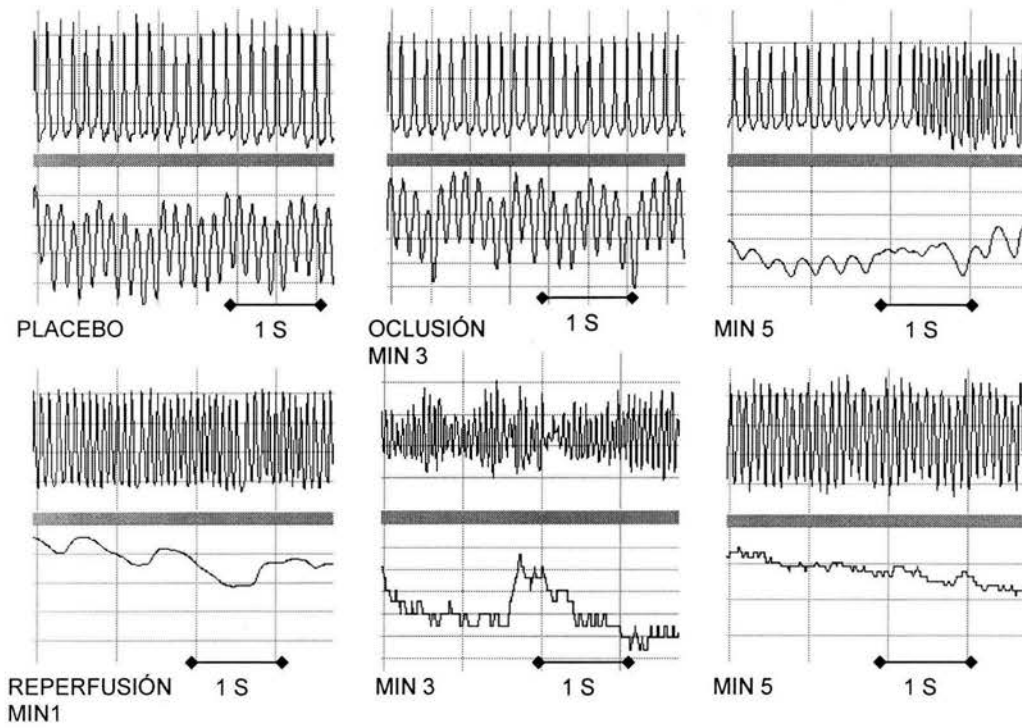


Figura 7A. Trazo electrocardiográfico y de la tensión arterial de una rata no tratada. La taquiarritmia de reperfusión degenera a fibrilación ventricular

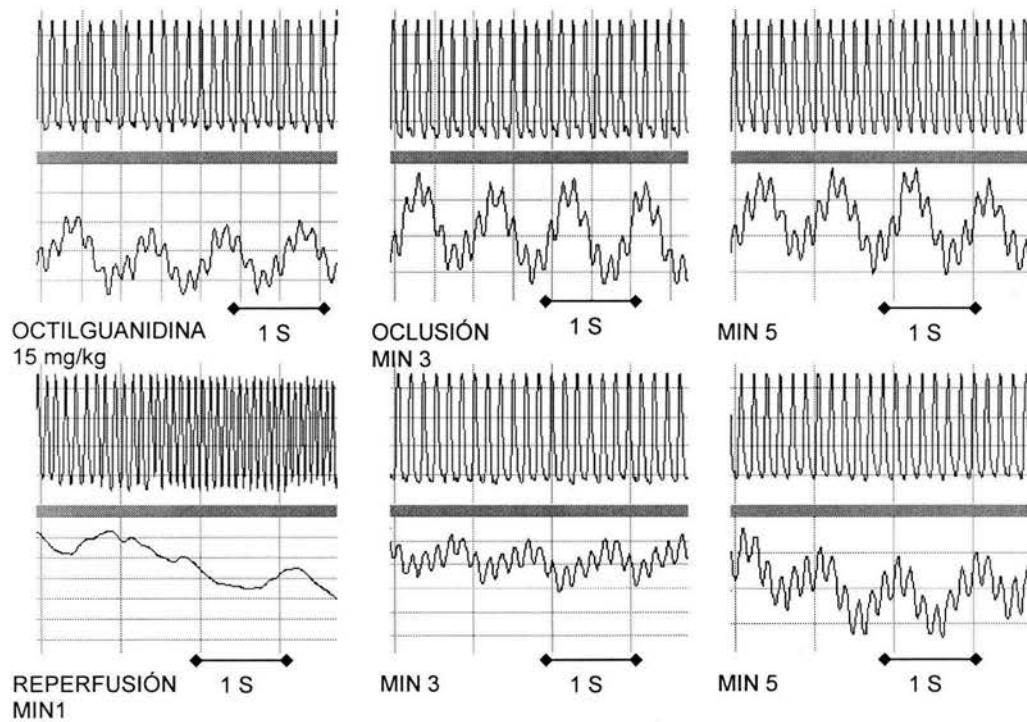


Figura 7B. Trazo electrocardiográfico y de la tensión arterial de una rata tratada con octilguanidina. La taquiarritmia de reperfusión no degenera en fibrilación ventricular

En el caso de las ratas a las que se les administró OG, durante la reperfusión se observaron taquiarritmias ventriculares en cada uno de los 5 minutos en que se registró el fenómeno (Fig. 7B y Fig. 8); sin embargo, al final del experimento se estableció un ritmo sinusal normal. Debe hacerse notar que en comparación de las ratas control, el ritmo cardiaco o electrocardiograma de las ratas tratadas no degeneraron en fibrilación ventricular. La curva de tensión arterial se mantuvo estable hasta el final del experimento en las ratas tratadas, a pesar de que durante la reperfusión la tensión arterial se deprimió ligeramente (Fig. 9); esto toma importancia, al compararlo con el grupo control, en donde la presencia de arritmias ventriculares deprime considerablemente la señal de tensión arterial.

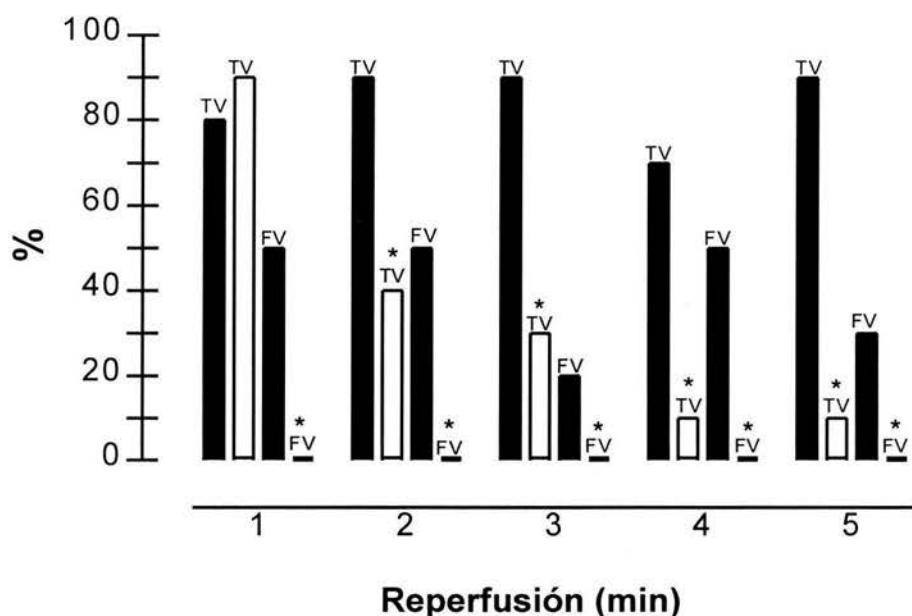


Figura 8. Incidencia de arritmias ventriculares registradas minuto a minuto durante la reperfusión. Ratas control en barras negras y ratas tratadas con OG en barras blancas. Se observa que la OG disminuyó la incidencia de taquicardias ventriculares y evitó la aparición de fibrilaciones ventriculares. Existen diferencias estadísticamente significativas (\* $P < 0.05$ ). Método de evaluación distribución Z. TV: Taquicardia Ventricular. FV Fibrilación Ventricular.

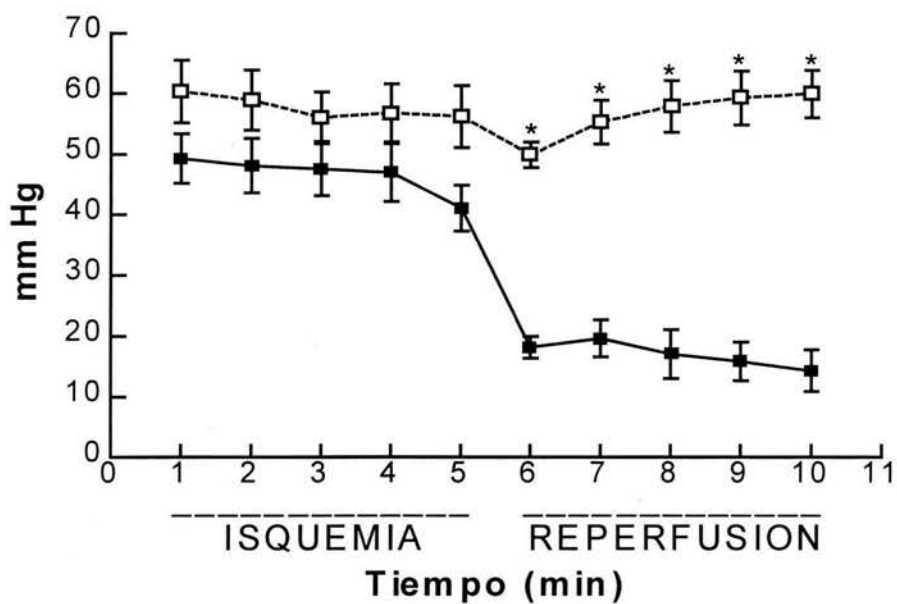


Figura 9. Curso temporal de la tensión arterial. Las ratas control aparecen en cuadros negros y las tratadas con OG en cuadros blancos. Se muestra el momento de la oclusión (min. 1) y el inicio de la reperusión (min. 5). Durante el periodo de isquemia no se presentan diferencias entre ambos grupos. En cambio durante la reperusión las ratas tratadas evitan la caída de la tensión arterial a comparación del control en donde se deprime la curva importantemente (\* $P < 0.05$ ). Se grafica la media  $\pm$  DE.

La Figura 10 muestra la disminución del tiempo de las arritmias ventriculares en el grupo de ratas tratadas registradas minuto a minuto durante la reperusión. Existe una diferencia significativa en los últimos tres minutos, en los cuales estas arritmias disminuyeron considerablemente. Es importante señalar que las taquiarritmias se presentaron, en ambos grupos, durante los cinco minutos del experimento, pero su presencia se redujo en el grupo tratado con OG, excepto en el primer minuto en donde la presencia de las taquicardias ventriculares fue ligeramente mayor incidencia que en el grupo control (Fig. 8).

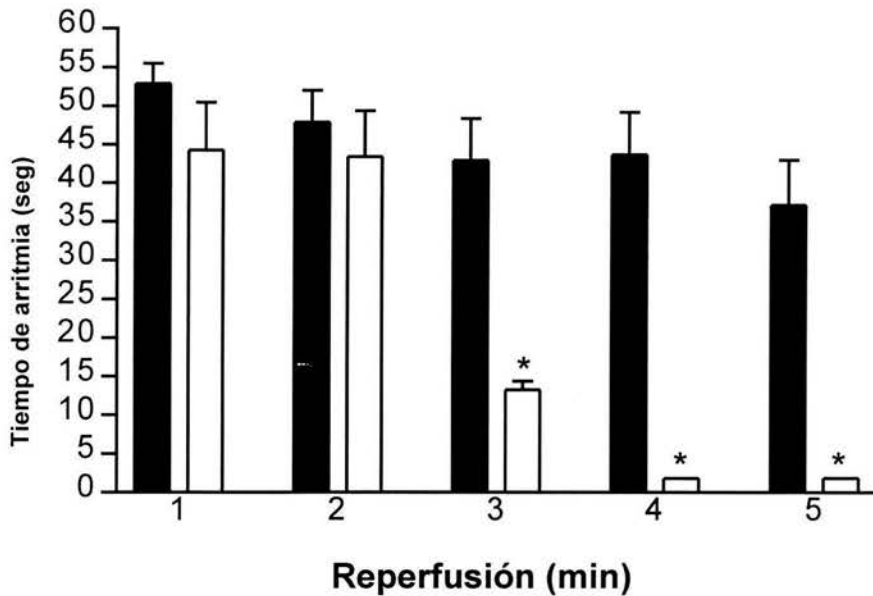


Figura 10. Tiempo de arritmias minuto a minuto de la reperfusion en ratas no tratadas (columnas negras) y tratadas (columnas blancas). La diferencia fue significativa en los minutos 3, 4, y 5 (\* $P < 0.01$ ).

El experimento que se muestra en la Figura 11 se desarrolló para evaluar el área de isquemia en las muestras, *Panel B* y *C*, del ventrículo izquierdo de ratas control y tratadas. Así mismo, se valoró la integridad estructural del ventrículo durante la reperfusion, *Panel D-I*. Como se ilustra en la autorradiografía en el corazón no isquémico el  $^{201}\text{Tl}$  se distribuyó uniformemente (*Panel A*). Por el contrario, en los corazones sometidos a isquemia, la marca radiactiva no se observa (*Panel B* y *C*). Durante la reperfusion el tejido cardiaco de ratas tratadas con OG captaron el radionúclido y lo distribuyeron uniformemente (*Panel E, G* e *I*), en comparación con el tejido de ratas control que debido al daño celular ocasionado por la isquemia no fueron capaces de captarlo (*Panel D, F* y *H*).

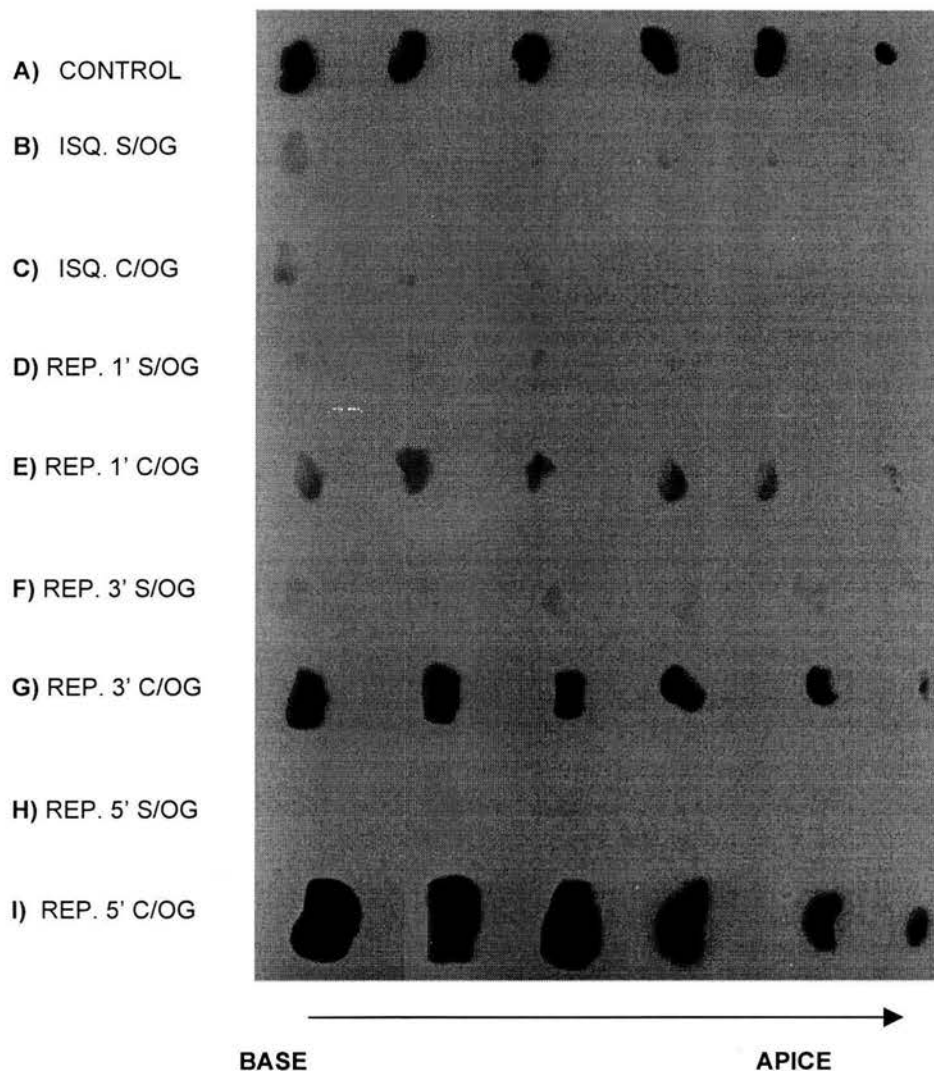


Figura 11. Autorradiografía de ventrículo izquierdo marcado con  $^{201}\text{Tl}$  de ratas control, no tratadas (S/OG) y tratadas (C/OG), durante el periodo de isquemia y reperfusión. Se observa que a pesar del daño ocasionado por la isquemia las ratas tratadas con OG conservan su integridad estructural. ISQ: Isquemia. REP: Reperfusion.

La Figura 12 muestra el control respiratorio (CR) de las mitocondrias aisladas del ventrículo izquierdo del corazón. En estos experimentos se utilizó succinato como sustrato respiratorio ya que las mitocondrias tratadas con OG tienen una mejor respiración (Chappel, 1963; Davidoff, 1974). Como se puede observar, las mitocondrias de las ratas tratadas alcanzaron un CR similar al que presentan las ratas del grupo control; en cambio, las mitocondrias de ratas no tratadas tienen un control respiratorio menor, observándose diferencias entre los grupos.

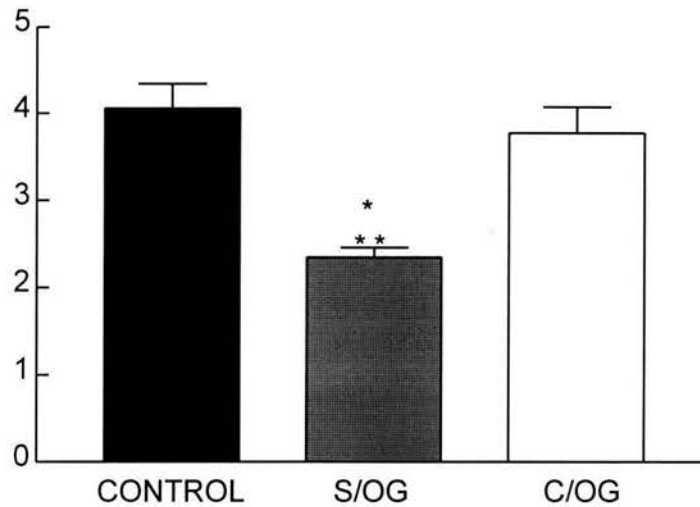


Figura 12. Control respiratorio de mitocondrias aisladas de tejido cardico. Ratas control (Basal), no tratadas (S/OG) y ratas tratadas (C/OG). Se observa que las mitocondrias de ratas tratadas conservaron su capacidad fosforilante. La diferencia fue estadisticamente significativa \* $P < 0.001$  vs Control, \*\* $P < 0.001$  vs tratadas.

El análisis histológico de la pared libre del ventrículo izquierdo es similar a los datos reportados (Chávez y cols., 1996) La microscopía de luz muestra un tejido miocárdico normal en los animales control (Fig. 13 A) en contraste con el gran daño observado el tejido de ratas sometidas a reperfusión post-isquémica (Fig. 13 B). En estos tejidos se puede ver congestión vascular, edema, que causa la separación de las fibras miocárdicas, pérdida de la estriación, elongación de las fibras y acidofilia citoplásmica. En el grupo de ratas que recibieron el tratamiento con octilguanidina, el daño se revirtió considerablemente. La Figura 13 C muestra la estriación normal de las fibras miocárdicas y ausencia de edema, pero también se observa un poco de congestión vascular.

La microscopía electrónica reveló diferencias importantes entre los tres grupos. La Figura 14 A muestra una buena conservación de las líneas Z en las miofibrillas y la preservación de la matriz mitocondrial. En las ratas sometidas a reperfusión post-isquémica se observan las líneas Z alargadas, ruptura de las miofibrillas, hinchamiento mitocondrial acompañado espacios claros en la matriz en algunas de ellas, y depósitos electrodensos en la matriz mitocondrial (Fig. 14 B). Las ratas a las cuales se les administró octilguanidina conservan la distancia entre las líneas Z, las miofibrillas no sufren rompimiento, y

desaparecen los espacios claros en la matriz mitocondrial, aunque las mitocondrias muestra un ligero hinchamiento (Fig. 14 C).

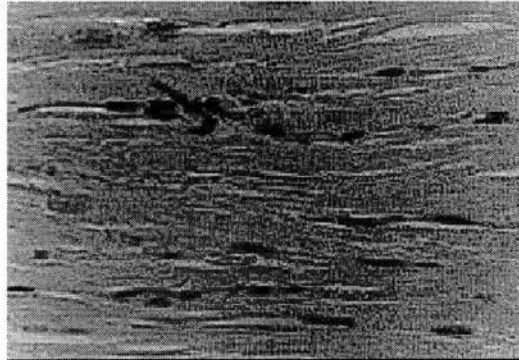


Figura 13 A. Corte histológico de tejido cardiaco de ratas control. Se observan fibras con estriación normal, sin presencia de edema. (H-E, 40X).

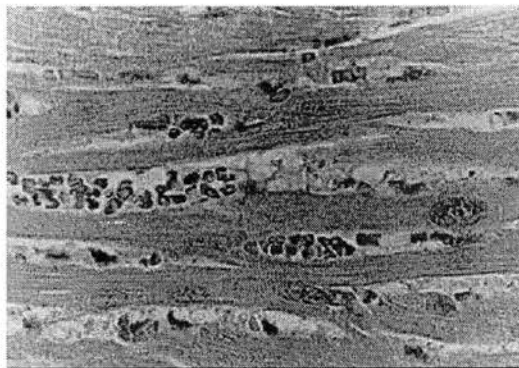


Figura 13 B. Corte histológico de tejido cardiaco de ratas con reperfusion post-isquemica. Se muestra edema, separación de fibras miocárdicas, y congestión vascular. (H-E, 40X).

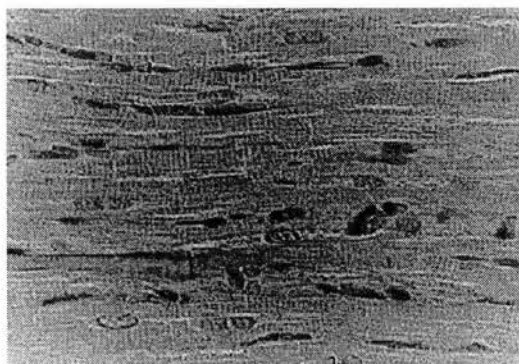


Figura 13 C. Corte histológico de tejido miocárdico de ratas tratadas con octilguanidina. Se observa un ligero foco de congestión vascular, aunque las fibras cardiacas recuperan su estriación y constitución normal. (H-E, 40X).





Figura 14 A. Microscopía electrónica de la pared libre del ventrículo izquierdo de rata control. Las fibras miocárdicas son de tamaño regular en los sarcomeros y las mitocondrias muestran su estructura normal. (Acetato de uranilo, 5000X).

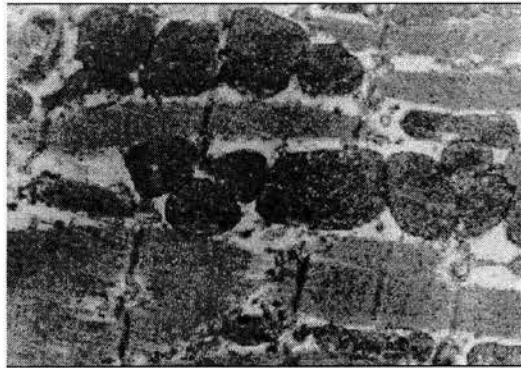


Figura 14 B. Hallazgos ultraestructurales en corazón de rata sometida a reperusión post-isquémica. Se observa la ruptura de miofibrillas, hinchamiento mitocondrial con áreas claras en la matriz, alargamiento de las fibras Z y grandes espacios entre fibras y mitocondrias. Así mismo, cuerpos densos granulados en todo el tejido. (Acetato de uranilo, 5000X).

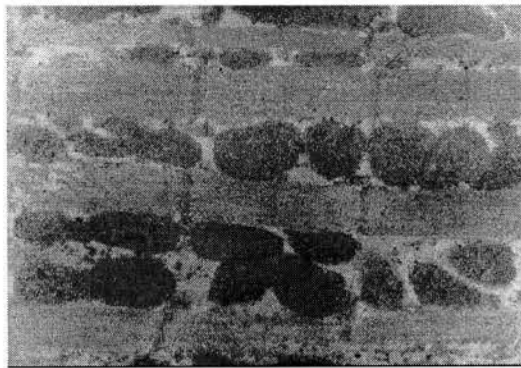


Figura 14 C. Imagen ultraestructural de rata tratada con octilguanidina. Se muestra la recuperación de la forma normal de los sarcomeros, del tamaño de las líneas Z, pero las mitocondrias están ligeramente hinchadas y presentan algunos cuerpos densos. (Acetato de uranilo, 5000X).

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## DISCUSIÓN

En este estudio se evaluaron los efectos del catión anfifílico octilguanidina (OG) sobre el daño inducido por reperfusión post-isquémica. Los resultados muestran que la OG administrada 10 minutos antes de la reperfusión protege de manera efectiva al corazón de la aparición de arritmias ventriculares severas.

Se conoce que la transición de la permeabilidad mitocondrial está implicada en la patogénesis del daño por reperfusión (Crompton y cols 1987; Crompton y Costi, 1990; Arteaga y cols., 1992; Gunter y cols., 1994; Crompton, 1999) y se acepta que este daño, ocasionado en varios órganos y tejidos, se debe a la sobrecarga de calcio y a la liberación de radicales libres derivados del oxígeno (Opie, 1989; Gunter y Pfeiffer, 1990; Dhalla y cols., 1999).

En el corazón, las manifestaciones de daño por reperfusión son múltiples identificándose de manera inmediata la arritmia y la falla de la función contráctil (Manning y cols., 1984).

La protección de la mitocondria contra el estrés oxidativo o la permeabilización dependiente de calcio resulta en la preservación tisular. Altschuld (1992) y Arteaga (1992) demostraron que la ciclosporina A previene el daño por reperfusión post-isquémica al bloquear un poro inespecífico en la mitocondria (Fournier y cols., 1987). Chávez y cols. (1996), encontraron que el ketorolac, con su acción quelante de  $\text{Ca}^{2+}$ , evita la sobrecarga de este y protege a las células del miocardio. La falta de daño por reperfusión observada en los corazones de ratas tratadas con OG se debe a que las mitocondrias no experimentan permeabilidad inducida por  $\text{Ca}^{2+}$  (Chávez y cols., 2000).

Esta resistencia se debe a que la OG impide la apertura del poro de transición de la permeabilidad en las mitocondrias y de esta forma también el intercambio de  $\text{Ca}^{2+}$  a través de él lo cual aumenta el daño por reperfusión. Un buen ejemplo de ello es la isquemia-reperfusión cardíaca en donde la sobrecarga de calcio es el factor principal que desencadena la arritmia cardíaca (Miyata y cols., 1992; Brooks y cols., 1995). En este estudio se demostró que la OG previene la muerte celular por reperfusión post-isquémica.

El exceso de calcio es dañino para los miocitos puesto que aumenta la permeabilidad mitocondrial, desacopla la fosforilación oxidativa alterando la producción de ATP y de esta forma conduciendo a la muerte celular (Veit y cols., 1985). Ferrari y cols., (1989), demostraron que la utilización de drogas que eviten la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$  en tejido cardiaco sujeto a reperfusión mantiene una adecuada fosforilación mitocondrial. Los resultados con OG relacionados con fosforilación oxidativa corresponden a los obtenidos por Crompton y cols. (1988) que al utilizar ciclosporina A se mejora la fosforilación oxidativa y se preserva las células del tejido cardiaco.

Nuestros resultados apoyan la teoría que la OG mejora las alteraciones miocárdicas regulando el movimiento de calcio más que el efecto dañino producido por ROS como lo observo Dhalla y cols. (1999). La OG, que tiene efectos demostrados sobre la apertura del poro de transición (Chávez y cols., 2000), inhibe los efectos patológicos, en gran manera los histológicos y muy claramente los de la reperfusión sobre la fisiología de las mitocondrias aisladas, apoyando de esta forma que el mecanismo de las alteraciones por reperfusión tienen más que ver con los movimientos de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Por último, en el momento actual se están valorando compuestos en cuya estructura se encuentran grupos guanido, como el HOE 694 [(3-metilsulfonil-4-piperidinobenzoil)guanidina metasulfonato), en la protección del daño ocasionado por la sobrecarga de calcio en isquemia-reperfusión (Wajima y cols., 2004), como se observo en el caso de la OG el cual puede ser considerado, con un mejor análisis de sus efectos e implicaciones fisiológicas, como una alternativa en la terapia de daño cardiaco.

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

El hecho de que la octilguanidina sea capaz de disminuir el tiempo de arritmias ventriculares, prevenir la aparición de fibrilación ventricular, mejorar la función contráctil del corazón y preservar la estructura miocárdica, sugiere que este compuesto evita la inestabilidad eléctrica cardíaca ocasionada por la reperfusión post-isquémica. Por otro lado el que la octilguanidina permita que las mitocondrias mantengan un adecuado estado fosforilante indica que la integridad estructural del tejido está respetada. Nuestros resultados demuestran el catión anfifílico octilguanidina protege a las células del miocardio contra las lesiones ocasionadas por la reperfusión posterior a un periodo de isquemia debido a que evita la sobrecarga de  $\text{Ca}^{2+}$ .

Finalmente, como una perspectiva interesante se podría ver si la octilguanidina evita o no la formación de radicales libres, lo cual permitiría saber si estos aparecen como un efecto de la reperfusión o de la anoxia, o hasta pudieran ser efectos secundarios a las alteraciones mitocondriales y celulares por los movimientos del calcio.

## BIBLIOGRAFIA

- Akerman KE, Nicholls D (1983). Physiological and bioenergetic aspects of mitochondrial calcium transport. *Rev Physiol Biochem Pharmacol* 95:150-193.
- Altschuld RA, Hohl CM, Castillo LC, Garleb AA, Starling RC, Brierley GP (1992). Cyclosporin inhibits mitochondrial calcium efflux in isolated adult rat ventricular cardiomyocytes. *Am J Physiol* 262:H1699-H1704.
- Arteaga D, Odor A, López RM, Contreras G, Pichardo J, García E, Aranda A, Chávez E (1992). Impairment by cyclosporin A of reperfusion-induced arrhythmias. *Life Sciences* 51:1127-1134.
- Asano G, Takashi E, Ishiwata T, Onda M, Yokoyama M, Naito Z, Ashraf M, Sugisaki Y.(2003). Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium. *J Nippon Med Sch* 70:384-92.
- Banerjee A, Grosso MA, Brown JM, Rogers KB, Whitman JR (1991). Oxygen metabolite effects on creatine kinase and cardiac energetics after reperfusion. *Am J Physiol* 261:H590-H597.
- Baysal K, Jung KK, Gunter KK, Gunter TE, Brierley GP (1994). Na<sup>+</sup>-dependent Ca<sup>2+</sup> efflux mechanisms of heart mitochondria is not a passive Ca<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchanger. *Am J Physiol* 266:C800-C805.
- Benzi HR, Lerch R (1992). Dissociation between contractile function and oxidative metabolism in postischemic myocardium. *Circulation Research* 71:567-576.
- Bernardi P (1999). Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers and permeability transition. *Physiol Rev* 79:1127-1155.
- Bernardi P, Broekemeier K, Pfeiffer DR (1994). Recent progress on regulation of the mitochondrial permeability transition pore: a Cyclosporin-sensitive pore in the inner mitochondrial membrane. *J Bioenerg Bioembr* 26:509-517.
- Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2000). The versatility and universality of calcium signaling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1:11-21.
- Bindoli A, Callegaro MT, Barzon E, Benetti M, Rigobello P (1997). Influence of the redox state of pyridine nucleotides on mitochondrial sulfhydryl groups and permeability transition. *Arch Biochem Biophys* 342:22-28.
- Bobadilla I, Franco M, Cruz D, Zamora J, Robles SG, Chávez E (2001). Hypothyroidism provides resistance to reperfusion injury following myocardium ischemia. *Int. J Biochem Cell Biol* 33:499-506.
- Brooks WW, Conrad CH, Morgan JP (1995). Reperfusion induced arrhythmias following ischaemia in intact rat heart: role of intracellular calcium. *Cardiovascular Research* 29:536-542.
- Brustovetsky N, Klingenberg M (1996). Mitochondrial ADP/ATP carrier can be reversibly converted into a large channel by Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry* 35:8483-8488.
- Carafoli E (1987). Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 56:395-433.
- Castelli WP, Garrison RD, Dawber TR, McNamara PM, Feinleib M, Kannel WB. (1981). The filter cigarette and coronary heart disease.: The Framingham story. *Lancet* 2:109-113

- Castilho RF, Hansson O, Wrad MW, Budd SL, Nichols DG (1998). Mitochondrial control of acute glutamate excitotoxicity in cultured cereberal granule cells. *J Neurosc* 18:10277-286.
- Chance B, William GR (1965). The respiratory chain and oxidative phosphorylation. *Adv Enzymol* 17:65-134.
- Chappell JB (1963). The effects of alkylguanidines on mitochondrial metabolism. *J Biol Chem* 238:410-417.
- Chávez E, Franco M, Reyes-Rivas H, Zazueta C, Ramírez J, Carrillo R (1998). Hypothyroidism renders liver mitochondria resistant to the opening of membrane permeability transition pore. *Biochimica et Biophysica Acta* 1407:243-248.
- Chávez E, Meléndez E, Zazueta C, Reyes-Rivas H, Perales S (1997). Membrane permeability transition as induced by disfunction of the electron transport chain. *Biochem Mol Biol Int* 41:961-968.
- Chávez E, Peña A, Zazueta C, Ramírez J, García N (2000). Inactivation of mitochondrial permeability transition pore by octylguanidine and octylamine. *J Bioenerg Bioemembr* 32:193-198.
- Chávez E, Téllez F, Pichardo J, Milán R, Cuellar A, Carvajal K, Cruz D (1996). On the protection by ketorolac of reperfusion-induced heart damage. *Comp Biochem Physiol* 115C:95-100.
- Chávez E, Zazueta C (1998). Cyclosporin, from clinical to basic research. *Curr Op Pharm* 4:183-192.
- Chávez R, Bravo C, Zazueta C, Pichardo J, Uribe A, Corona N, Reyes-Vivas H, González C, Chávez E (1993). Ionophoretic-like properties of ketorolac for calcium. *J Pharm Exp Ther* 267:1134-1139.
- Connern CP, Halestrap AP (1994). Recruitment of mitochondrial cyclophilin to the mitochondrial inner membrane under conditions of oxidative stress that enhance the opening of a calcium sensitive non-specific channel. *Biochem J* 302:321-324.
- Crompton M (1999). The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 341:233-249.
- Crompton M (2000). Mitochondrial intermembrane junctional complexes and their role in cell death. *J Physiol* 529:11-21.
- Crompton M, Andreeva L (1993). On the involment of a mitochondrial pore in reperfusion injury. *Basic Res Cardiol* 88:513-523.
- Crompton M, Costi A (1990). A heart mitochondrial  $Ca^{2+}$ -dependent pore of possible relevance to reperfusion-induced injury. *Biochem J* 266:33-39.
- Crompton M, Costi A, Hayat L (1987). Evidence for the presence of a reversible  $Ca^{2+}$ -dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 245:915-918.
- Curtis MJ, Macleod BA, Walkwr MJ (1987). Models for the study of arrhythmias in myocardial ischemia and infarction: the use of the rata. *J Mol Cell Cardiol* 19:399-419.
- Davidoff F (1974). Effects of guanidine derivates on mitochondrial function. *J Biol Chem* 249:6406-6415.
- Denton R, McCormack J (1990).  $Ca^{2+}$  as a second messenger within mitochondria of the heart and other tissues. *Ann Rev Physiol* 52:451-466.
- Dhalla NJ, Golfman L, Takeda S, Takeda N, Nagano M (1999). Evidence for the role of oxidative stress in acute ischemic heart disease: a brief review. *Can J Cardiol* 15:587-593.

- Dubinsky JM, Levi Y (1998). Calcium-induced activation of the mitochondrial permeability transition in hippocampal neurons. *J Neurosc Res* 53:728-741.
- Eckel RH, Krauss RM. (1998). American Heart Association call to action: obesity as a major risk factor. *Circulation* 97:2099-2100.
- Engler RL, Dahlgren MD, Morris DD (1986). Role of leukocytes in response to acute myocardial ischemia and reflow in dogs. *Am J Physiol* 251:H314-H322.
- Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, Agnoletti G, Boffa M, Visioli O (1986). Intracellular effects of myocardial ischaemia and reperfusion: role of calcium and oxygen. *European Heart Journal* 7(suppl A):3-12
- Ferrari R, Pedersini P, Bongrazio M, Gaia G, Bernocchi P, Di Lisa F, Visioli O (1993). Mitochondrial energy production and cation control in myocardial ischaemia and reperfusion. *Basic Res Cardiol* 88:495-512.
- Fletcher GF, Balady G, Blair SN, Blumenthal J, Caspersen C, Chaitman B, Epstein S, Sivarajan Froelicher ES, Froelicher VF, Pina IL, Polluck MZ. (1996). Statement on exercise: benefits and recommendations for physical activity. *Circulation* 94:857-862.
- Fournier N, Ducet G, Crevat A (1987). Action of ciclosporine on mitochondrial calcium fluxes. *J Bioenerg Biomembr* 19:297-303.
- Fuster V, Alexander RW, O'Rourke RA, Roberts R, King SB, Wellens HJ. (2001). Hurst's The Heart. *McGraw Hill* 10<sup>th</sup> Edition Volume 1
- Gettes LS, Cascio WE, Jonhsan T, Fleet WF (1991). Local myocardial biochemical and ionic alterations during myocardial ischaemia and reperfusion. *Drugs* 47 (suppl 1):7-13.
- Grundy SM, Benjamin IJ, Burke GL, Chait A, Eckel RH, Howard BV, Mitch W, Smith SC Jr, Somers JR. (1999). Diabetes and cardiovascular disease: a statement for healthcare professionals from the American Heart Association. *Circulation* 100:1134-1146.
- Guadalajara JF (1991). *Cardiología*. 4ta. Ed. Méndez Cervantes. México. P. 1322.
- Gunter TE, Buntinas LS, Sparagna GG, Gunter KK (1998). The Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms of mitochondria and Ca<sup>2+</sup> uptake from physiological-type Ca<sup>2+</sup> transients. *Biochim Biophys Acta* 1366:5-15.
- Gunter TE, Gunter KK Sheu SS, Gavin CE (1994). Mitochondrial calcium transport: physiological and pathological relevance. *Am J Physiol* 267:C313-C339.
- Gunter TE, Pfeiffer DR (1990). Mechanism by which mitochondria transport calcium. *Am J Physiol* 258:C755-C786.
- Haffner SM, Lehti S, Ronnema T, Pyorala K, Laakso M. (1998). Mortality from coronary heart disease in subjects with type 2 diabetes and in nondiabetic subjects with and without prior myocardial infarction. *N Engl J Med* 339:229-234.
- Hajnóczky G, Davies E, Madesh M (2003). Calcium signaling and apoptosis. *Biochim Biophys Res Comm* 304:445-454.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, Woodfiel KY (1998). Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1366:79-94.

- Halestrap AP, Woodfiel KY, Connern CP (1997). Oxidative stress, thiol reagents and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 272:3346-3354.
- Hansford R (1994). Physiological role of mitochondrial calcium transport. *J Bioenerg Biomembr* 26:495-508.
- Hinata M, Yamamura H, Li L, Watanabw Y, Watano T, Imaizumi Y, Kimura J (2002). Stoichiometry of Na<sup>+</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange is 3:1 in guinea-pig ventricular myocytes. *J Physiol* 545:453-461.
- Hopkins PN, Willwams RR. (1989). Human genetics and coronary heart disease: a public health perspective. *Annu Rev Nutr* 9:303-345.
- Hunter PR, Haworth RA (1979). The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria. III. Transitional Ca<sup>2+</sup> release. *Arch Biochem Biophys* 195:468-77.
- Hüser J, Blatter LA (1999). Fluctuations in mitochondrial membrane potential caused by repetitive gating of the permeability transition pore. *Biochem J* 343:311-317.
- Krieger C, Duchen MR (2002). Mitochondria, Ca<sup>2+</sup> and neurodegenerative disease. *Eur J Pharmacol* 447:177-188.
- Kroemer G, Reed JC (2000). Mitochondrial control of cell death. *Nat Med* 6:513-519.
- Krzesinski JM, Carlier PG, Rorive GL (1988). Interrelationship of hypertension, plasma lipids and atherosclerosis. *Drugs* 36(suppl 2):18-26.
- LêQuốc D, LêQuốc K (1989). Relationships between the NAD(P) redox state, fatty acid oxidation an inner membrane permeability in rat liver mitochondria. *Arch Biochem Biophys* 273:466-478.
- Low RI, Takeda P, Mason DT, De Maria AN (1982). The effects of calcium channel blocking on cardiovascular function. *Am J Cardiol* 49:547-53.
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall RJ (1951). Protein measurements with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 194:265-275.
- Lucchesi BR (1990). Modulation of leukocyte-mediated myocardial reperfusion injury. *Annu Rev Physiol* 52:561-576.
- MacMahon S, Peto R, Cutler J, Collins R, Sorlie P, Neaton J, Abbott R, Godwin J, Dyer A, Stanler J. (1990). Blood pressure, stroke and coronary heart disease: Pat 1. Prolonged differences in blood pressure: Prospective observational studies corrected for the regression dilution bias. *Lancet* 335:765-774.
- Manning AS, Singal PK, Hearse DJ (1984). Reperfusion-induced arrhythmias in the rat: mechanisms and prevention. *J Mol Cell Cardiol* 16:497-51.
- Massey KD, Burton KP (1989). Alfa-tocoferol attenuates myocardial membrane-related alterations resulting from ischaemia and reperfusion. *Am J Physiol* 256:H1192-H1199.
- Matsuaka S (2002). Stoichiometry of the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger: models and implications. *Ann N Y Acad Sci* 976:121-132.
- Maxwell SRJ (1995). Prospect for the use of antioxidant therapies. *Drugs* 49:345-361.
- McStay GP, Clarke SJ, Halestrap AP (2002). Role of critical groups on the matrix surface of the adenine nucleotide translocase in the mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochem J* 367:541-548.



- Milanick MA (1990). Proton fluxes associated with Ca pump in human red blood cells. *Am J Physiol* 258:C552-C562.
- Mitchell LB, Schoroeden JS, Mason JW (1982). Comparative clinical electrophysiologic effects of diltiazem, verapamil and nifedipine: a review. *Am J Cardiol* 49:629-635.
- Mitchell MB, Winter CB, Banarjee A, Harken AH (1993). Inhibition of sarcoplasmic reticulum calcium release reduces myocardial stunning. *J Surg Res* 54:411-417.
- Miyata H, Lakatta EG, Stern MD, Silverman H (1992). Relation mitochondrial and cytosolic free calcium to cardiac myocyte recovery after exposure to anoxia. *Circulation Res* 71:605-613.
- Moreno-Sanchez R (1985). Contribution of the translocator of adenine nucleotides and the ATP synthase to the control of oxidative phosphorylation and arsenylation in liver mitochondria. *J Biochem Chem* 260:12554-12560.
- Moreno-Sánchez R, Hansford R (1988). Relation between cytosolic free calcium and respiratory rates in cardiac myocytes. *Am J Physiol* 171:374-388.
- National Cholesterol Education Program. Second report of the Expert Panel on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults. (1994) *Circulation* 89:1333-1445.
- Nayler WG (1991). Basic mechanisms involved in the protection of the ischemic myocardium. The role of the calcium antagonist. *Drugs* 42:21-27.
- Nicholls DG, Crompton M (1980). Mitochondrial calcium transport. *FEBS Letters* 111:261-268.
- Opie LH (1989). Reperfusion injury and its pharmacological modification. *Circulation* 80:1049-1062.
- Peterson DA, Asinger RW, Elsperger KJ, Homans DC, Eaton JW (1985). Reactive oxygen species may cause myocardial reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Comm* 127:87-93.
- Przyklenk K, Kloner RA (1986). Superoxide dismutase plus catalase improve contractile function in the canine model of the stunned myocardium. *Cir Res* 58:148-156.
- Pyke DD, Chan AC (1990). Effects of vitamin E on prostacyclin release and lipid composition of the ischemic rat heart. *Arch Biochem Biophys* 277:429-433.
- Richardt G, Haass M, Schömig A (1991). Calcium antagonists and cardiac noradrenaline release in ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 23:269-277.
- Richter C (1993). Pro-oxidants and mitochondrial Ca<sup>2+</sup>: their relationship to apoptosis and oncogenesis. *FEBS Lett* 325:104-107.
- Richter C, Sxhweizer M, Cossarizz A, Franceschi C (1995). Control of apoptosis by the cellular ATP level. *FEBS Lett* 378:107-110.
- Rimm EB, Giovannucci E, Willett WC, Colditz GA, Aschei A, Rosner B, Stampfer MJ. (1991). Prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke in men. *Lancet* 338:464-468.
- Roden DM, George AL Jr (1996). The cardiac ion channels: relevance to management of arrhythmias. *Annu Rev Med* 47:135-148.
- Rück A, Dolder M, Wallimann T, Brdiczka D (1998). Reconstituted adenine nucleotide translocase forms a channel for small molecules comparable to the mitochondrial permeability transition pore. *FEBS Lett* 426:97-101.

- Schömig A, Haass M, Richardt G (1991). Catecholamine release and arrhythmias in acute myocardial ischaemia. *Eur Heart J* 12(Suppl F):38-47.
- Schömig A, Rehmert G, Kurz T, Richardt G (1992). Calcium antagonism and norepinephrine release in myocardial ischemia. *J Cardiovasc Pharmacol* 20 (Suppl 7):S16-S20.
- Shekelle RB, Stamler J. (1989). Dietary cholesterol and ischaemic heart disease. *Lancet* 1:1177-1179.
- Silverman HS (1993). Mitochondria free calcium regulation in hypoxic and reoxygenation relation to cellular injury. *Basic Res Cardiol* 88:483-494.
- Smaili SS, Hsu YT, Carvalho ACP, Rosenstock TR, Sharpe SC, Youle RJ (2003). Mitochondria, calcium and pro-apoptotic proteins as mediators in cell death signaling. *Braz J Med Res* 36:183-190.
- SSA (2003). Principales causas de mortalidad en México. Estadísticas de Mortalidad, Secretaria de Salud Publica. <http://www.ssa.gob.mx/apps/htdocs/estadisticas/mortalidad/mortalidad.htm>
- Téllez F, Carvajal K, Cruz D, Cárabez A, Chávez E (1999). Effect of perezona on arrhythmias and markers of cell injury during reperfusion in the anesthetized rat. *Life Science* 65:1615-1623.
- Téllez F, Carvajal K, García C, Vázquez C, Chávez E y Moreno-Sánchez R (1996). Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia reperfusion en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex* 66:162-181.
- Veit J, Fuchs J, Zimmer G (1985). Uncoupler- and hypoxia-induced damage in the working rat heart and its treatment. *Basic Res Cardiol* 80:107-115
- Wajima T, Beguier B, Yaguchi M (2004). Effects of carapotide (HOE642) on myocardial infarct size and ventricular arrhythmias in a rat ischemia/reperfusion model: comparison with other drugs. *Pharmacology* 70:123-129.
- Walker MJA, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RWF, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Hrness JB, Harron DWG, Higgins AJ, Julian DG, Lab MJ, Mannng AS, Northover BJ, Parratt JR, Riemersma RA, Riva E, Russell DC, Sheridan, DJ, Winslow E, Woodward B (1980). The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia, infarction, and reperfusion. *Cardiovascular Res.* 47:1-9.
- Yamada EW, Huzel NJ (1989). Calcium-binding ATPase inhibitor protein of bovine heart mitochondria. Role in ATP synthesis and effect of Ca<sup>2+</sup>. *Biochemistry* 28:9714-9718.
- Zazueta C, Sánchez, García N, Correa F (2000). Posible involment of the adenine nucleotide translocase in the activation of the permeability transition pore induced by cadmium. *Int J Biochem Cell Biol* 32:1093-1101.
- Zucchi R, Yu G, Ghelardoni S, Ronca F, Ronca Testoni S (2001). A<sub>3</sub> adenosine receptor stimulation modulates sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> release in rat heart. *Cardiovasc Res* 50:56-64.