

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE BARCELONA
FACULTAD DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE BIOQUIMICA Y BIOLOGIA MOLECULAR

TESIS DOCTORAL

**MECANISMO DEL DAÑO MECANICO LETAL POR REOXIGENACION
EN MIOCITOS CARDIACOS**

realizada por:

MARISOL RUIZ-MEANA

Director:

DAVID GARCIA-DORADO GARCIA, Doctor en Medicina por la Universidad Complutense de Madrid.

Tutor:

MARGARITA SENTIS VILALTA, Doctora en Farmacia por la Universidad Central de Barcelona.

Servicio de Cardiología
Hospital General Vall d'Hebron
Universidad Autónoma de Barcelona

Diciembre de 1997

David Garcia-Dorado García, Doctor en Medicina y Jefe de Sección del Hospital Universitario Vall d'Hebron de Barcelona, y Margarita Sentís Vilalta, Doctora en Farmacia, Jefe de Servicio de Bioquímica y Hematología del Hospital Materno-Infantil Vall d'Hebron de Barcelona y Profesora Titular de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Barcelona,

CERTIFICAN:Que la Tesis Doctoral "Mecanismo del daño mecánico letal por reoxigenación en miocitos cardíacos", presentada por Marisol Ruiz-Meana para aspirar al grado de Doctor en Veterinaria, ha sido realizada bajo nuestra dirección.

Dr. David Garcia-Dorado

Dra. Margarita Sentís

Barcelona, 15 de Diciembre de 1997

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no se hubiera realizado sin el entusiasmo, la ayuda y la amistad del Dr. David Garcia-Dorado que, además de dirigir todo el trabajo experimental que aquí se presenta, ha participado personalmente en su realización. David me ha introducido en el campo de la investigación cardiovascular, trabajar a su lado ha sido (y es) muy importante para mí.

La Dra. Margarita Sentís no sólo ha aceptado ser Tutora de esta tesis, sino que ha realizado una lectura crítica de la misma que ha sido muy útil para mejorar su presentación final.

El Profesor H.M. Piper me ha enseñado a trabajar con miocitos aislados en el laboratorio de Fisiología de la Heinrich-Heine Universitat de Dusseldorf, y ha colaborado personalmente en la fabricación del primer sistema de Langendorff para aislamiento de miocitos que utilizamos en nuestro laboratorio, así como en la realización de los primeros experimentos. Por toda su ayuda le estoy especialmente agradecida.

Mis compañeros del Laboratorio B de Cardiología Experimental, José Barrabés, Miguel A. González, Margarita Julià, Yolanda Puigfel, Javier Inserte y Luis Agulló han colaborado de forma desinteresada en muchos aspectos concretos del trabajo experimental, y han hecho que este trabajo haya resultado agradable y enriquecedor.

Por último, quiero expresar mi gratitud a los compañeros del Laboratorio A de Cardiología Experimental, y a todo el Servicio de Cardiología del Hospital General Vall d'Hebron, por su apoyo y estímulo a la línea de investigación que ha dado lugar a esta tesis, y muy especialmente al Dr. J Soler-Soler por haber confiado en mí, y por su entusiasmo y eficacia en proporcionar la infraestructura necesaria para el desarrollo de estos proyectos.

INDICE

ABREVIATURAS UTILIZADAS	1
RESUMEN	2
I- INTRODUCCION	4
1. NECROSIS MIOCARDICA POR ISQUEMIA/REPERFUSION	6
1.1. Daño inducido por la isquemia	6
1.1.1. Acidosis e incremento del Na ⁺ intracelular.....	7
1.1.2. Edema celular asociado a la isquemia.....	9
1.1.3. Incremento del Ca ²⁺ intracelular.....	10
1.1.4. Fragilidad estructural.....	12
<i>Fragilidad osmótica (fragilidad del sarcolema)</i>	12
<i>Aumento de la susceptibilidad al Ca²⁺ (fragilidad del citoesqueleto)</i>	14
1.2. Daño inducido por la reperfusión	15
1.2.1. Hipercontractura.....	18
1.2.2. Edema celular asociado a la reperfusión.....	21
1.2.3. Generación de radicales libres derivados del oxígeno.....	24
1.2.4. Interacción celular.....	24
<i>Interacción celular en la isquemia/reperfusión</i>	24
<i>Gap Junctions</i>	25
2. CUESTIONES NO RESUELTAS	28
II- HIPOTESIS Y OBJETIVOS	29

1. HIPOTESIS.....	30
2. OBJETIVOS.....	31
III- METODOS Y RESULTADOS.....	33
<i>Effect of osmotic stress on sarcolemmal integrity of isolated cardiomyocytes following transient metabolic inhibition.</i>	
<i>Pre-treatment with Trimetazidine increases sarcolemmal mechanical resistance in reoxygenated myocytes.</i>	
<i>Protection of reoxygenated cardiomyocytes against osmotic fragility by nitric oxide donors.</i>	
<i>The gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion.</i>	
IV- DISCUSION.....	34
1. EFECTO DEL EDEMA OSMOTICO DURANTE LA REOXIGENACION.....	35
1.1. Estudios previos.....	36
1.2. Recuperación de la resistencia mecánica durante la reoxigenación.....	37
1.3. Consideraciones metodológicas.....	38
1.4. Conclusiones.....	38
2. FRAGILIDAD MECANICA ASOCIADA A LA ANOXIA.....	38
3. FRAGILIDAD MECANICA ASOCIADA A LA REOXIGENACION.....	40
3.1. Mecanismo de la protección contra la fragilidad osmótica.....	41
3.2. Implicaciones.....	42
4. PAPEL DE LA INTERACCION INTERCELULAR.....	42
4.1. Estudios previos.....	43
4.2. Progresión célula a célula de la hipercontractura.....	44
4.3. Implicaciones.....	45
V- CONCLUSION.....	48

1. RESUMEN DE RESULTADOS.....49

2. CONCLUSION: Interpretación conjunta de los resultados obtenidos en los diferentes estudios presentados: Proposición de un modelo de daño letal por reperfusión.....49

VI- BIBLIOGRAFIA.....52

ABREVIATURAS UTILIZADAS

ADP: Adenosina 5'-difosfato
ANP: Péptido natriurético auricular
ATP: Adenosina 5'-trifosfato
BDM: 2,3- Butanodiona monoxima
CK: Creatín kinasa
CP: Creatín fosfato
DPPD: Difenilfenilenediamina
FP4: Factor plaquetario 4
GMPc: 3',5'-Guanosín monofosfato cíclico
ICAM-1: Molécula de adhesión intercelular
IL: Interleuquina
IP₃: Inositol trifosfato
LDH: Lactato deshidrogenasa
M, mM, μ M: Molar, milimolar, micromolar
NO: Oxido nítrico
PAF: Factor de activación plaquetaria
Pi: Fosfato inorgánico
TMZ: Trimetazidina
TNF: Factor de necrosis tumoral
TXA₂: Tromboxano A₂
SIN-1: 3-morfolinossidnonimina
SNAP: S-nitroso-N-acetil penicilamina
SNP: Nitroprusiato sódico

RESUMEN

Las células miocárdicas expuestas a un período de hipoxia (deprivación energética) prolongado presentan un gran aumento de los niveles de Ca^{2+} citosólico. Durante la reoxigenación, la reactivación de la producción energética mitocondrial antes de que se normalice la concentración de Ca^{2+} provoca una activación exagerada de la contractilidad de las miofibrillas, que puede llegar a deformar irreversiblemente el citoesqueleto y romper la membrana celular. Este fenómeno, conocido como hipercontractura asociada a la reoxigenación, es el responsable de la muerte celular que se produce en los primeros minutos de reinstauración del aporte de oxígeno y da lugar al patrón histológico de necrosis en bandas de contracción, que constituye el 90% de la masa de necrosis en los infartos post-reperusión. Sin embargo, en el modelo de miocitos aislados, la hipercontractura no se acompaña de muerte celular y las células hipercontraídas conservan la integridad de su sarcolema y cierta competencia metabólica. Esta discrepancia puede ser debida a la ausencia de las fuertes restricciones físicas impuestas por las uniones intercelulares del tejido in vivo (que producirían desgarramiento del sarcolema entre miocitos adyacentes hipercontraídos), pero también podría deberse a la ausencia de sobrecarga osmótica en el modelo de miocitos aislados. Durante la isquemia, los catabolitos se acumulan en el interior de las células y en el espacio extracelular; la llegada de flujo sanguíneo en la reperusión produce un lavado de los catabolitos del espacio extracelular creando un gradiente osmótico a través del sarcolema. Como consecuencia de este gradiente se produce una entrada de agua al interior de las células creando un aumento de la tensión sobre la membrana que puede llegar a romperla.

En este estudio se ha investigado la contribución específica del edema sobre la viabilidad celular en un modelo de miocitos aislados sometidos a anoxia simulada y reoxigenación hipoosmótica, el papel de la fragilidad estructural sobre la viabilidad celular, su evolución temporal y los mecanismos responsables de la misma. Además, se ha estudiado la interacción celular como posible mecanismo adicional de daño, utilizando parejas de miocitos conectados en serie y sometidos a técnicas de micromanipulación. Los resultados demuestran que el daño mecánico impuesto por la hipercontractura coopera con la sobrecarga osmótica en la rotura de la membrana en miocitos reoxigenados. Cuando se previene la hipercontractura durante la reoxigenación, el edema osmótico por sí solo no es capaz de romper la membrana de las células. Por otra parte, en miocitos que no han estado sometidos a un período previo de deprivación energética, el edema y la hipercontractura no producen disrupción del sarcolema. Estos resultados están de acuerdo con

la hipótesis de que la sobrecarga mecánica impuesta por el edema y la hipercontractura producen la muerte celular por rotura del sarcolema en miocitos que han desarrollado fragilidad estructural secundaria a la privación energética. La fragilidad no se recupera durante los primeros 40 min de reoxigenación. La preincubación de los miocitos con TMZ, un fármaco con propiedades antiisquémicas y estabilizante de los lípidos de membrana, es capaz de aumentar la resistencia mecánica y mejorar la supervivencia de células reoxigenadas sometidas a estrés osmótico. Este efecto de la TMZ indica que la fragilidad osmótica de los miocitos reoxigenados está relacionada, al menos en parte, con un proceso de degradación lipídica del sarcolema durante la anoxia. La reoxigenación no sólo no revierte la fragilidad osmótica desarrollada durante la anoxia sino que produce una disminución adicional de la resistencia mecánica del sarcolema. Los fármacos dadores de NO y antioxidantes lipídicos son capaces de mejorar la viabilidad celular en miocitos sometidos a estrés osmótico. El mecanismo de acción de estos fármacos no se conoce, aunque parece ser independiente de la vía del GMPc, lo que es compatible con la hipótesis de que el incremento de la fragilidad observada durante la reoxigenación se debe en parte a la acción de los radicales libres del oxígeno. Finalmente, en parejas de miocitos unidos por discos intercalares intactos, la hipercontractura de un miocito inducida mediante micromanipulación es capaz de transmitirse a un miocito adyacente. La transmisión célula a célula de la hipercontractura se puede prevenir utilizando heptanol, un bloqueante de los gap junctions. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la interacción química a través de los gap junctions entre células adyacentes puede contribuir a la transmisión de la hipercontractura.

En conclusión, los resultados de este estudio demuestran la existencia de diferentes mecanismos capaces de causar la muerte celular durante los primeros minutos de reperfusión, y abren la posibilidad de prevenirla mediante intervenciones farmacológicas aplicadas en el momento de la reinstauración del flujo coronario.

I- Introducción

I- INTRODUCCION

La isquemia coronaria aguda constituye la principal causa de mortalidad en la mayoría de los países industrializados. La extensión de la necrosis miocárdica que se produce durante el síndrome coronario agudo es el principal factor determinante de la supervivencia y calidad de vida en pacientes con cardiopatía isquémica. Esta extensión depende del daño celular desarrollado durante la oclusión coronaria y del que ocurra durante la reperfusión, ya sea por recanalización espontánea o terapéutica.

Las principales estrategias terapéuticas utilizadas para disminuir la mortalidad y morbilidad por cardiopatía isquémica son la detención de la progresión de las lesiones coronarias (control de los factores de riesgo), la prevención de la oclusión coronaria (tratamiento antitrombótico, técnicas percutáneas de intervención intracoronaria, cirugía) y la resolución de la oclusión coronaria cuando ésta se produce causando un cuadro de infarto de miocardio (tratamiento trombolítico, intervención percutánea). Estas estrategias han producido una disminución de la mortalidad por cardiopatía isquémica en la mayoría de países en los que han sido utilizadas. Sin embargo, las estadísticas de mortalidad constituyen también una evidencia de que este éxito es sólo parcial por el momento, y la cardiopatía isquémica continúa siendo la primera causa de muerte en la mayoría de estos países. Por lo tanto, parece justificado tratar de desarrollar una cuarta estrategia encaminada a paliar las consecuencias de una oclusión coronaria transitoria de una duración dada, determinada en gran medida por factores muy difícilmente modificables, como el tiempo que tarda el paciente en llegar al hospital. Esta estrategia ha de basarse en potenciar el efecto beneficioso de la reperfusión sobre el tamaño del infarto después de un período de isquemia miocárdica severa.

La tolerancia del miocardio a la isquemia-reperfusión es muy pobre comparada con la de otros tejidos, y períodos muy cortos de isquemia (menores de 1 hora) pueden resultar en una necrosis celular masiva. Existe una evidencia creciente de que esta tolerancia tan baja sólo es debida en

parte a las condiciones isquémicas y que la reperfusión puede agravar la extensión del daño. Como otros tipos celulares, los miocitos pueden sufrir los efectos adversos de la generación de radicales libres y de la activación de fenómenos inflamatorios durante la reperfusión. Pero, además, los miocitos están provistos de una maquinaria contráctil muy potente y se encuentran interconectados firmemente para asegurar el acoplamiento eléctrico y mecánico durante su normal funcionamiento. Estas características específicas los hacen particularmente susceptibles a un tipo de daño celular que no afecta a otros tejidos: el daño mecánico por reperfusión.

1. NECROSIS MIOCARDICA POR ISQUEMIA/REPERFUSION

1.1. Daño inducido por la isquemia.

Durante la isquemia severa se produce un desequilibrio entre la demanda y el aporte de energía del tejido miocárdico. La detención del metabolismo anaeróbico se acompaña del agotamiento inmediato de la CP y del descenso progresivo de los niveles de ATP y el acúmulo de ADP y Pi. Este último es el principal responsable del fallo contráctil total que se instaura durante los primeros segundos de isquemia, cuando los niveles de ATP son todavía prácticamente normales. La glicolisis anaeróbica sólo puede satisfacer parte de la demanda energética. Como consecuencia del déficit energético se producen cambios en el equilibrio electrolítico a través del sarcolema, de los que el más prominente es la salida de K^+ y su acumulación en el espacio extracelular, y edema celular. Al activarse la glicolisis anaeróbica aumentan los niveles de lactato y disminuye el pH intracelular. Finalmente, la glicolisis anaeróbica es inhibida y el déficit energético se agrava.

1.1.1. Acidosis e incremento de Na^+ intracelular.

La puesta en marcha de la glicolisis anaeróbica produce ácido láctico, que se encuentra disociado como anión lactato y H^+ . El pH intracelular de la célula isquémica se acidifica y esto pone en marcha los sistemas de transporte reguladores del pH. Uno de los mecanismos para sacar H^+ del citoplasma es el intercambiador Na^+/H^+ . Este sistema produce un aumento del influjo de Na^+ que, a su vez, pone en marcha el intercambiador Na^+/Ca^{2+} que saca Na^+ intracelular a costa de la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula (Figura 1). El intercambiador Na^+/H^+ desempeña, entonces, un papel deletéreo para la célula miocárdica porque constituye un mecanismo de sobrecarga de Ca^{2+} (Tani *et al.* 1989).

Se ha demostrado que el uso de agentes que inhiben el intercambio Na^+/H^+ puede tener un efecto beneficioso sobre el miocardio isquémico/reperfundido. Sin embargo, el mecanismo de acción por el cual ejercen esta protección no ha sido claramente identificado debido principalmente a que: 1) Muchos estudios se han realizado utilizando inhibidores Na^+/H^+ poco selectivos (como los derivados de amilorida, que pueden tener efecto sobre los canales de Ca^{2+} y sobre el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$). Actualmente existen los derivados de benzoylguanidina (HOE694, HOE642) que han resultado ser mucho más selectivos (Sholz *et al.* 1993, Sholz *et al.* 1995); 2) Se han obtenido resultados contradictorios sobre si el efecto beneficiosos del bloqueo del intercambio Na^+/H^+ se debe a su acción durante la isquemia, durante la perfusión o en ambas. Varios estudios han demostrado que la inhibición del intercambio Na^+/H^+ ejerce un efecto beneficioso sólo cuando está presente antes y durante la isquemia (Hendrikx *et al.* 1994, Bugge *et al.* 1995, Klein *et al.* 1995, Garcia-Dorado *et al.* 1997), mientras que en otros estudios se ha descrito una disminución de las arritmias de perfusión y de la necrosis miocárdica cuando los inhibidores del intercambio Na^+/H^+ están presentes en la fase inicial de la perfusión (Du Toit *et al.* 1993, Yasutake *et al.* 1994, Ladilov *et al.* 1995); 3) No se ha demostrado hasta el momento que la inhibición del intercambio Na^+/H^+ durante la isquemia produzca un cambio sustancial en el desarrollo de la acidosis intracelular. Varios estudios han valorado la evolución del pH intracelular en corazones isquémicos y no han podido detectar modificaciones en presencia de HOE694 o derivados de la amilorida (Pike 1993, Hendrikx *et al.* 1994, Navon *et al.*

FIGURA 1

1994). Tampoco se han podido demostrar diferencias significativas en la evolución de la depleción energética en células miocárdicas isquémicas en presencia o ausencia de estos inhibidores (Sack *et al.* 1994). Parece, pues, claro que el efecto cardioprotector sobre el miocardio isquémico no está relacionado con alteraciones en el curso de la acidificación intracelular ni del metabolismo energético.

El intercambio Na^+/H^+ no es el único, ni probablemente el más importante de los mecanismos de entrada de Na^+ en la célula durante la isquemia. El cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$, activado por la sobrecarga intracelular de H^+ , desempeña un papel importante. El fallo de la bomba de Na^+ (Na^+/K^+ ATPasa), que se produce como consecuencia de la disminución de la energía de hidrólisis del ATP, contribuye de manera importante a la sobrecarga de Na^+ durante la isquemia, en la que también han sido involucrados los canales de Na^+ (Piper *et al.* 1996). Por otra parte, no se conoce con exactitud cuál es el papel de la sobrecarga de Na^+ intracelular en el desarrollo del daño isquémico, aparte de contribuir a la sobrecarga de Ca^{2+} al activar el intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ y de ejercer una función osmótica pasiva. Existen evidencias de que el incremento de los niveles de Na^+ citoplasmático precede a la aparición de los puentes de rigor entre la actina-miosina.

Finalmente, otros sistemas transportadores participan en la regulación del pH intracelular durante la isquemia, sin implicar al Na^+ , como el cotransportador $\text{H}^+/\text{lactato}$. La multiplicidad de los sistemas implicados en la regulación del pH intracelular durante la isquemia, y las complejas interrelaciones entre ellos, hacen que los efectos de la activación sobre uno de estos sistemas sean difícilmente predecibles. Además, la comprobación experimental de estos efectos está limitada por la falta de disponibilidad de inhibidores o agonistas específicos, con la excepción matizada del inhibidor del intercambiado Na^+/H^+ .

1.1.2. Edema celular asociado a la isquemia.

Se ha descrito en varios estudios que el contenido de agua miocárdica aumenta precozmente en la isquemia severa. Este hecho ha sido documentado *in vitro* (Steenbergen *et al.* 1985), en corazón aislado (Tranum-Jensen *et al.* 1981) y en corazón *in situ* con isquemia regional (Jennings *et al.* 1985). Un elemento importante en la génesis del edema es la acumulación de productos metabólicos con gran actividad osmótica en el interior de la célula. Estos metabolitos provocan elevaciones severas de la osmolaridad intracelular que se acompañan de edema osmótico. Sin embargo, tras una fase inicial de generación de edema celular, la capacidad de la mayoría de los metabolitos para atravesar la membrana provoca la desaparición del gradiente

osmótico transmembrana y la progresión del edema osmótico se enlentece o detiene. El equilibrio de la carga osmótica transmembrana es más completo y rápido en ausencia de circulación colateral (Steenbergen *et al.* 1985).

Otro mecanismo implicado en la génesis del edema celular durante la isquemia miocárdica está ligado a cambios en la permeabilidad del sarcolema a distintos iones, y especialmente al Na^+ . Se ha comprobado que la disfunción de la membrana plasmática puede ocasionar edema celular en ausencia de gradiente osmótico (Tomita *et al.* 1992), debido a la descarga del potencial termodinámico transmembrana normalmente existente como consecuencia del desequilibrio en las concentraciones de iones (mayor concentración extracelular) y grandes moléculas (mayor concentración intracelular). Este desequilibrio hace que, aunque la presión osmótica sea igual a ambos lados de la membrana, los iones tiendan a entrar, y hagan necesaria la existencia de un sistema activo (con consumo de ATP) de extrusión. El fallo de este sistema conduce a la ganancia de Na^+ y Cl^- y a la entrada pasiva de agua (Piper *et al.* 1996).

1.1.3. Incremento de Ca^{2+} intracelular.

El gradiente electroquímico para el Ca^{2+} a través del sarcolema es del orden de 10^6 y tiene que ser mantenido por procesos activos que requieren energía. La acumulación de Ca^{2+} se ha considerado clásicamente como el mecanismo fundamental del daño isquémico y ha sido bien establecido en estudios previos (Morris *et al.* 1989). La utilización de técnicas de radiofluorescencia ha permitido la caracterización detallada de las alteraciones de la concentración de Ca^{2+} citoplasmático causadas por la isquemia, la anoxia, o la inhibición metabólica. El Ca^{2+} intracelular se mantiene normal (aunque sin elevaciones transitorias) durante los primeros minutos de déficit energético y sólo comienza a elevarse cuando la célula presenta contractura por rigor (ver más adelante). No se conocen bien los mecanismos que relacionan la aparición del rigor con la elevación del Ca^{2+} (Koretsune *et al.* 1990). El aumento neto de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia es atribuido fundamentalmente al intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, que actúa a favor del gradiente electroquímico en una situación de sobrecarga de Na^+ (como se ha descrito más arriba), pero también se debe a una disminución de la extrusión de Ca^{2+} a través del sistema Ca^{2+} -ATPasa. El uso de agentes que afectan la liberación de calcio desde el retículo sarcoplásmico, como la cafeína o la rianodina, no previene la acumulación de calcio citosólico durante la hipoxia (Siegmund *et al.* 1992), lo que indica que el retículo sarcoplásmico no desempeña un papel relevante en la pérdida de control de la homeostasis del calcio en una situación de privación energética.

Estudios previos han demostrado que el incremento en los niveles de Ca^{2+} citosólico conduce a una degradación acelerada de los fosfolípidos de membrana (Verkley y Post 1987). Se desconoce si este efecto está mediado por una activación de las fosfolipasas dependientes de Ca^{2+} o por la acción directa del Ca^{2+} sobre los fosfolípidos. La resíntesis de fosfolípidos es un proceso dependiente de ATP. Cuando los miocitos tienen las reservas energéticas deplecionadas en presencia de niveles elevados de Ca^{2+} intracelular, la degradación acelerada de los fosfolípidos de membrana coincide con la incapacidad de la célula para resintetizarlos. Además, se produce activación de las proteasas dependientes de Ca^{2+} , lo que contribuye al daño del citoesqueleto observado en el miocardio isquémico (Steenbergen *et al.* 1987).

El grado de sobrecarga de Ca^{2+} citosólico durante la isquemia tiene una gran importancia sobre la posible recuperación o no de los miocitos durante la reoxigenación. En estudios realizados utilizando cardiomiocitos de rata inyectados con aequorina y sometidos a anoxia (Allshire *et al.* 1987), se observó que cuando la reoxigenación se realizaba antes de que el Ca^{2+} alcanzase la concentración de $1 \mu\text{M}$, la célula era capaz de restablecer los niveles de Ca^{2+} intracelular en los primeros minutos de la reoxigenación y no sufrir hipercontractura; si la reoxigenación se realizaba cuando el Ca^{2+} había alcanzado una concentración de $1-3 \mu\text{M}$, se producía un período de oscilaciones de Ca^{2+} durante 5-15 min (en el que la célula trataba de restablecer su Ca^{2+} basal) que podía provocar la hipercontractura en los primeros segundos de readmisión del oxígeno. Durante la deprivación energética se produce también elevación de Ca^{2+} en las mitocondrias, pero las consecuencias de este fenómeno no han sido bien establecidas.

1.1.4. Fragilidad estructural

Las células miocárdicas pueden soportar las alteraciones metabólicas producidas por períodos breves de isquemia o hipoxia y al mismo tiempo son capaces de recuperar su estructura y función si se reinstaura el flujo sanguíneo, o el aporte de oxígeno, antes de que haya transcurrido un período crítico de anoxia/isquemia. Se considera que estas células están reversiblemente dañadas. La disrupción de su sarcolema marca el paso definitivo hacia la muerte celular y está asociada a la prolongación del período de isquemia (Jennings *et al.* 1981). Previamente al desarrollo de daño irreversible, las células pasan por un estadio de fragilidad estructural en el que, aunque conservan la integridad de su sarcolema, presentan una disminución de su capacidad para soportar una sobrecarga mecánica. Este aumento de la fragilidad del sarcolema/citoesqueleto puede ponerse de manifiesto mediante sobrecarga osmótica. Por otra

parte, las células sometidas a privación energética severa y prolongada, presentan un incremento de la susceptibilidad al Ca^{2+} (Figura 2). Este segundo tipo de fragilidad que afecta al sarcómero-citoesqueleto favorece el colapso estructural de la célula durante la hipercontractura (Ladilov *et al.* 1997).

a) Fragilidad osmótica (fragilidad del sarcolema). Los primeros estudios sobre fragilidad osmótica se realizaron en corazones aislados y perfundidos (Vander Heide *et al.* 1987). En estos estudios se demostró que los corazones que se mantenían en condiciones normóxicas y eran sometidos a un estrés osmótico (cambiando la perfusión normoosmótica de 300 mOsm a una perfusión hipoosmótica de 150 mOsm) no sufrían aparente daño estructural ni liberaban enzimas. En cambio, los corazones anóxicos sometidos al mismo estrés osmótico desarrollaban disrupción de la membrana celular y liberación de enzimas intracelulares. El aumento de la fragilidad osmótica durante la inhibición metabólica también ha sido demostrado en miocitos aislados (Ganote *et al.* 1988). Después de someter miocitos aislados controles a una incubación hipoosmótica durante 60 min, no se observaron

FIGURA 2

diferencias en el número de células viables con forma de bastón con respecto a aquellos que se incubaron en condiciones normoosmóticas, tal como se determinó por análisis de exclusión de Trypan Blue, un colorante que sólo tiñe las células cuando hay disrupción de su membrana. El mismo experimento realizado en miocitos que habían sido sometidos a inhibición metabólica previa, resultó en aproximadamente el doble de células no viables después de la incubación hipoosmótica. Aunque el mecanismo exacto de este fenómeno no se conoce, se ha sugerido que la proteólisis de componentes del citoesqueleto (como la vinculina) puede estar relacionada con la ruptura de la membrana celular (Steenbergen *et al.* 1987). Esta proteólisis puede ser secundaria al aumento de los niveles de calcio citosólico durante la anoxia.

b) Aumento de la susceptibilidad al Ca^{2+} (fragilidad del citoesqueleto). Cuando los miocitos aislados sometidos a anoxia alcanzan un nivel crítico de ATP (entre 50 y 100 μ M) sufren un acortamiento brusco (contractura) de su longitud pero mantienen su estructura poligonal. Este acortamiento, generalmente de más del 50% de su longitud inicial, se debe a la aparición de enlaces de tipo rigor, independientes del Ca^{2+} , entre la actina y la miosina, cuando aún persiste una cierta actividad cíclica, dependiente del ATP, en otros puntos de los miofilamentos (Allshire y Cobbold 1990). La hipercontractura asociada a la reoxigenación sólo se produce en aquellas células que han desarrollado este acortamiento en el período previo de anoxia. Stern *et al.* (1985) han demostrado que cuanto mayor es el intervalo que transcurre entre la aparición de este acortamiento y el inicio de la reoxigenación, mayor es la probabilidad de que la célula se hipercontraiga al reinstaurar el oxígeno. Las células que no sufren contractura durante la anoxia tampoco se hipercontraen durante la reoxigenación. La contractura representa un punto de no retorno en la respuesta de las células a la reoxigenación y constituye un suceso importante en el deterioro celular. Los estudios de monitorización del Ca^{2+} intracelular realizados en miocitos aislados sugieren que la contractura anóxica precede a un aumento detectable de los niveles de Ca^{2+} citoplasmático, aunque esta relación temporal entre la aparición de contractura y el aumento de Ca^{2+} puede variar al modificarse las condiciones de adhesión de las células a la placa (Allshire *et al.* 1987). No se sabe con exactitud cuál es el papel de la contractura en el desarrollo del daño anóxico, ni si el acortamiento y tensión de que se acompaña pueden causar distorsiones en la arquitectura del sarcómero y del citoesqueleto capaces de aumentar la fragilidad estructural. Sin embargo, se sabe que las células que han permanecido en rigor por un período de tiempo prolongado desarrollan una susceptibilidad exagerada a los incrementos de Ca^{2+} intracelular, y que en presencia de ATP se hipercontraen a niveles de Ca^{2+} intracelular inferiores a los necesarios para producir hipercontractura en células que no han presentado rigor

prolongado. Este aumento de la susceptibilidad al Ca^{2+} parece estar mediado por cambios en el estado de fosforilación de proteínas del citoesqueleto (Ladilov *et al.* 1997).

1.2. Daño inducido por la reperfusión.

La reinstauración del flujo sanguíneo es indispensable para evitar la muerte de las células miocárdicas sometidas a isquemia severa. Sin embargo, no es una condición suficiente, y una población variable de miocitos isquémicos puede morir a pesar de la reperfusión. Esta población es mayor a medida que la reperfusión se retrasa, y llega un momento en que la reinstauración del flujo no consigue salvar de la muerte un número apreciable de miocitos. Además, la reperfusión es capaz por sí misma de producir un daño adicional a las células, incluso precipitar su muerte, lo que se conoce como daño letal por reperfusión. El daño letal por reperfusión se define como el daño causado por la reinstauración del flujo sanguíneo después de un período isquémico y que es capaz de producir la muerte de células que todavía no estaban irreversiblemente dañadas durante el episodio isquémico previo. La relevancia de este efecto potencialmente dañino de la reperfusión y, en particular, su capacidad para matar células viables y limitar la recuperación miocárdica, es aún objeto de debate (Piper *et al.* 1997). Hay que distinguir entre el daño por reperfusión inmediato, que es el que tiene lugar durante los primeros minutos de la reinstauración del flujo sanguíneo y puede producir muerte por necrosis, y el daño por reperfusión tardío que puede desarrollarse a lo largo de horas e incluso días después de la reinstauración del flujo sanguíneo, y que puede estar relacionado con la activación de polimorfonucleares neutrófilos y con la inducción de necrosis y/o apoptosis. Los miocitos que mueren durante los primeros momentos de la reperfusión lo hacen de forma especialmente violenta, desarrollando una actividad contráctil excesiva e incontrolada. El desarrollo de esta actividad indica que, en el momento de presentarla, los miocitos poseen capacidad para generar energía y una cierta competencia metabólica. Existen sólidas evidencias que sugieren que estos miocitos pueden salvarse si se modifican las condiciones en las que se produce la reperfusión. Entre los procesos que participan en el daño por reperfusión ha merecido especial atención el posible papel de agentes bioquímicos como los radicales libres de oxígeno. No obstante, existe cada vez mayor evidencia de que los factores físicos, como el estrés mecánico impuesto por el edema celular masivo y la hipercontractura desempeñan un papel decisivo en la muerte celular durante la reperfusión.

Parece cada vez más claro que parte del daño durante la reperfusión sucede más tardíamente,

durante las horas siguientes a la reinstauración del flujo como consecuencia de la llegada de células sanguíneas al miocardio reperfundido y de la liberación de sustancias altamente nocivas para el miocardio. Este daño tardío tiene el gran interés de que podría ser susceptible de tratamientos farmacológicos aplicables a un gran número de pacientes con infarto de miocardio. Incluso breves episodios coronarios agudos, insuficientes para producir necrosis, se acompañan de activación leucocitaria. Se ha demostrado que después de un período de isquemia miocárdica se producen cambios en el endotelio de capilares y vénulas y en los leucocitos, con expresión de moléculas adhesivas, como la P-selectina endotelial y la L-selectina leucocitaria, que inician la rodadura, activación PAF-dependiente y posterior adhesión de estas células (Dreyer *et al.* 1991). La activación del sistema del complemento parece desempeñar un papel capital en este proceso, al inducir la translocación de la P-selectina endotelial y la síntesis de IL-1, IL-6 y TNF-alfa, que a su vez inducen la expresión de moléculas de adhesión (Buerke *et al.* 1995). Ésta se hace más firme por la interacción posterior entre nuevas moléculas adhesivas como la ICAM-1 endotelial y las integrinas CD11/CD18 expresadas en los leucocitos, y puede seguirse de la transmigración de neutrófilos al espacio extravascular (Kurose *et al.* 1994). La transmigración se ve favorecida por la liberación de los uniones mediadas por P-selectina en los leucocitos activados (Lorant *et al.* 1995). Parece probable que la disminución de la liberación basal de NO en el endotelio miocárdico juegue un papel determinante en el desencadenamiento de esta cadena de sucesos, que conducen al acúmulo de neutrófilos en el miocardio reperfundido, ya importante durante los primeros minutos de la reinstauración del flujo (Kurose *et al.* 1994). En pacientes con episodios de isquemia aguda, la actividad inflamatoria en la lesión coronaria responsable de la isquemia también podría contribuir a la activación leucocitaria, pero la importancia de esta contribución no ha sido establecida.

La capacidad de los leucocitos para lesionar el miocardio reperfundido ha sido intensamente investigada (Lefer *et al.* 1994). Los leucocitos pueden comprometer la viabilidad celular al crear micro-taponos capilares, liberar sustancias tóxicas, o dañar directamente a los miocitos después de atravesar el endotelio, habiéndose descrito moléculas de adhesión para neutrófilos (ICAM-1) expresadas por miocitos (Buerke *et al.* 1994). Estos efectos nocivos parecen ligados a la presencia de factores plasmáticos y, concretamente, a la activación del complemento. El complejo de ataque terminal a la membrana (MAC) estimula la liberación de radicales libres del oxígeno y leucotrieno B4 en los neutrófilos. Numerosos estudios han informado del efecto beneficioso sobre el tamaño del infarto de medidas encaminadas a disminuir el acúmulo de leucocitos en el miocardio reperfundido (Litt *et al.* 1989, Ma *et al.* 1992), bien al antagonizar la

adherencia de los mismos al endotelio o bien por otros mecanismos. Sin embargo, los leucocitos son también capaces, en respuesta a determinados estímulos, de producir NO, que podría tener un efecto beneficioso sobre la microvasculatura del miocardio reperfundido e inhibir la agregación plaquetaria (López-Farré *et al.* 1995). Existen indicios de que la producción leucocitaria de NO puede ser estimulada por metabolitos del ácido araquidónico e inhibida por la endotelina-1 y el PAF (López-Farré *et al.* 1995).

Se ha sugerido que las plaquetas cooperan con los leucocitos aumentando su toxicidad (44), y formando agregados leucoplaquetarios, y que la P-selectina juega un papel importante en esta cooperación. Los mecanismos de la activación de las plaquetas por la isquemia miocárdica es peor conocida. La liberación de TXA₂, FP₄, fibrinógeno y adenosina por las plaquetas activadas estimula de distintas maneras los neutrófilos. También se ha descrito un efecto beneficioso de tratamientos que alteran la función plaquetaria o la cooperación entre leucocitos y plaquetas (Flores *et al.* 1994). Sin embargo, el papel de las plaquetas en la génesis del daño durante la reperfusión es mucho más controvertido, y algunos autores han descrito incluso un efecto beneficioso de las mismas sobre el miocardio reperfundido *in vitro* (Yang *et al.* 1994).

La muerte celular necrótica es la consecuencia de un daño estructural severo y no está regulada por los factores de transcripción. Por el contrario, la apoptosis es una muerte celular controlada genéticamente que se produce en respuesta a un daño moderado o a la influencia de citoquinas. Las células que entran en el proceso apoptótico conservan inicialmente la integridad física de su membrana incluso cuando existen cambios en su estructura química. El momento en el que este proceso se vuelve irreversible es la activación de endonucleosis del DNA genómico, dando lugar a un característico patrón de fragmentos de DNA que se utiliza para identificar la apoptosis. En diversos estudios recientes se demuestra la existencia de apoptosis en el miocardio isquémico-reperfundido (Fliss *et al.* 1996, Kajstura *et al.* 1996, Saraste *et al.* 1997), pero ni la relevancia de la apoptosis en la muerte de miocitos reperfundidos, ni los factores que la inician han sido todavía establecidos.

Existen abundantes datos funcionales, enzimáticos y morfológicos que demuestran que el daño letal precoz por reperfusión es cuantitativamente mucho más importante que el tardío, y que la mayor parte de las células que mueren durante la reperfusión lo hacen durante los primeros minutos de la misma (Piper *et al.* 1997). A continuación se analiza la evidencia disponible hasta este momento sobre los principales mecanismos de daño letal precoz durante la reperfusión.

1.2.1. Hipercontractura.

La hipercontractura constituye el mecanismo fisiopatológico más importante de la muerte celular que ocurre durante los primeros momentos de la reperfusión. La hipercontractura es un acortamiento brusco de la longitud celular, hasta alcanzar aproximadamente el 30% de su longitud inicial, debido a una activación exagerada de la maquinaria contráctil. Esta actividad contráctil exagerada se debe a la recarga energética (disponibilidad de ATP) en presencia de niveles anormalmente elevados de Ca^{2+} citosólico. La activación de la contractilidad causa una distorsión irreversible del citoesqueleto y de la morfología celular debido a que la fuerza contráctil excede la capacidad elástica del sarcómero y del citoesqueleto. En el miocardio in situ la hipercontractura se acompaña de rotura del sarcolema y muerte celular, dando lugar a un patrón histológico característico denominado necrosis en bandas de contracción. Este patrón constituye aproximadamente el 90% de la extensión total de la necrosis miocárdica cuando la reperfusión se produce precozmente, es decir, en un momento en el que se consigue salvar miocardio en riesgo (Solares *et al.* 1995). La hipercontractura responsable de la necrosis en bandas de contracción aparece de forma violenta y rápida en el miocardio in situ, como han demostrado estudios en los que se ha monitorizado la longitud de un segmento miocárdico mediante la implantación de microcristales piezoeléctricos (Barrabés *et al.* 1996). Estos estudios muestran una estrecha correlación entre la magnitud del acortamiento de la longitud diastólica en un segmento miocárdico y la extensión de la necrosis en bandas de contracción. Observaciones histológicas muestran que estas áreas de necrosis en bandas de contracción están formadas por miocitos hipercontraídos y constituyen la mayor parte de las células que componen la masa de un infarto secundario a isquemia miocárdica severa seguida de reperfusión (Miyazaki *et al.* 1987).

La hipercontractura constituye una forma genuina de daño por reperfusión ya que puede prevenirse por intervenciones aplicadas en el momento de la reinstauración del flujo. Aunque en el miocardio in vivo la hipercontractura se acompaña de rotura del sarcolema y muerte celular, en miocitos aislados no es capaz por sí sola de romper la membrana durante la reoxigenación. En este modelo in vitro las células pueden soportar el daño mecánico impuesto por la hipercontractura (incluso después de haber desarrollado una debilidad estructural secundaria a la anoxia) sin perder la integridad de su sarcolema ni la competencia metabólica (Piper *et al.* 1984, Piper *et al.* 1985, Siegmund *et al.* 1990), aunque la viabilidad a largo plazo de las células hipercontraídas no se conoce. Esta diferente respuesta de los miocitos aislados respecto a las células de miocardio in vivo puede ser explicada por la ausencia de las restricciones físicas que impone la interacción celular en el modelo in vitro en contraste con las fuertes uniones

intercelulares del tejido miocárdico (Piper *et al.* 1984, Ganote 1985, Frank *et al.* 1986) y/o por la ausencia de sobrecarga osmótica (edema) asociada a la reoxigenación.

En condiciones de privación energética (hipoxia o isquemia) las células miocárdicas se sobrecargan de Na^+ y Ca^{2+} . La recuperación de la fosforilación oxidativa que se produce durante la reperfusión reactiva inmediatamente la función de las 2 principales bombas: la bomba Ca^{2+} -ATPasa del retículo sarcoplásmico y la bomba Na^+ - K^+ ATPasa de la membrana celular. El mecanismo por el que se produce la hipercontractura asociada a la sobrecarga de calcio en células reoxigenadas ha sido caracterizado por Siegmund *et al.* (1992) en experimentos realizados con miocitos aislados en los que se monitorizó la concentración de calcio intracelular y los cambios en la morfología celular. En estos experimentos, las células fueron sometidas a 60 min de anoxia seguida de reoxigenación. La reoxigenación produjo una caída rápida del calcio citosólico (fase I) seguida por un período de oscilaciones del calcio (fase II) y finalmente un restablecimiento del control de los niveles de calcio basal (fase III). La caída inicial de calcio y las oscilaciones (fases I y II) están producidas por el secuestro temporal del exceso de Ca^{2+} dentro del retículo sarcoplásmico. Cuando se satura la capacidad máxima de almacenamiento dentro del retículo sarcoplásmico se inicia un ciclo de liberación-recaptación de Ca^{2+} que puede llegar a producir hipercontractura. Sin embargo, cuando el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ está suficientemente activado estas oscilaciones se interrumpen, porque el exceso de Ca^{2+} es eliminado del citosol. La habilidad de este intercambiador para expulsar el Ca^{2+} de la célula depende de la magnitud del gradiente de Na^+ transarcolema. La restauración de un gradiente de Na^+ suficiente a través de la membrana es entonces un prerrequisito indispensable para la extrusión de Ca^{2+} en las células reoxigenadas. En el modelo de miocitos aislados se ha demostrado que las células reenergizadas pueden retener la suficiente competencia metabólica para reactivar de manera rápida la bomba de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y la bomba de Na^+ del sarcolema (Siegmund *et al.* 1990,1992,1994). La hipercontractura no sólo se produce por la magnitud de la elevación del Ca^{2+} citosólico durante las oscilaciones, sino también por una exagerada susceptibilidad de las células reoxigenadas al calcio (Ladilov *et al.* 1997).

La hipercontractura inducida por la reoxigenación puede prevenirse si la maquinaria contráctil de los miocitos se inhibe en la primera fase de la recuperación energética durante el tiempo suficiente para reestablecer el control de la concentración citosólica de Ca^{2+} . Se ha demostrado experimentalmente que el uso de un bloqueante de las miofibrillas, como la BDM, permite que las células superen la fase vulnerable de la reoxigenación sin hipercontraerse (Siegmund *et al.*

1991). Esta estrategia ha sido utilizada con éxito en el corazón porcino in situ, en donde se demostró que la inhibición contráctil durante los primeros minutos de reperfusión tuvo un efecto beneficioso sobre el tamaño de infarto (Garcia-Dorado *et al.* 1992).

1.2.2. Edema celular asociado a la reperfusión.

La reperfusión después de un período prolongado de isquemia se acompaña de un aumento brusco (en minutos) y masivo del contenido miocárdico de agua (hasta el 150% del contenido de agua normal). Este incremento afecta al intersticio, pero sobre todo al espacio intracelular. El mecanismo del edema celular por reperfusión es múltiple; en parte se debe a la generación de un gradiente osmótico y en parte a mecanismos iónicos relacionados con la sobrecarga de Na⁺ causada por el período previo de isquemia (Figura 3). Durante la reperfusión, el fluido intravascular hiperosmótico es sustituido rápidamente por sangre normoosmótica. Esto crea un gradiente osmótico entre el espacio intra y extravascular. A medida que el agua se desplaza hacia el espacio intersticial y los iones osmóticamente activos son lavados, disminuye la osmolaridad en este espacio. Se crea entonces un gradiente osmótico a través de las membranas de miocitos viables, que tienen una elevada concentración de catabolitos intracelulares y que resulta en edema celular. La magnitud del edema celular depende principalmente de la duración y severidad del episodio isquémico previo (Garcia-Dorado *et al.* 1993).

La importancia del edema osmótico durante la reperfusión se ha demostrado en experimentos en los que se ha realizado una reperfusión hiperosmótica usando manitol como agente osmótico (Kloner *et al.* 1976, Garcia-Dorado *et al.* 1992). El D-manitol es un polialcohol que se distribuye en el espacio extracelular en ausencia de daño del sarcolema. El aumento de la osmolaridad de la reperfusión inicial se ha asociado consistentemente con una

FIGURA 3

disminución del edema miocárdico. El efecto de la reperfusión hiperosmótica sobre la necrosis miocárdica es más controvertido. Trantum-Jansen *et al.* (1987) han descrito un efecto beneficioso de la reperfusión hiperosmótica con manitol después de 50 min de isquemia sobre el estado bioquímico, electrofisiología y ultraestructura en un modelo de corazón porcino aislado. Klein *et al.* (1985) han investigado el efecto de la infusión intracoronaria de manitol después de 75 min de oclusión coronaria en el corazón porcino *in situ*, y no han observado un efecto beneficioso sobre el tamaño del infarto ni sobre el contenido miocárdico de agua. García-Dorado *et al.* (1992) han investigado el efecto de la infusión intracoronaria hiperosmótica con manitol en un modelo de corazón porcino *in situ* sometido a oclusión coronaria de 48 min. La solución hiperosmótica (450 mOsm) se infundió durante los primeros 30 min de reperfusión y se midió el contenido miocárdico de agua después de 30 min de reperfusión y el tamaño del infarto después de 24 horas. En estos experimentos, el tamaño de infarto y el contenido miocárdico de agua disminuyeron significativamente, un 34% y un 31% respectivamente, en los animales que recibieron una reperfusión hiperosmótica.

La asociación entre la disminución del edema por reperfusión y el aumento de miocardio salvado se ha demostrado no sólo en estudios que han empleado una reperfusión hiperosmótica sino también en otras situaciones, como el preconditionamiento isquémico. Aunque se ha demostrado que la depleción de sustratos y el lavado de catabolitos que se produce después de períodos breves de isquemia limita el incremento de la osmolaridad del miocardio preconditionado durante un episodio subsiguiente de isquemia, no se ha podido establecer una relación causa-efecto entre este efecto beneficioso y el efecto protector contra la necrosis miocárdica (Sanz *et al.* 1995).

Además del gradiente osmótico, otros mecanismos deben contribuir al edema celular durante la reperfusión. Estudios recientes han demostrado un rápido e importante aumento del contenido de agua en el miocardio reoxigenado, a pesar de que en el modelo de anoxia/reoxigenación no se genera un gradiente osmótico apreciable. La inhibición del intercambio Na^+/H^+ durante la anoxia, pero no durante la reoxigenación, previene este edema, y este acúmulo es aditivo con el de la inhibición del cotransportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Estas observaciones sugieren que durante la reoxigenación, la rápida corrección de los desequilibrios iónicos causados por la deprivación energética, y en especial del acúmulo de Na^+ y HCO_3^- , se acompaña de ganancia neta de agua (Inserte *et al.* 1997).

1.2.3. Generación de radicales libres derivados del oxígeno.

Existe una evidencia creciente de que en el miocardio reperfundido los radicales del oxígeno son generados en cantidades mucho mayores que en el miocardio normal (Ferrari *et al.* 1992,1993). Diversas fuentes parecen contribuir a este aumento en la producción de radicales libres del oxígeno, como los neutrófilos activados, las células endoteliales y los propios miocitos. El impacto de los radicales libres del oxígeno sobre las células miocárdicas que han estado sometidas a privación energética está aumentado debido a que sus defensas antioxidativas se encuentran disminuidas. Los radicales libres del oxígeno son moléculas especialmente tóxicas por su alta reactividad, y han sido consideradas como posibles factores determinantes en el daño letal por reperfusión. Se han hecho varias aproximaciones experimentales para elucidar su posible papel en el desarrollo de la muerte celular. La discrepancia entre los resultados obtenidos y su dependencia del modelo experimental empleado en cada caso no permiten confirmar la hipótesis del papel de los radicales libres del oxígeno en la génesis del daño letal por reperfusión, aunque tampoco excluyen la posibilidad de que en el miocardio humano contribuyan al desarrollo del mismo (revisión en Downey y Yellon 1992).

1.2.4. Interacción celular.

Interacción celular en la isquemia/reperfusión. En los infartos miocárdicos secundarios a una oclusión coronaria y reperfusión, las áreas de necrosis en bandas de contracción están constituidas por miocitos no viables conectados entre ellos de manera continua (Solares *et al.* 1995). Estudios de simulación por computador (García-Dorado *et al.* 1989) sugieren que para explicar esta geometría es necesario tener en cuenta un factor de interacción célula a célula, es decir, que la probabilidad de que un miocito sobreviva o no a una oclusión coronaria puede estar influido por el destino de los miocitos adyacentes. No se conoce cuál es la naturaleza de esta interacción celular. Se ha sugerido que las fuerzas físicas impuestas por las uniones intercelulares pueden desgarrar el sarcolema de los miocitos que se hipercontraen durante la reperfusión *in situ* (Ganote 1985). El desgarro del sarcolema y la entrada masiva de Ca^{2+} darían lugar a la hipercontractura de las células adyacentes y en la progresión en cadena de la necrosis dentro del área en riesgo. La fragilidad del sarcolema causada por la isquemia podría contribuir a la rotura sarcolemal. Otro posible mecanismo sería que los cambios dramáticos en la composición iónica de los miocitos hipercontraídos durante la reperfusión, fundamentalmente el incremento de Ca^{2+} , se transmitieran a los miocitos adyacentes a través de los *gap junctions*. Esta posibilidad está de acuerdo con las observaciones realizadas en otros tipos celulares que demuestran la participación

de los *gap junctions* en la propagación célula a célula de señales químicas (Sáez *et al.* 1989).

Gap junctions. Las células miocárdicas configuran un sincitio funcional en el que, a través de las fuertes uniones intercelulares, se garantiza el acoplamiento físico y eléctrico y se establece un intercambio iónico. Los discos intercalares son regiones especializadas de la membrana plasmática que contienen los 3 tipos de uniones intercelulares presentes en los miocitos: fascia adherens, desmosomas y *gap junctions*. Mientras que los dos primeros participan en el acoplamiento mecánico entre las células, los *gap junctions* aseguran el acoplamiento eléctrico y la contracción sincrónica, y permiten el paso de iones y moléculas entre células contiguas. Cada *gap junction* está constituido por un trozo de membrana plasmática de dos células adyacentes formando un canal que pone en contacto directo sus respectivos citoplasmas. Este canal actúa como un poro de membrana que puede estar más o menos abierto o cerrado dependiendo de factores fisiológicos que regulan su permeabilidad (Spray *et al.* 1985), pero no actúa como un canal de membrana porque es poco selectivo y permite el paso de numerosas moléculas y iones, siempre que su tamaño sea inferior al diámetro del poro. Cada canal está formado por 2 hemicanales o conexones, cada uno procedente de una de las células en contacto. Los conexones son estructuras hexaméricas constituidas por varias conexinas, una familia multigénica de proteínas conservadas. El tipo de conexinas presentes en los *gap junctions* determina las características electrofisiológicas del canal intercelular y varía en los distintos tejidos pero incluso en una misma célula pueden expresarse simultáneamente más de un tipo de conexina, dependiendo de su grado de diferenciación y de procesos de adaptación a cambios fisiológicos. La conexina más abundante en el corazón de los mamíferos es la conexina 43, aunque se expresan otras, como las conexinas 35, 36, y la conexina 40, que es la más frecuente en los miocitos del sistema de conducción atrioventricular (revisiones en Page 1992, Severs 1995).

En el tejido miocárdico los *gap junctions* son las estructuras que permiten que el corazón se contraiga como una bomba de manera sincrónica y organizada en una fracción de segundo (Severs 1990). Pero además de garantizar el acoplamiento eléctrico en células excitables, los *gap junctions* desempeñan un papel importante en la comunicación intercelular y en la coordinación de la función en tejidos de varios sistemas. Los *gap junctions* son permeables a iones y moléculas citoplasmáticas como nucleótidos, sustratos glicolíticos, aminoácidos, pequeños péptidos y AMPc. También son permeables a moléculas fluorescentes de pequeño tamaño (Gilula 1972). La difusión de moléculas a través de los *gap junctions* puede actuar como una

señal intercelular que ayude a sincronizar la actividad metabólica dentro de un tejido o incluso a amplificar los efectos de un estímulo nervioso o humoral. De hecho, algunos segundos mensajeros comunes como el Ca^{2+} y el IP_3 difunden a través de los *gap junctions* en células epiteliales de lente ovina (Churchill *et al.* 1996), células epiteliales de las vías aéreas (Boitano *et al.* 1992), hepatocitos (Sáez *et al.* 1989), células de la glía (Charles *et al.* 1991) y células musculares lisas (Christ *et al.* 1992). Se han descrito varios factores fisiológicos que pueden regular la permeabilidad de los *gap junctions*, como la concentración de Ca^{2+} intracelular, el pH, el ATP y la fosforilación de las conexinas por protein-quinasas (White *et al.* 1990, Sigiura *et al.* 1990, Kwak *et al.* 1996, Owens *et al.* 1996). Johnston *et al.* (1980) fueron los primeros en describir las propiedades desacoplantes que tienen el heptanol y el octanol sobre los *gap junctions* de células nerviosas del cangrejo de río. Diversos estudios han confirmado que el heptanol y otros alcoholes de cadena larga son capaces de producir en pocos segundos una disminución extrema de la conductancia de los *gap junctions* en diversos tipos celulares, incluidos los cardiomiocitos (Kimura 1995).

Partiendo de las observaciones histológicas de los infartos post-reperusión, en los que la necrosis en bandas de contracción presenta una geometría continua y anfractuosa dentro del área en riesgo, y teniendo en cuenta la compleja interacción entre los miocitos cardíacos para garantizar su acoplamiento eléctrico y mecánico, cabe suponer la posibilidad de que la muerte de un miocito pueda determinar la muerte o supervivencia de los miocitos adyacentes. Los estudios previos sobre *gap junctions* en distintos modelos celulares y su función en la comunicación química entre células adyacentes, sugieren que en el tejido miocárdico pueden desempeñar un papel importante en la transmisión de señales químicas. Sin embargo, las fuertes uniones intercelulares que existen en el corazón han hecho pensar que la interacción entre las células sea de tipo mecánico (Ganote *et al.* 1983,1990), y que la hipercontractura de un miocito puede desgarrar el sarcolema de un miocito adyacente.

2. CUESTIONES NO RESUELTAS

Aunque se han descrito diversos mecanismos que pueden resultar en la disrupción del sarcolema de miocitos isquémicos/reperfundidos, los estudios previos no permiten conocer cuál es la importancia relativa de cada uno de ellos sobre la aparición de la muerte celular. En concreto, estos estudios no aclaran los siguientes puntos:

- 1) Si el edema osmótico es suficiente para romper el sarcolema de miocitos viables durante la reoxigenación o si, por el contrario, necesita la cooperación de la sobrecarga mecánica impuesta por la hipercontractura.
- 2) Si el aumento de la fragilidad osmótica de los cardiomiocitos reoxigenados es una consecuencia inevitable del período previo de hipoxia o si puede prevenirse en el momento de la reoxigenación.
- 3) No se ha establecido la evolución temporal de la fragilidad osmótica ni durante los primeros minutos de la reoxigenación en ausencia de daño mecánico asociado.
- 4) Finalmente, no se sabe si la interacción celular desempeña un papel relevante en la transmisión del daño por reoxigenación, ni cuál puede ser el mecanismo por el que lo haga.

II- Hipótesis y Objetivos

1. HIPOTESIS

La hipótesis de este estudio es que el daño miocárdico letal que se produce durante los primeros minutos de reperfusión/reoxigenación es el resultado de la acción combinada de varios factores, entre los que tienen importancia capital:

- a) la sobrecarga mecánica causada por la reperfusión (hipercontractura y edema)
- b) la fragilidad estructural secundaria a la anoxia y la reoxigenación
- c) la interacción celular a través de los *gap junctions*, que puede contribuir a la transmisión de la muerte celular.

2. OBJETIVOS

El **objetivo principal** de este estudio ha sido someter a prueba la hipótesis de trabajo en un modelo de miocitos adultos aislados.

Los **objetivos secundarios** han sido:

- 1) Establecer la importancia relativa de cada uno de los factores implicados en la muerte por reoxigenación.
- 2) Avanzar en la caracterización de los mecanismos responsables de la muerte por reoxigenación.
- 3) Sentar las bases para el desarrollo de nuevos tratamientos capaces de disminuir la necrosis miocárdica durante la reperfusión.

Para alcanzar estos objetivos, se han utilizado, en primer lugar, miocitos aislados sometidos a inhibición metabólica y reoxigenación hipoosmótica (80 mOsm) con el fin de analizar el efecto del edema osmótico sobre la viabilidad celular en células hipercontraídas y en células en las que se previno la hipercontractura con BDM.

En segundo lugar, se ha utilizado el modelo de cardiomiocito aislado sometido a hipoxia/reoxigenación, o a inhibición metabólica/reoxigenación, para intervenir separadamente sobre la fragilidad asociada a la anoxia y sobre la fragilidad asociada a la reoxigenación. La contribución de la fragilidad asociada a la anoxia sobre la viabilidad final se ha analizado utilizando TMZ, un fármaco con efectos conocidos sobre la estructura de las membranas celulares. La posible efectividad de los tratamientos aplicados en el momento de la reoxigenación sobre la fragilidad osmótica se ha investigado utilizando fármacos dadores de NO y otros con propiedades antioxidantes, y se han determinado las contribuciones de estos tratamientos sobre la viabilidad celular final.

Se ha analizado la posible recuperación de la fragilidad en miocitos reoxigenados después de inhibición metabólica, en los que se previno la sobrecarga osmótica y la aparición de hipercontractura durante los primeros 20 ó 40 min de reoxigenación, aplicando una reoxigenación normoosmótica en presencia de BDM; transcurrido este tiempo las células se sometieron a sobrecarga osmótica en ausencia de BDM para permitir la hipercontractura. La posible recuperación de la fragilidad osmótica se determinó en las células hipercontraídas.

Finalmente, se han utilizado parejas de miocitos aislados para analizar el posible efecto de la hipercontractura de un miocito (provocada por la microinyección de medio extracelular con alta concentración de calcio) sobre miocitos adyacentes. Este modelo ha sido utilizado para investigar la naturaleza de la interacción celular, es decir, si la transmisión de la hipercontractura entre células conectadas se produce por un mecanismo químico (paso de iones o segundos mensajeros a través de los gap junctions), o si es resultado de un desgarro mecánico del sarcolema entre células adyacentes hipercontraídas. Se ha investigado el efecto del heptanol, un bloqueante de los gap junctions, sobre la transmisión de la hipercontractura.

III- Métodos y Resultados

IV- Discusión

IV- DISCUSION

1. EFECTO DEL EDEMA OSMOTICO DURANTE LA REOXIGENACION.

En el miocardio isquémico-reperfundido los miocitos no sólo están amenazados por la hipercontractura inducida por la reoxigenación sino también por el gradiente osmótico transarcolema. Este estudio ha investigado la hipótesis de que el estrés osmótico durante la reoxigenación puede romper el sarcolema de miocitos cardíacos viables. El efecto del estrés osmótico durante la reoxigenación sobre la viabilidad celular se ha investigado en miocitos aislados sometidos a inhibición metabólica y reoxigenación hipoosmótica. El estrés osmótico se indujo exponiendo las células a un medio hipotónico. La hipercontractura asociada a la reoxigenación ocurrió en la mayoría de las células y no fue modificada significativamente por la osmolaridad del medio de reoxigenación. Sin embargo, mientras que la mayor parte de células que recibieron reoxigenación normoosmótica permanecieron viables a pesar de la hipercontractura, sólo una cuarta parte de las células sometidas a estrés osmótico durante la reoxigenación conservaron la integridad de su membrana, evaluada mediante la exclusión de Trypan blue. Por otra parte, el estrés osmótico durante la reoxigenación no se acompañó de disrupción del sarcolema cuando la hipercontractura se previno con BDM. Cuando la hipercontractura y el edema se indujeron con una solución hipoosmótica de alto contenido en Ca^{2+} en miocitos que no habían desarrollado fragilidad mecánica previa (porque no se habían sometido a inhibición metabólica), tampoco se produjo disrupción del sarcolema. La fragilidad mecánica inducida por una inhibición metabólica prolongada persistió por lo menos 40 min después de la restauración de la actividad metabólica.

1.1. Estudios previos

La paradoja de oxígeno clásica no existe en miocitos aislados. En este modelo, las células son capaces de soportar la hipercontractura asociada a la reoxigenación sin perder la integridad de su membrana ni la competencia metabólica (Piper *et al.* 1985, Siegmund *et al.* 1990), en contra de

lo que ocurre en el miocardio in situ. Esta diferencia ha sido explicada por la ausencia de interacción celular en el modelo de miocitos aislados. Sin embargo, la diferencia entre el modelo in vitro y el modelo in vivo podría también ser explicada por la ausencia de edema osmótico importante en las células aisladas. Debido al gran espacio extracelular en las placas de cultivo, la liberación de catabolitos de los miocitos anóxicos no produce cambios apreciables en la osmolaridad del medio. Durante la isquemia in vivo, en cambio, los catabolitos que se liberan de los miocitos anóxicos quedan atrapados en un espacio extracelular limitado y la osmolaridad aumenta marcadamente en los dos compartimentos, intra y extracelular (Tranum-Jensen *et al.* 1987). Durante la reperfusión, la abrupta normalización de la osmolaridad extracelular produce edema celular severo (García-Dorado *et al.* 1993). Aunque existen otros mecanismos de edema independientes del gradiente osmótico, el edema celular que producen es menor que el que se produce durante la reperfusión. De hecho, en el presente estudio no se apreciaron vesículas subsarcolemales en ausencia de gradiente osmótico. En este estudio, los miocitos que se hipercontrajeron en un medio hipoosmótico mostraron ruptura de su sarcolema una vez que se completó la hipercontractura y la prevención de la hipercontractura con BDM fue capaz de prevenir la disrupción del sarcolema incluso en condiciones hipoosmóticas. Estas observaciones están de acuerdo con la hipótesis de que el edema osmótico puede contribuir a explicar la mejor tolerancia de los miocitos aislados a la reoxigenación. En este modelo, la integridad de la membrana no se perdió en condiciones de hipercontractura sin edema, ni de edema sin hipercontractura. Pero la cooperación entre el edema y la hipercontractura no fue suficiente para romper la membrana celular en situaciones en las que no se había desarrollado una fragilidad mecánica previa. Es decir, la pérdida de la viabilidad celular sólo se producía cuando había una concurrencia de los 3 factores: edema celular, hipercontractura y fragilidad estructural.

Está descrito que en determinadas condiciones experimentales de inhibición metabólica prolongada e hipoosmótica (Vander Heide *et al.* 1987) los miocitos pueden perder la integridad de su membrana sin sufrir hipercontractura. Estas observaciones demuestran que la fragilidad mecánica asociada a la deprivación energética puede jugar un papel relevante en la resistencia del sarcolema, pero no explican el fenómeno de disrupción de la membrana inducido por la reoxigenación. Además, otros experimentos confirman que en condiciones normóxicas, los miocitos son capaces de soportar edema severo sin perder la integridad de su membrana y de recuperar su forma y tamaño cuando se reinstaura la osmolaridad extracelular normal (Roos 1986). Sólo cuando los miocitos son expuestos a condiciones extremas de hipoosmolaridad desarrollan vesículas subsarcolemales irreversibles y pueden llegar a perder la integridad de su membrana (Roos 1986).

1.2. Recuperación de la resistencia mecánica durante la reoxigenación.

Debido a que la fragilidad mecánica desarrollada durante la anoxia o la inhibición metabólica es el resultado, al menos en parte, de alteraciones bioquímicas secundarias a la depleción de fosfometabolitos de alta energía, cabría esperar que la recuperación de la actividad metabólica permitiese la reparación de las anomalías estructurales responsables de esta fragilidad. En este estudio no se detectó recuperación de la resistencia mecánica durante los primeros 40 min de reoxigenación. La ausencia de recuperación no puede ser atribuida al daño permanente del citoesqueleto inducido por la hipercontractura, como se demostró en experimentos en los que la hipercontractura se previno con BDM durante los primeros 20 ó 40 min de reoxigenación antes de aplicar el estrés osmótico. Independientemente de la duración del bloqueo contráctil, entre las células que desarrollaron hipercontractura al ser expuestas a un medio hipoosmótico sin BDM, la ruptura del sarcolema ocurrió con la misma frecuencia que cuando la hipercontractura y el estrés osmótico se desarrollaron en el inicio de la reoxigenación. Estudios previos han demostrado que la BDM tiene un efecto deletéreo sobre la fragilidad osmótica de miocitos metabólicamente inhibidos (Armstrong *et al.* 1991), probablemente debido a su acción defosforilativa. Sin embargo, es poco probable que la resistencia mecánica de las células reoxigenadas pueda haberse modificado por acción de la BDM ya que su actividad defosforilativa sólo se manifiesta cuando la capacidad de refosforilación celular está severamente deprimida, como sucede durante la anoxia.

1.3. Consideraciones metodológicas.

El estrés osmótico se aplicó sólo durante la recuperación de la actividad metabólica para simular mejor las condiciones *in situ*. En la reperfusión coronaria, el edema celular osmótico es debido a la hiperosmolaridad intracelular, mientras que en este estudio el estrés osmótico se indujo por exposición a un medio hipotónico. Se seleccionó un nivel de hipoosmolaridad de 80 mOsm para inducir un gradiente osmótico entre el medio extra e intracelular similar al que se produce durante la reperfusión *in situ* después de un período prolongado de oclusión coronaria (García-Dorado *et al.* 1993). La hipoosmolaridad se consiguió disminuyendo la concentración de Na^+ sin alterar la concentración de los otros iones. Se ha descrito que el Na^+ extracelular puede modificar el intercambio Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ e influir sobre la viabilidad celular (Karmazyn *et al.* 1993). Esta posibilidad fue descartada con un grupo de experimentos en los que se utilizó una reoxigenación normoosmótica pero con baja concentración de Na^+ . En estos experimentos con baja concentración de Na^+ la viabilidad celular fue la misma que cuando se utilizaron condiciones normoosmóticas con Na^+ normal.

1.4. Conclusiones.

Los resultados de este estudio están de acuerdo con la hipótesis de que el edema celular osmótico y la hipercontractura cooperan para producir disrupción del sarcolema durante la reoxigenación en miocitos mecánicamente frágiles y que esta fragilidad mecánica no se recupera durante los primeros minutos de la reoxigenación. La adición de estrés osmótico durante la reoxigenación en miocitos aislados constituye un modelo experimental más parecido al modelo in vivo de isquemia miocárdica y reperfusión.

2. FRAGILIDAD MECANICA ASOCIADA A LA ANOXIA.

El mecanismo de la fragilidad mecánica asociada a la anoxia no es conocido. La disminución de la resistencia a la tensión mecánica podría deberse a alteraciones en el citoesqueleto celular y/o sus ensamblajes con el sarcolema, o a alteraciones de la propia membrana. Algunos estudios sugieren la primera posibilidad, pero sus resultados no son concluyentes. Así, la pérdida de la vinculina observada por Steenbergen *et al.* (1987) ocurre sólo muy tardíamente, cuando la fragilidad está bien instaurada. En este trabajo se ha investigado la hipótesis de que esta fragilidad está relacionada, al menos en parte, con cambios en la estructura lipídica del sarcolema asociados a la anoxia. Para ello, se ha analizado el efecto de la TMZ, un fármaco con propiedades antiisquémicas (Belcher *et al.* 1992), sobre la resistencia mecánica del sarcolema en cardiomiocitos sometidos a estrés osmótico durante la reoxigenación. La preincubación con TMZ no modificó el número de células que se hipercontrajeron durante la reoxigenación, pero redujo el número de miocitos que presentaron disrupción del sarcolema asociada a la hipercontractura, como mostraron los resultados del test de Trypan Blue y la medición de la liberación de LDH. Estos resultados están de acuerdo con la hipótesis de que la TMZ ejerce una acción protectora directa sobre la fragilidad mecánica inducida por la deprivación energética.

Aunque varios estudios han mostrado un efecto anti-isquémico directo de la TMZ sobre las células miocárdicas, su mecanismo de acción no está bien caracterizado. Este fármaco no tiene efecto en condiciones normóxicas (Harpey *et al.* 1989) y su acción beneficiosa durante la isquemia o la hipoxia se ha relacionado a su protección contra la reducción de compuestos energéticos (Lavanchy *et al.* 1987), el acúmulo de protones (Renaud 1988) y la generación de radicales libres de oxígeno (Maridonneau-Parini *et al.* 1985). En este estudio, la TMZ produjo un pequeño retraso en el grado de desarrollo de la contractura por rigor durante los primeros

minutos de la inhibición metabólica. Esta observación es compatible con el posible efecto de la TMZ sobre los niveles de ATP (Bowers *et al.* 1993). Sin embargo, al final del período de inhibición metabólica prácticamente todas las células habían desarrollado rigor, independientemente del tratamiento recibido. Esto excluye el potencial papel beneficioso de la preservación de ATP que pudiera ejercer la TMZ sobre la integridad del sarcolema durante la reoxigenación. La TMZ tampoco tuvo ningún efecto sobre la liberación de LDH durante el período de inhibición metabólica. Por otra parte, el efecto beneficioso de la TMZ sobre la viabilidad celular observado en este estudio no puede ser explicado por una disminución en el estrés mecánico ya que el número de células hipercontraídas y la magnitud de la hipercontractura no fue diferente de la observada en las células no tratadas. Los resultados sugieren que la TMZ tiene un efecto directo sobre la resistencia mecánica del sarcolema de las células anóxicas. Este incremento de la resistencia mecánica del sarcolema podría estar relacionado con un efecto protector de la TMZ sobre las membranas durante la deprivación energética. Observaciones previas han mostrado que la TMZ puede modificar el metabolismo lipídico durante la hipoxia y cambiar la fluidez de la membrana en plaquetas humanas (Fantini *et al.* 1994, Devynck *et al.* 1993). A su vez, los catabolitos lipídicos producidos durante la isquemia pueden alterar las propiedades fisico-químicas de las membranas celulares (Verkley *et al.* 1987). La disminución del efecto protector de la TMZ observada cuando la inhibición metabólica se prolongó a 90 min indica que este fármaco retrasa, pero no previene, el desarrollo de fragilidad del sarcolema durante la deprivación energética. Por otra parte, el hecho de que el efecto beneficioso sobre la fragilidad fuese sólo evidente cuando las células habían sido preincubadas con la droga, sugiere que sus propiedades fisico-químicas la hacen acumularse en la membrana celular.

3. FRAGILIDAD MECANICA ASOCIADA A LA REOXIGENACION.

En este estudio se investigó la hipótesis de que la fragilidad estructural que desarrollan las células durante la anoxia/reoxigenación no es una consecuencia inevitable del período previo de anoxia, sino que también tiene un componente debido a la propia reoxigenación. Después de períodos prolongados de depleción energética, la capacidad de los miocitos para soportar un aumento de la presión intracelular disminuye, es decir, aumenta su fragilidad osmótica. Hasta ahora no se había podido establecer si la fragilidad osmótica de los cardiomiocitos reoxigenados se deriva del período previo de anoxia o si se puede prevenir en el momento de la reoxigenación. Para responder a esta cuestión se aplicaron 2 tipos de intervenciones en el inicio de la reoxigenación: primero, intervenciones que inhiben la maquinaria contráctil y protegen contra la

hipercontractura sólo si están presentes antes de iniciarse la fosforilación oxidativa (dadores de NO, estimuladores del sistema guanilyl ciclasa, análogos de GMPc y BDM) y segundo, intervenciones que limitan la peroxidación lipídica (DPPD). Estas intervenciones se aplicaron únicamente durante la reoxigenación. La fragilidad osmótica se caracterizó por la liberación de los enzimas citosólicos CK y LDH en miocitos sometidos a 2 h de anoxia y 30 min de reoxigenación hipoosmótica.

Los resultados presentados indican que la fragilidad de miocitos hipóxicos/reoxigenados puede ser atenuada mediante intervenciones aplicadas exclusivamente durante el período de reoxigenación. Se observó una protección efectiva con el uso de agentes dadores de NO (SIN-1, SNAP, SNP) y el antioxidante lipídico DPPD. La pérdida de enzimas celulares no se observó cuando las células no habían desarrollado todavía la contractura por rigor. Esto indica que los miocitos no desarrollan fragilidad osmótica mientras no han sufrido una depleción energética severa. Sin embargo, el mecanismo por el cual se desarrolla esta fragilidad osmótica no se conoce. Los resultados de este estudio demuestran que la fragilidad osmótica en miocitos reoxigenados después de una depleción energética severa depende, al menos en parte, de las condiciones de reoxigenación. Esto implica que la fragilidad osmótica no está basada en la manifestación de un daño previo irreversible.

3.1. Mecanismo de la protección contra la fragilidad osmótica

La presencia de los dadores de NO SIN-1, SNAP o SNP fue capaz de proteger a los miocitos reoxigenados contra la fragilidad osmótica cuando estuvieron presentes durante los primeros 30 min de reoxigenación. El SIN-1C, metabolito del SIN-1 sin capacidad de liberar NO, no proporcionó protección en miocitos reoxigenados sometidos a estrés osmótico. El SIN-1, SNP y SNAP difieren en su naturaleza química pero todos liberan NO. El aumento de NO parece ser el mecanismo por el cual estos agentes protegieron contra la fragilidad osmótica. Los dadores de NO incrementan la producción de GMPc por activación de la forma soluble de guanilyl ciclasa (Schlütter *et al.* 1994). Sin embargo, según los resultados de este estudio, la protección ejercida por los dadores de NO sobre la fragilidad osmótica no está mediada por GMPc ya que 1) el análogo permeable 8-bromo-GMPc no tuvo ningún efecto protector sobre esta fragilidad; 2) la inhibición de la guanilyl ciclasa por azul de metileno no atenuó la protección ejercida por el SIN-1 y 3) los activadores de la guanilyl ciclasa, ANP o urodilatina, no protegieron contra la fragilidad osmótica. El efecto protector de los dadores de NO contra la fragilidad osmótica parece, pues, estar relacionado con otras acciones del NO independientes del GMPc. Estas acciones continúan siendo desconocidas pero podrían estar relacionadas con la afinidad del NO

por ciertos radicales libres del oxígeno.

Aparte de los dadores de NO, el antioxidante lipídico DPPD fue también capaz de reducir el daño derivado de la fragilidad osmótica cuando estuvo presente en la reoxigenación. Estos resultados en conjunto sugieren que la producción de radicales libres y la peroxidación lipídica desempeñan un papel crítico en la generación de la fragilidad osmótica durante la reoxigenación. Otros estudios han sugerido que los radicales libres pueden estar involucrados en la generación de fragilidad osmótica (Downey y Yellon 1992). Es lógico suponer a partir de estas observaciones que los dadores de NO ejercen su efecto protector contra la fragilidad inducida por la reoxigenación disminuyendo el daño por radicales libres.

3.2. Implicaciones

Este estudio no fue diseñado para identificar el mecanismo que da lugar a un aumento de la fragilidad osmótica durante la reoxigenación, aunque demuestra que la protección contra la generación de radicales libres tiene un efecto beneficioso. El efecto protector de los dadores de NO y del antiperoxidante lipídico DPPD fue independiente de cualquier influencia potencial sobre la hipercontractura inducida por la reoxigenación. Cuando no se administran antes del inicio de la reoxigenación estos agentes son incapaces de prevenir la hipercontractura. La fragilidad osmótica puede, por lo tanto, ser atenuada en miocitos reoxigenados incluso cuando están hipercontraídos. La hipercontractura y la fragilidad osmótica son, pues, procesos independientes sobre los que se puede intervenir específicamente durante la reoxigenación.

4. PAPEL DE LA INTERACCION INTERCELULAR.

Además de la contribución de los factores mecánicos descritos más arriba (edema e hipercontractura) a la muerte de miocitos con fragilidad estructural secundaria a anoxia/reoxigenación, este estudio ha investigado el papel de la interacción entre células adyacentes como mecanismo adicional de daño celular. La interacción celular se analizó utilizando parejas de miocitos aislados y conectados en serie, que resultan de una disociación incompleta del tejido miocárdico. Una de las células de cada pareja se microinyectó con una solución que simulaba el medio extracelular para inducir su hipercontractura y simular las condiciones de ruptura de la membrana. Se investigó la posible transmisión de la hipercontractura a la célula adyacente.

La microinyección de medio extracelular en uno de los miocitos de cada pareja indujo en todos los casos hipercontractura de la célula microinyectada y de la adyacente. La hipercontractura del segundo miocito se iniciaba cuando la hipercontractura del primero había alcanzado el disco intercalar y era completa en las 2 células en menos de 30 segundos. Este mecanismo de transmisión de la hipercontractura célula a célula estuvo asociado al paso de Lucifer Yellow, un colorante capaz de atravesar los *gap junctions* que ha sido utilizado ampliamente para determinar el acoplamiento electromecánico en diversos tipos celulares, incluidos los cardiomiocitos (Kimura *et al.* 1995). El tratamiento de las células con heptanol 2 mM, un anestésico local con capacidad de bloquear la conductancia de los *gap junctions* (Johnston *et al.* 1980) previno la transmisión de la hipercontractura en un 75% de los casos y el paso de Lucifer Yellow en un 85%. La microinyección de medio sin Ca^{2+} no se acompañó de hipercontractura en ninguna de las 2 células aunque se produjo transmisión de Lucifer Yellow a través de los *gap junctions* en todos los casos. Cuando se microinyectó heptanol en medio sin Ca^{2+} no sólo se previno la hipercontractura (100% del los casos) sino también el paso de Lucifer Yellow en un 80% de las células microinyectadas. En ningún caso se produjo transmisión de hipercontractura en ausencia de paso de fluorescencia, lo que descarta una transmisión de la hipercontractura de tipo mecánico por desgarro del sarcolema entre células adyacentes.

Los resultados demuestran que la hipercontractura de un miocito puede inducir la hipercontractura de miocitos adyacentes mediante una señal química que se transmite a través de los *gap junctions*, y que el heptanol es capaz de interferir en esta transmisión.

4.1. Estudios previos.

Johnston *et al.* (1980) fueron los primeros en describir las propiedades desacoplantes del heptanol en células nerviosas del cangrejo de río. El heptanol a 1-2 mM produce una disminución rápida y reversible de la conductancia de los *gap junctions* en muchos tipos celulares incluidos los cardiomiocitos (Christ *et al.* 1992, Kimura *et al.* 1995). Aunque no se conoce con exactitud su mecanismo de acción, parece ser que está relacionado con una disminución de la fluidez en los dominios de membrana ricos en colesterol, lo que resulta en una disminución de la probabilidad de apertura de los canales que forman los *gap junctions* (Bastiaanse *et al.* 1993). A pesar de que el heptanol se ha utilizado para producir el desacoplamiento electromecánico entre células adyacentes, no se conocen estudios previos en los que se haya analizado su posible efecto sobre la transmisión de la hipercontractura.

El efecto protector del heptanol sobre el daño por reperfusión y reoxigenación ha sido

investigado en estudios subsiguientes en nuestro laboratorio. En estos estudios (García-Dorado *et al.* 1997) el heptanol tuvo un efecto beneficioso sobre el tamaño de infarto en el corazón porcino *in situ* y sobre la liberación enzimática y la recuperación funcional en el corazón aislado y perfundido de rata a concentraciones inferiores (1 mM) que las necesarias para prevenir la transmisión de Lucifer Yellow en parejas de miocitos normóxicos (2 mM). Esta discrepancia puede reflejar un aumento de la susceptibilidad de los *gap junctions* al heptanol en las células que se están recuperando de los desequilibrios bioquímicos secundarios a la isquemia previa.

4.2. Progresión célula a célula de la hipercontractura.

Los *gap junctions* son permeables a segundos mensajeros como el AMPc, IP₃, Ca²⁺ y otros iones y moléculas de pequeño tamaño (Sáez *et al.* 1989, Charles *et al.* 1991, Christ *et al.* 1992, Churchill *et al.* 1996) y se les ha atribuido un papel relevante en la comunicación química entre células de diversos tejidos. Los niveles elevados de Ca²⁺ citosólico, la acidosis intracelular y la depleción de ATP producen un cierre de los *gap junctions* en miocitos isquémicos (White *et al.* 1985, White *et al.* 1990, Sigiura *et al.* 1990, Dekker *et al.* 1996, Brenda *et al.* 1996). Sin embargo, la rápida reenergización, normalización del pH y del Ca²⁺ citosólico que ocurren al inicio de la reoxigenación resultan en la reapertura de los *gap junctions* de las células que han sobrevivido (Dekker *et al.* 1996).

Para que se produzca transmisión de la hipercontractura durante la reoxigenación a través de los *gap junctions* se tienen que cumplir 2 condiciones:

- 1) Que la respuesta a la reoxigenación sea heterogénea, es decir, que haya células que sobrevivan expuestas a otras que se están hipercontrayendo. Las diferencias individuales en la eficiencia para recuperar el control del Ca²⁺ se puede apreciar en cortes histológicos correspondientes a miocardio isquémico y reperfundido, en los que dentro de una misma área en riesgo coexisten células viables con otras que han desarrollado hipercontractura y necrosis. Aunque el Ca²⁺ citosólico puede estar elevado en todos los miocitos que se encuentran dentro del área en riesgo al inicio de la reperfusión, el tiempo transcurrido desde el inicio de la sobrecarga de Ca²⁺ y la magnitud de la misma en el momento de la reperfusión es muy variable entre células adyacentes. La existencia de variabilidad espacial en la concentración de Ca²⁺ citosólico al inicio de la reoxigenación entre miocitos contiguos y/o su habilidad para normalizar el nivel de Ca²⁺ durante la reoxigenación se puede demostrar indirectamente en condiciones *in vitro*, en las que miocitos aislados e hipercontraídos como consecuencia de la reoxigenación coexisten con otros que no se hipercontraen dentro de una misma placa de cultivo. La heterogeneidad en la respuesta celular a

la aparición de hipercontractura durante la reoxigenación está relacionada con diferencias individuales en el desarrollo de fragilidad mecánica secundaria a la anoxia (Steenbergen *et al.* 1987, Ganote *et al.* 1993) y con un aumento de la susceptibilidad al Ca^{2+} (Ladilov *et al.* 1997).

2) Que los *gap junctions* estén permeables en células que todavía no han recuperado completamente la homeostasia del Ca^{2+} , porque si solamente se abriesen una vez que la célula ha conseguido eliminar el exceso de Ca^{2+} , no cabría la posibilidad de que la hipercontractura (causada por niveles anormalmente elevados de Ca^{2+} en presencia de ATP) se pudiese transmitir de una célula a otra. El efecto beneficioso que tiene el heptanol sobre el tamaño de infarto cuando se administra únicamente durante la reperfusión (García-Dorado *et al.* 1997), es un argumento a favor de que los *gap junctions* están permeables al inicio de la reperfusión.

4.3. Implicaciones.

Aunque la transmisión de señales químicas a través de los *gap junctions* ha sido descrita en varias estirpes celulares como un mecanismo fisiológico capaz de regular la función de un órgano y participar en el control del crecimiento celular, la transmisión de señales que pueden resultar letales entre células adyacentes sometidas a isquemia/reperfusión puede constituir una forma de progresión de la necrosis celular. Los resultados descritos tienen potencialmente importancia científica y práctica. Teniendo en cuenta que cada miocito está conectado aproximadamente a 11 miocitos adyacentes formando una estructura tridimensional (Peters *et al.* 1993), incluso una pequeña probabilidad de transmisión de la necrosis célula a célula puede tener un gran impacto sobre el tamaño final del infarto (Figura 4). Además, esta progresión de la necrosis entre células adyacentes podría explicar la geometría continua de las áreas de necrosis en bandas de contracción de los infartos post-reperfusión (Solares *et al.* 1995). La posibilidad de interferir farmacológicamente en esta transmisión sin alterar la función del miocardio normóxico con intervenciones que, como el heptanol, disminuyen la conductancia a través de los *gap junctions*, puede tener un gran potencial terapéutico.

FIGURA 4

V- Conclusión

V- CONCLUSION

1. RESUMEN DE RESULTADOS.

Las observaciones de los diferentes trabajos presentados pueden resumirse de acuerdo con la siguiente lista de resultados:

- 1.-La privación energética produce fragilidad del sarcolema en miocitos.
- 2.-Esta fragilidad no desaparece inmediatamente durante la reoxigenación y se mantiene al menos durante los primeros 40 min.
- 3.-La fragilidad del sarcolema causada por la privación energética es debida, al menos en parte, a cambios en la estructura lipídica del sarcolema.
- 4.-La reoxigenación no sólo no revierte la fragilidad mecánica desarrollada durante la anoxia previa sino que puede producir un agravamiento de esta fragilidad.
- 5.-El agravamiento de la fragilidad que se produce durante los primeros minutos de la reoxigenación se debe a la acción de los radicales libres de oxígeno.
- 6.-El edema celular por sí solo no es capaz de producir la rotura del sarcolema.
- 7.-La hipercontractura por sí sola no es capaz de producir la rotura del sarcolema.
- 8.-Sin embargo, el edema celular en cooperación con la hipercontractura y con la fragilidad desarrollada en el período anóxico previo sí es capaz de romper el sarcolema.
- 9.-La hipercontractura de un miocito puede transmitirse a los miocitos adyacentes.
- 10.-La transmisión de la hipercontractura se produce por un mecanismo químico a través de los *gap junctions*.
- 11.-La interacción química intercelular se puede producir durante la reoxigenación entre miocitos con Ca^{2+} citosólico aún elevado.

2. CONCLUSION:

Interpretación conjunta de los resultados obtenidos en los diferentes estudios presentados: Proposición de un modelo de daño letal por reperfusión.

El análisis conjunto de la información proporcionada por los distintos experimentos presentados anteriormente, en el contexto de los resultados obtenidos por otros autores, permite proponer un modelo patogénico de la muerte celular que ocurre durante los primeros minutos de la reperfusión miocárdica. Según este modelo, esquematizado en la Figura 5, la principal causa de muerte celular durante la reperfusión es la rotura del sarcolema como consecuencia de la generación de una violenta sobrecarga mecánica sobre una estructura con una resistencia mecánica disminuida. La sobrecarga mecánica está causada principalmente por la hipercontractura, con la colaboración del edema celular y probablemente del intercambio de fuerzas entre miocitos adyacentes. La hipercontractura se produce al restaurarse la fosforilación oxidativa en presencia de niveles elevados de Ca^{2+} citosólico. El edema está causado por la generación de un gradiente osmótico transmembrana secundario al lavado del espacio extracelular, pero también por mecanismos independientes de este gradiente y dependientes del intercambio Na^+/H^+ y $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ que tienen lugar durante la reperfusión. La fragilidad del sarcolema es el resultado del insulto isquémico previo, en parte a través de cambios en la estructura lipídica, y no desaparece inmediatamente después de la reperfusión, sino que se agrava como consecuencia de la oxidación lipídica. Finalmente, la muerte celular que se produce durante la reperfusión puede amplificarse por un mecanismo de progresión de la hipercontractura célula a célula mediante la comunicación química a través de los *gap junctions*, cuya permeabilidad se reinstaura rápidamente durante la reperfusión (Figura 5). Este modelo puede contribuir a una mejor comprensión de la fisiopatología de la necrosis miocárdica por isquemia/reperfusión y servir de base para el desarrollo de estrategias terapéuticas más eficaces en pacientes con cardiopatía isquémica.

FIGURA 5

VI- Bibliografía

VI- BIBLIOGRAFIA

1. Allshire A, Piper HM, Cuthbertson KSR, Cobbold PH. Cytosolic free calcium in single rat heart cells during anoxia and reoxygenation. *Biochem J* 1987;244:381-385.
2. Allshire A, Cobbold PH. Causes and effects of changes in cytosolic free calcium in the hypoxic myocardial cell. In: HM Piper ed. *Pathophysiology of severe ischemic myocardial injury*, 1990. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp 297-314.
3. Armstrong SC, Ganote CE. Effects of 2,3-Butanedione Monoxime on contracture and injury of isolated rat myocytes following metabolic inhibition and ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 1991;23:1001-1004.
4. Barrabés JA, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Piper HM, Solares J, González MA, Oliveras J, Herrejón MP, Soler-Soler J. Myocardial segment shrinkage during coronary reperfusion "in situ". Relation to hypercontracture and myocardial necrosis. *Pflugers Arch* 1996;431:519-526.
5. Bastiaanse EML, Jongsma HJ, Van der Laarse A, Takenskwak BR. Heptanol-induced decrease in cardiac gap junctional conductance is mediated by a decrease in the fluidity of membranous cholesterol-rich domains. *J Membrane Biol* 1993;136:135-145.
6. Belcher P, Drake-Holland AJ, Hynd JW, Noble MIM. Trimetazidine reduces myocardial infarct size, relative area at risk, after temporary coronary artery occlusion in the rabbit. *Br J Pharmacol* 1992;107:265P.
7. Boitano S, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular propagation of calcium waves mediated by inositol trisphosphate. *Science* 1992;258:292-295.
8. Bowers KC, Allshire A, Cobbold PH. Continuous measurement of cytoplasmic ATP in single cardiomyocytes during simulation of the "oxygen paradox". *Cardiovasc Res* 1993;27:1831-1839.
9. Brenda RK, Jongsma HJ. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Mol Cell Biochem* 1996;157:92-99.
10. Buerke M, Weyrich AS, Lefer AM. Isolated cardiac myocytes are sensitized by hypoxia-reoxygenation to neutrophil-released mediators. *J Am Physiol* 1994;266:128-136.

11. Buerke M, Murohara T, Lefer A. Cardioprotective effects of a C1 esterasa inhibitor in myocardial ischemia-reperfusion. *Circulation* 1995;91:393-402.
12. Bugge E Ytrehus K. Inhibition of sodium-hydrogen exchange reduces infarct size in the isolated rat heart -a protective additive to ischemic preconditioning. *Cardiovasc Res* 1995;29:269-274.
13. Charles AC, Merrill JE, Dirksen ER, Sanderson MJ. Intercellular signalling in glial cells: calcium waves and oscillations in response to mechanical stimulation and glutamate. *Neuron* 1991;6:983-992.
14. Christ GJ, Moreno AP, Melman A, Spray DC. Gap junction-mediated intercellular diffusion of Ca^{2+} in cultured human corporal smooth muscle cells. *Am J Physiol* 1992;263:C373-C383.
15. Churchill GE, Atkinson MM, Louis CF. Mechanical stimulation initiates cell-to-cell calcium signaling in ovine lens epithelial cells. *J of Cell Science* 1996;109:355-365.
16. Dekker RLC, Fiolet JWT, Van Bavel ED, Coronel R, Opthof T, Spaan JAE, Janse MJ. Intracellular Ca^{2+} , intracellular electrical coupling, and mechanical activity in ischemic rabbit papillary muscle. Effects of preconditioning and metabolic blockade. *Circ Res* 1996;79:237-246.
17. Devynck MA, Le Quan Sang KH, Joulin Y, Mazeaud M. Acute membrane effects of trimetazidine in human platelets. *Eur J Pharmacol* 1993;245:105-110.
18. Downey JM, Yellon DM. Do free radicals contribute to myocardial cell death during ischemia-reperfusion? In DM Yellon, RB Jennings eds. *Myocardial protection: the pathophysiology of reperfusion and reperfusion injury*, 1992. Raven, New York, pp 35-57.
19. Dreyer WJ, Michael LH, West MS, Smith CW, Rothlein R, Rossen RD, Anderson DC, Entman ML. Neutrophil accumulation in ischaemic canine myocardium. Insights into time course, distribution, and mechanism of localization during early reperfusion. *Circulation* 1991;84:400-411.
20. Du Toit EF, Opie LH. Role for the Na^+/H^+ exchanger in reperfusion stunning in isolated perfused rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993;22:877-883.
21. Fantini E, Demaison L, Sentex E, Grynberg A, Athias P. Some biochemical aspects of the protective effect of Trimetazidine on rat cardiomyocytes during hypoxia and reoxygenation. *J Mol Cell Cardiol* 1994;26:946-958.

22. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Cargnoni A, De Giuli F, Visioli O. Occurrence of oxidative stress during myocardial reperfusion. *Mol Cell Biochem* 1992;111:61-69.
23. Ferrari R, Ceconi C, Curello S, Alfieri O, Visioli O. Myocardial damage during ischaemia and reperfusion. *Eur Heart J* 1993;14:25-30.
24. Fliss H, Gattinger D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res* 1996;79:949-956.
25. Flores NA, Goulielmos NV, Seghatchian MJ, Sheridan DJ. Myocardial ischemia induces platelet activation with adverse electrophysiological and arrhythmogenic effects. *Cardiovasc Res* 1994;28:1662-1671.
26. Frank JS, Brandy AJ, Fransworth BS, Mottino G. Ultrastructure and function of isolated myocytes after calcium depletion and repletion. *Am J Physiol* 1986;250:H265-H275.
27. Ganote CE. Contraction band necrosis and irreversible myocardial injury. *J Mol Cell Cardiol* 1983;1195:67-73.
28. Ganote CE. Cell to cell interactions contributing to the "oxygen paradox". *Basic Res Cardiol* 1985;80(2):141-146.
29. Ganote CE, Vander Heide RS. Irreversible injury of isolated adult rat myocytes: Osmotic fragility during metabolic inhibition. *Am J Pathol* 1988;132:212-222.
30. Ganote CE, Vander Heide RS. Importance of mechanical factors in ischemic and reperfusion injury. In: Piper HM, ed. *Pathophysiology of severe ischemic myocardial injury*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1990:337-355.
31. Ganote C, Armstrong S. Ischaemia and the myocyte cytoskeleton: review and speculation. *Cardiovasc Res* 1993;27:1387-1403.
32. Garcia-Dorado D, Théroux P, Desco M, Solares J, Elizaga J, Fernández-Avilés F, Alonso J, Soriano J. Cell-to-cell interaction: a mechanism to explain wave-front progression of myocardial necrosis. *Am J Physiol* 1989;256:H1266-H1273.
33. Garcia-Dorado D, Théroux P, Muñoz R, Alonso J, Elízaga J, Fernández-Avilés F, Botas J, Solares J, Soriano J, Duran JM. Favorable effects of hyperosmotic reperfusion on myocardial edema and infarct size. *Am J Physiol* 1992;H17-H22.
34. Garcia-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, Muñoz R, Elizaga J, Botas J, Fernández-Avilés F, Soriano J, Esteban E. Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*

- 1992;85(3):1160-1174.
35. Garcia-Dorado D. and Oliveras J. Myocardial oedema: a preventable cause of reperfusion injury? *Cardiovasc Res* 1993;27:1555-1563.
 36. Garcia-Dorado D, Inserte J, Ruiz-Meana M, González MA, Solares J, Juliá M, Barrabés JA, Soler-Soler J. The gap junction uncoupler heptanol prevents cell-to-cell progression of hypercontracture and limits necrosis during myocardial reperfusion. *Circulation* 1997 (in press).
 37. Garcia-Dorado D, González MA, Barrabés JA, Ruiz-Meana M, Solares J, Lidon RM, Blanco J, Puigfel Y, Piper HM, Soler-Soler J. Prevention of ischemic rigor contracture during coronary occlusion by inhibition of Na^+/H^+ exchange. *Cardiovasc Res* 1997;35:80-89.
 38. Gilula NB, Reeves OR, Steinbach A. Metabolic coupling, ionic coupling and cell contact. *Nature* 1972;235:262-265.
 39. Harpey C, Clauser P, Labrid C, Freyria JL, Poirier JP. Trimetazidine, a cellular anti-ischemic agent. *Cardiovasc Drug Rev* 1989;6:292-312.
 40. Hendriks M, Mubagwa K, Verdonck F, Overloop K, Van Hecke P, Vastanpel F, Van Lommel A, Verbeken E, Lauweryns J, Flameng W. New Na^+/H^+ exchange inhibitor HOE 694 improves postischemic function, high energy phosphate resynthesis and reduces Ca^{2+} overload in isolated perfused rabbit heart. *Circ Res* 1994;89:2787-2798.
 41. Inserte J, Garcia-Dorado D, Ruiz-Meana M, Solares J, Soler-Soler J. The role of Na^+/H^+ exchange occurring during hypoxia in the genesis of reoxygenation-induced myocardial oedema. *J Mol Cell Cardiol* 1997;29:1167-1175.
 42. Jennings RB, Reimer KA. Lethal myocardial ischemic injury. *Am J Pathol* 1981;102:241-255.
 43. Jennings RB, Shapper J, Hill ML, Steenbergen C, Reimer KA. Effect of reperfusion late in the phase of reversible ischemic injury. Changes in cell volume, electrolytes, metabolites, and ultrastructure. *Circ Res* 1985;56:262-278.
 44. Johnston MF, Simon SA, Ramon F. Interaction of anaesthetics with electrical synapses. *Nature* 1980;286:498-500.
 45. Kajstura J, Cheng W, Reiss K, Clark WA, Sonnenblick EH, Krajewski S, Reed JC, Olivetti G, Anversa P. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest* 1996;74:86-107.
 46. Karmazyn M, Moffat MP. Role of Na^+/H^+ exchange in cardiac physiology and

- pathophysiology: mediation of myocardial reperfusion injury by the pH paradox. *Cardiovasc Res* 1993;27:915-924.
47. Kimura H, Oyamada Y, Ohshika H, Mori M, Oyamada M. Reversible inhibition of gap junctional intercellular communication, synchronus contraction, and synchronism of intracellular Ca^{2+} fluctuation in cultured neonatal rat cardiac myocytes by heptanol. *Exp Cell Res* 1995;220:438-356.
 48. Klein HH, Nebendahl KN, Schubothe M, Kreuzer H. Intracoronary hyperosmotic mannitol during reperfusion does not affect infarct size in ischemic, reperfused porcine hearts. *Basic Res Cardiol* 1985;80:251-259.
 49. Klein HH, Pich S, Bohle RM, Wollenweber J, Nebendahl K. Myocardial protection by Na^+ - H^+ exchange inhibition in ischemic, reperfused porcine heart. *Circulation* 1995;95:912-917.
 50. Kloner RA, Reimer KA, Willerson JT, Jennings RB. Reduction of experimental myocardial infarct size with hyperosmotic mannitol. *Proc Soc Exp Biol Med* 1976;151:677-683.
 51. Koretsune Y, Marban E. Mechanism of ischemic contracture in ferret hearts: Relatives roles of Ca^{2+} elevation and ATP depletion. *Am J Physiol* 1990;258:H9-H16.
 52. Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res* 1994;74:336-343.
 53. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger DN. Modulation of ischemia-reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide. *Circ Res* 1994;74:376-382.
 54. Kwak BR, Jongsma HJ. Regulation of cardiac gap junction channel permeability and conductance by several phosphorylating conditions. *Molecular and Cellular Biochemistry* 1996;157:93-99.
 55. Ladilov YV, Siegmund B, Piper HM. Protection of reoxygenated cardiomyocytes against hypercontracture by inhibition of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol* 1995;268:H1531-H1539.
 56. Ladilov YV, Siegmund B, Balsler C, Piper HM. Simulated ischemia increases the susceptibility of rat cardiomyocytes to hypercontracture. *Circ Res* 1997;80:69-75.
 57. Lavanchy N, Martin J, Rossi A. Anti-ischemic effects of trimetazidine: ^{31}P -NMR spectroscopy in the isolated rat heart. *Arch Int Pharmacodyn Ther* 1987;286:97-110.
 58. Lefer AM, Weyrich AS, Buerke M. Role of selectins, a new family of adhesion molecules, in

- ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1994;28:289-294.
59. Litt MR, Jeremy RW, Weisman FH, Winkelstein JA, Becker LC. Neutrophil depletion limited to reperfusion reduces myocardial infarct size after 90 minutes of ischemia. *Circulation* 1989;80:1816-1827.
 60. López-Farré A, Caramelo C, Esteban A, Alberola ML, Millas I, Monton M, Casado S. Effects of aspirin on platelet-neutrophil interactions. Role of nitric oxide and endothelin-1. *Circulation* 1995;91:2080-2088.
 61. Lorant DE, McEver RP, McIntyre TM, Moore KL, Prescott SM, Zimmermann GA. Activation of polymorphonuclear leukocytes reduces their adhesion to p-selectin and causes redistribution of ligands por p-selectin on their surfaces. *J Clin Invest* 1995;96:171-182.
 62. Ma X-L, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation* 1992;86:937-946.
 63. Maridonneau-Parini K, Harpey C. Effects of Trimetazidine on membrane damage induced by oxygen free radicals in human red cells. *Br J Clin Pharmacol* 1985;20:148-151.
 64. Miyazaki S, Fujiwara H, Onodera T, Kihara Y, Matsuda M, Wu DJ, Nakamura Y, Kumada T, Sasayama S, Kawai C, Hamashima Y. Quantitative analysis of contraction band and coagulation necrosis after ischemia and reperfusion in the porcine heart. *Circulation* 1987;75:1074-1082.
 65. Morris AC, Hagler HK, Willerson JT, Buja LM. Relationship between calcium loading and impaired energy metabolism during Na^+ , K^+ pump inhibition and metabolic inhibition in cultured neonatal rat cardiac myocytes. *J Clin Inves* 1989;83:1876-1887.
 66. Navon G, Werrmann JG, Maron R, Cohen SM. ^{31}P NMR and triple quantum filtered ^{23}Na NMR studies of the effects of inhibition of Na^+/H^+ exchange on intracellular sodium and pH in working and ischemic hearts. *Magn Reson Med* 1994;32:556-564.
 67. Owens LM, Fralix TA, Murphy E, Cascio WE, Gettes LS. Correlation of ischemia-induced extracellular and intracellular ion changesto cell-to-cell electrical uncoupling in isolated blood-perfused rabbit hearts. *Circulation* 1996;94:10-13.
 68. Page E. Cardiac gap junctions. In: HA Fozzard, E Haber, RB Jennings eds. *The Heart and Cardiovascular System*, 1992. Raven Press Ltd., New York, pp 1003-1048.
 69. Peters NS, Green CR, Poole-Wilson PA, Severs NJ. Reduced content of connexin 43 gap junctions in ventricular myocardium from hypertrophied and ischemic human hearts.

- Circulation 1993;88:864-875.
70. Pike MM, Luo CS, Clark MD, Kirk KA, Kitakaze M, Madden MC, Cragoe EJ, Pohost GM. NMR measurements of Na^+ and cellular energy in ischemic rat heart: role of Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol* 1993;265:H2017-H2026.
 71. Piper HM, Schwartz P, Spahr R, Hütter JF, Spieckermann PG. Absence of reoxygenation damage in isolated heart cells after anoxic injury. *Pflugers Arch* 1984;367:129-139.
 72. Piper HM, Spahr R, Hütter J, Spieckermann PG. The calcium and the oxygen paradox: Non-existent on the cellular level. *Basic Res Cardiol* 1985;80:159-163.
 73. Piper HM, Balser C, Ladilov YV, Schäfer M, Ruiz-Meana M, Garcia-Dorado D. The role of Na^+/H^+ exchange in ischemia-reperfusion. *Basic Res Cardiol* 1996;91:191-202.
 74. Piper HM, Garcia-Dorado D, Ovize M. A fresh look in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1997 (in press).
 75. Renaud JF. Internal pH, Na^+ and Ca^{2+} regulation by Trimetazidine during cardiac cell acidosis. *Cardiovas Drugs and Ther* 1988;1:677-686.
 76. Roos KP. Length, width, and volume changes in osmotically stressed myocytes. *Am J Physiol* 1986;251:H1373-H1378.
 77. Sack S, Mohri M, Schwarz ER, Arras M, Schaper J, Ballagi-Pordány G, Scholz W, Lang HJ, Schölkens BA, Schaper W. Effects of a new Na^+/H^+ antiporter inhibitor on postischemic reperfusion in pig heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;23:72-78.
 78. Sáez JC, Connor JA, Spray D, Bennett MVL. Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5,-trisphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci* 1989;86:2708-2712.
 79. Sanz E, Garcia-Dorado D, Oliveras J, Barrabés JA, González MA, Ruiz-Meana M, Solares J, Carreras MJ, García-Lafuente A, Desco M, Soler-Soler J. Dissociation between anti-infarct effect and anti-edema effect of ischemic preconditioning. *Am J Physiol* 1995;268:H233-H241.
 80. Saraste A, Pulkki K, Kallajoki M, Henriksen K, Parvinen M, Voipio-Pulkki LM. Apoptosis in human acute myocardial infarction. *Circulation* 1997;95:320-323.
 81. Scholz W, Albus U, Lang HJ, Linz W, Martorana PA, Englert HC, Schölkens BA. HOE694, a new Na^+/H^+ exchange inhibitor and its effects in cardiac ischaemia. *Brit J Pharmacol* 1993;109:562-568.

82. Scholz W, Albus U, Counillon L, Gögelein H, Lang HJ, Linz W, Weichert A, Shölkens BA. Protective effects of HOE642, a selective sodium-hydrogen exchange subtype 1 inhibitor, on cardiac ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1995;29:260-268.
83. Severs NJ. The cardiac gap junction and intercalated disc. *Int J Cardiol* 1990;26:137-173.
84. Severs NJ. Cardiac muscle cell interaction: from microanatomy to the molecular make-up of the gap junction. *J Histopathol* 1995;10:481-501.
85. Siegmund B, Koop A, Klietz T, Schwartz P, Piper HM. Sarcolemmal integrity and metabolic competence of cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation. *Am J Physiol* 1990;258:H285-H291.
86. Siegmund B, Klietz T, Schwartz P. et al. Temporary contractile blockade prevents hypercontracture in anoxic-reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1991;260:H426-435.
87. Siegmund B, Zude R, Piper HM. Recovery of anoxic-reoxygenated cardiomyocytes from severe Ca^{2+} overload. *Am J Physiol* 1992;263:H1262-1269.
88. Siegmund B, Ladilov YV, Piper HM. Importance of Na^+ for the recovery of Ca^{2+} control in reoxygenated cardiomyocytes. *Am J Physiol* 1994;267:H506-H513.
89. Sigiura H, Toyama J, Tsuboi N, Kamiya K, Kodama I. ATP directly affects junctional conductance between paired ventricular myocytes isolated from guinea pig heart. *Circ Res* 1990;66:1095-1102.
90. Solares J; Garcia-Dorado D, Oliveras J, González MA, Ruiz-Meana M, Barrabés JA, González-Bravo C, Soler-Soler J. Contraction band necrosis at the lateral borders of the area at risk in reperfused infarcts. *Virchows Arch* 1995;426:393-399.
91. Spray DC, White RL, Mazet F, et al. Regulation of gap junctional conductance. *Am J Physiol* 1985;248:H753-H764.
92. Steenbergen CH, Hill ML, Jennings RB. Volume regulation and plasma membrane injury in aerobic, anaerobic and ischemic myocardium in vitro. *Circ Res* 1985;57:864-875.
93. Steenbergen C, Hill ML, Jennings RB. Cytoskeletal damage during myocardial ischemia: Changes in vinculin immunofluorescence staining during total in vitro ischemia in canine heart. *Circ Res* 1987;60:478-486.
94. Stern MD, Chien AM, Capogrossi MC, Pelto DJ, Lakatta EG. Direct observation of the oxygen paradox in single rat ventricular myocytes. *Circ Res* 1985;56:899-903.

95. Tani M, Neely JR. Role of intracellular Na^+ in Ca^{2+} overload and depressed recovery of ventricular function of reperfused ischemic rat hearts. Possible involvement of H^+/Na^+ and $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ exchange. *Circ Res* 1989;65:1045-1056.
96. Tomita M, Gotoh F. Cascade of cell swelling: thermodynamic potential discharge of brain cells after membrane injury. *Am J Physiol* 1992;262:H603-H610.
97. Tranum Jensen J, Janse M, Fiolet JWT, Krieger WJG, D'Alnoncourt CN, Durrer D. Tissue osmolality, cell swelling and reperfusion in acute regional myocardial ischemia in the isolated porcine heart. *Circ Res* 1981;49:364-381.
98. Vander Heide RS, Ganote CE. Increased myocyte fragility following anoxic injury. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:1085-1103.
99. Verkley AJ, Post JA. Physico-chemical properties and organization of lipids in membranes: their possible role in myocardial injury. *Basic Res Cardiol* 1987;82(1):85-91.
100. White RL, Spray DC, Campos de Carvalho AC, Wittenberg BA, Bennett MVL. Some electrical and pharmacological properties of gap junctions between adult ventricular myocytes. *Am J Physiol* 1985;249:C447-C455.
101. White RL, Doller JE, Verselis VK, Wittenberg BA. Gap junctional conductance between pairs of ventricular myocytes is modulated synergistically by H^+ and Ca^{2+} . *J Gen Physiol* 1990;95:1061-1075.
102. Yang BC, Mehta JL. Platelet-derived adenosine contributes to the cardioprotective effects of platelets against ischemia-reperfusion injury in isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol* 1994;24:779-785.
103. Yasutake M, Ibuki C, Hearse DJ, Avkiran M. Na^+/H^+ exchange and reperfusion arrhythmias: protection by intracoronary infusion of a novel inhibitor. *Am J Physiol* 1994;267:H2430-H2440.