

# Papel de las especies reactivas del oxígeno en el daño al miocardio inducido por isquemia/reperfusión

LIVAN DELGADO-ROCHE, GREGORIO MARTÍNEZ-SÁNCHEZ

Recibido: 06/07/2009

Aceptado: 11/08/2009

**Dirección para separatas:**

Lic. Livan Delgado-Roche  
Centro de Estudios para las Investigaciones y Evaluaciones Biológicas,  
Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana  
Calle 222 y Ave 27A No. 21425,  
La Coronela, La Habana, Cuba  
Tel. (537) 2719531/38  
Fax (537) 2736811  
e-mail: livan@cieb.sld.cu  
ldelgadoroche@gmail.com

**RESUMEN**

Las enfermedades de las arterias coronarias constituyen una de las principales causas de muerte en los países occidentales. Una de las manifestaciones patológicas en este tipo de enfermedades es el daño al miocardio, el cual puede ser una consecuencia de los episodios de isquemia/reperfusión que tienen lugar. A pesar de la complejidad de los mecanismos responsables de la afectación al miocardio inducida por isquemia/reperfusión, se han podido identificar algunos factores que inciden notablemente en este proceso. Una serie de evidencias implican a las especies reactivas del oxígeno y al estrés oxidativo en el daño celular que se produce durante un episodio de isquemia/reperfusión. En este trabajo se realizó una revisión del tema a través de una búsqueda bibliográfica en la base de datos *Medline* con el objetivo de abordar el papel que desempeñan las especies reactivas del oxígeno durante la isquemia/reperfusión en el miocardio.

REV ARGENT CARDIOL 2010;78:54-60.

**Palabras clave >**

Isquemia - Reperfusión - Especies reactivas del oxígeno - Estrés oxidativo

**Abreviaturas >**

<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico	<b>NADPH</b>	Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina reducido
<b>ADP</b>	Difosfato de adenosina	<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>ATP</b>	Trifosfato de adenosina	<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintetasa
<b>ECV</b>	Enfermedades cardiovasculares	<b>PI</b>	Precondicionamiento isquémico
<b>EO</b>	Estrés oxidativo	<b>PMT</b>	Permeabilidad mitocondrial transciente
<b>ERO</b>	Especies reactivas del oxígeno	<b>POL</b>	Peroxidación lipídica
<b>GC</b>	Guanilato ciclasa	<b>PTPm</b>	Poros transcientes de permeabilidad mitocondrial
<b>GMPc</b>	Monofosfato cíclico de guanosina	<b>RL</b>	Radical libre
<b>I/R</b>	Isquemia/reperfusión	<b>SOD</b>	Superóxido dismutasa
<b>IAM</b>	Infarto agudo de miocardio	<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Factor de necrosis tumoral alfa
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintetasa inducible	<b>XO</b>	Xantina oxidasa
<b>NAD</b>	Dinucleótido de nicotinamida y adenina		
<b>NAD<sup>+</sup></b>	Forma oxidada del dinucleótido de nicotinamida y adenina		

**GENERALIDADES**

Las enfermedades de las arterias coronarias constituyen una de las principales causas de muerte en los países occidentales. Una de las manifestaciones patológicas en este tipo de enfermedades lo constituye el daño al miocardio, el cual puede ser una consecuencia de los episodios de isquemia/reperfusión (I/R) que tienen lugar. (1) Las consecuencias del daño al miocardio inducido por I/R pueden diferir según la magnitud de este fenómeno. En este sentido, pueden originarse daños puntuales que derivan en una reversión de la afectación o bien dañan zonas extensas y conducen a la muerte celular, a la inestabilidad permanente del miocardio y al fallecimiento del paciente. (2)

Con dependencia del tiempo de duración de la isquemia, se han comunicado tres tipos de daño cardíaco. El primer tipo de daño detectable es la aparición de arritmias cardíacas provocadas por la reperfusión del tejido. Generalmente, la reperfusión que se produce luego de 1-5 min de isquemia puede dar por resultado episodios de taquicardia ventricular o fibrilación sin muerte celular ni déficit en los cambios de contractilidad ventricular. (3) La reperfusión producida después de transcurridos 5-20 min de isquemia lleva al segundo tipo de daño, conocido como atontamiento del miocardio. (3, 4) Éste se caracteriza por un déficit de la contractilidad miocárdica, lo que ocurre sin que se produzca muerte celular. Esta falla de la contractilidad ventricular puede persistir por un

período de hasta 72 horas después del evento de I/R. El tercer tipo de daño y más lesivo es el que se produce cuando la isquemia supera los 20 min. En estas circunstancias, el daño al cardiomiocito es irreversible y el resultado es la muerte celular, lo que puede originar un infarto agudo de miocardio (IAM). (3)

Es conocido que la muerte del cardiomiocito inducida por I/R puede ocurrir por mecanismos apoptóticos y necróticos, donde el daño mitocondrial tiene un papel central en ambas formas de muerte celular. (5-7) A través de la fosforilación oxidativa que se lleva a cabo en la mitocondria, las células del músculo cardíaco obtienen la energía necesaria para realizar sus funciones. (8) La mitocondria desempeña un papel fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular. Esta organela es responsable de suplir los requerimientos energéticos, regular las concentraciones de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, así como de otros eventos fisiológicos necesarios para el funcionamiento adecuado del cardiomiocito. (9) Al mismo tiempo puede estar asociada con eventos que tienen lugar en condiciones patológicas, como el aumento de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular, la activación de proteasas, de proteínas proapoptóticas y antiapoptóticas, entre otras. (10)

Alrededor del 90% del metabolismo del corazón es aeróbico, con un consumo de oxígeno que oscila entre 60 y 150 mmol/min en seres humanos. (11) Este nivel alto de capacidad oxidativa es posible, ya que se estima que el 25-35% del volumen total del cardiomiocito está ocupado por mitocondrias. (12) Dado que el músculo cardíaco es un tejido fundamentalmente aeróbico, una reducción del flujo sanguíneo traería aparejada una disminución del transporte de oxígeno a las células. Al mismo tiempo se afectaría la oxidación de ácidos grasos y el ciclo de los ácidos tricarbónicos, lo cual comprometería el ATP generado durante la fosforilación oxidativa y se produciría así la muerte celular. (8, 13)

### **ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO: CONTRIBUYENTES DEL DAÑO Y MUERTE CELULAR EN ISQUEMIA/ REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO**

A pesar de la complejidad de los mecanismos responsables de la afectación al miocardio inducido por I/R, se han podido identificar algunos factores que inciden notablemente en este proceso de daño celular. (2) Muchas evidencias apuntan a la existencia de una serie de eventos relacionados entre sí, en los que se incluyen la disminución del ATP celular, la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO), la acumulación de iones  $\text{H}^+$ , la activación de leucocitos, las metaloproteinasas y las caspasas, así como el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  intracelular. (4, 8, 9, 14-18)

A continuación se centra la atención en el papel que desempeñan las ERO en el fenómeno de I/R del miocardio, así como su relación con otros procesos involucrados en él.

Existe una serie de evidencias que implican a las ERO y al estrés oxidativo (EO) en el daño celular que se produce durante un episodio de I/R (Figura 1). (19, 20) Dada la gran variedad y complejidad de procesos mediados por estos agentes oxidantes, se hace difícil definir un mecanismo principal que explique su asociación con este tipo de daño celular. Se sabe, en cambio, que pueden afectar biomoléculas esenciales, como son los lípidos, las proteínas y el ADN. (21)

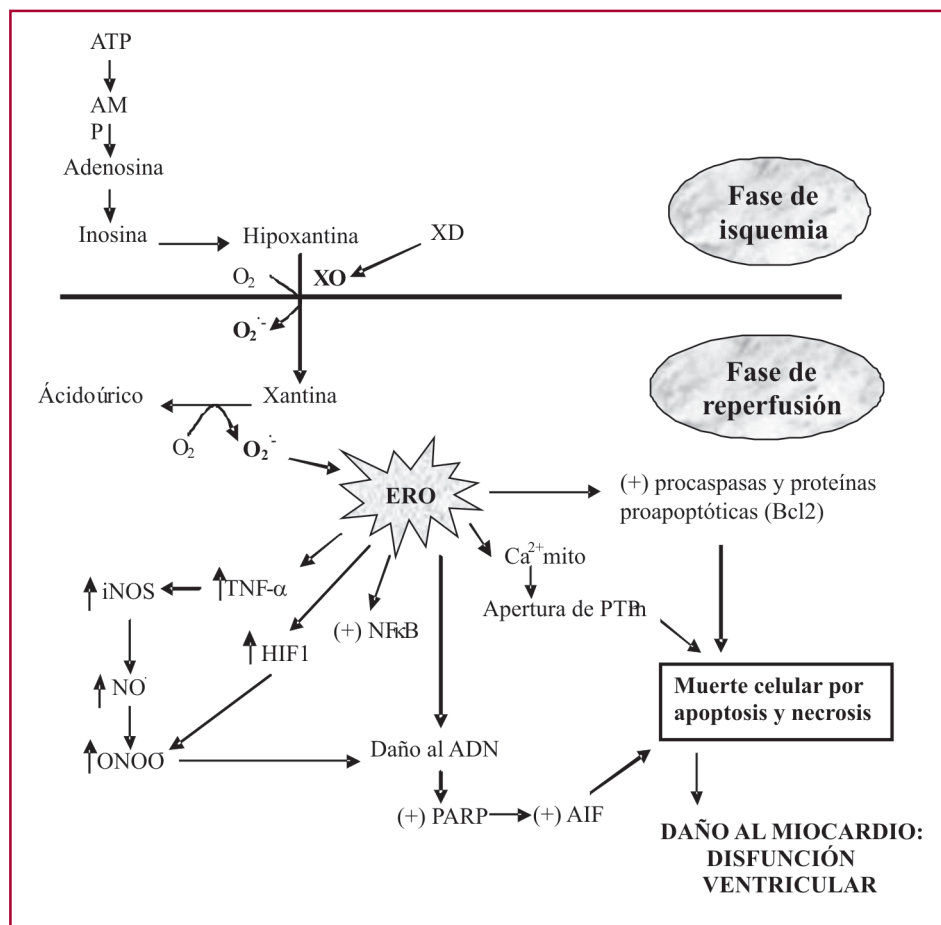
Estudios realizados con antioxidantes han reforzado el criterio anterior al mostrar efectos protectores contra el daño celular en modelos de I/R, efectos que pueden ser dependientes de la dosis, ya que la administración de dosis bajas de antioxidantes se ha relacionado con niveles bajos de daño. (22, 23)

Según se planteó anteriormente, la cadena respiratoria mitocondrial constituye la fuente primaria de obtención de energía para las células del corazón; sin embargo, paralelamente a esto, constituye la fuente generadora principal de ERO, (24) como puede verse en la Figura 2. Durante la I/R, los complejos I y III de la cadena de transporte de electrones son los responsables de la mayor producción de ERO. (8) En esta vía se genera el radical anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ), el cual es dismutado por acción de la superóxido dismutasa (SOD) para formar peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); este último puede provocar daños en forma directa o indirecta, a través de la formación del radical hidroxilo (OH) catalizada por metales de transición (reacción de Fenton y Haber-Weis). (25) Otras vías generadoras de ERO en el miocardio isquémico son el NADPH oxidasa y la xantina oxidasa (XO), así como la infiltración de neutrófilos durante la reperfusión. (26, 27)

La generación de ERO en el corazón durante la I/R se ha demostrado a través de técnicas de alta sensibilidad como la resonancia paramagnética de electrones. (26) La cantidad de ERO que se generan en las células afectadas depende tanto del tiempo de anoxia como de la reoxigenación. (28) Las evidencias experimentales sobre la relación de éstas con la I/R incluyen la detección de peróxidos lipídicos, la oxidación de proteínas y los productos de nitración de éstas luego de la reperfusión miocárdica. (15, 29) Otros mecanismos involucrados en el daño oxidativo son los procesos de oxidación del ADN celular y mitocondrial. (30)

En respuesta a la generación de concentraciones bajas de ERO pueden activarse mecanismos cardioprotectores. En condiciones de normoxia, los mecanismos antioxidantes endógenos (SOD, catalasa y glutatión peroxidasa) son capaces de amortiguar los daños oxidativos; sin embargo, al elevarse dichas concentraciones ocurre todo lo contrario. (8) Experimentos realizados en animales han mostrado baja capacidad antioxidante en el corazón, tanto sano como tratado con adriamicina. Esto hace de este órgano un blanco susceptible a los procesos de daño causados por el EO. (31)

Otras comunicaciones relacionan a las ERO y la homeostasis cálcica como contribuyentes del daño ce-



**Fig. 1.** Papel de las especies reactivas del oxígeno en los mecanismos de señalización que tienen lugar durante un episodio de I/R del miocardio. XD: Xantina deshidrogenada. XO: Xantina oxidasa.  $O_2^-$ : Radical anión superóxido. ERO: Especies reactivas del oxígeno. iNOS: Óxido nítrico sintetasa inducible. TNF- $\alpha$ : Factor de necrosis tumoral alfa. HIF1: Factor inducible por hipoxia tipo 1. NF $\kappa$ B: Factor de transcripción nuclear kappa B. PTPm: Poros transcientes de permeabilidad mitocondrial. NO: Óxido nítrico. ONOO $^-$ : Peroxinitrito. PARP: poli(ADP-ribosa)polimerasa. AIF: Factor inductor de la apoptosis. (+): Activación.

lular inducido por I/R. (2) Existe un efecto dual entre estos factores. En primera instancia, el incremento del  $Ca^{2+}$  citosólico puede provocar alteraciones a través de la activación de proteasas (calpaína y catepsina), lo cual promueve el daño mitocondrial y la subsecuente generación de ERO. Por otra parte, el EO puede llevar al aumento del  $Ca^{2+}$  intracelular por diferentes vías, (32, 33) por ejemplo, a través de la formación de aldehídos reactivos (4-hidroxil-2,3-trans-nonenal), los que reducen la actividad del ATPasa  $Ca^{2+}$  dependiente de la membrana citoplasmática. (32) Este daño oxidativo provoca un retardo en el flujo de  $Ca^{2+}$  a través de la membrana y facilita la acumulación de este catión en el interior celular. (2)

Varios autores afirman que esto contribuye al daño celular en I/R, ya que se ha observado que una inhibición de la entrada excesiva de  $Ca^{2+}$  a la mitocondria disminuye las áreas de infarto en preparaciones *in vitro* de corazón. (8) También se conoce que la exposición a concentraciones elevadas de  $Ca^{2+}$  en condiciones patológicas provoca la permeabilización de la membrana mitocondrial en un número determinado de moléculas (< 1.500 Da). Este fenómeno se conoce como permeabilidad mitocondrial transciente (PMT). La apertura de poros en la membrana facilita la salida de moléculas como el citocromo *c* y la pérdida de nu-

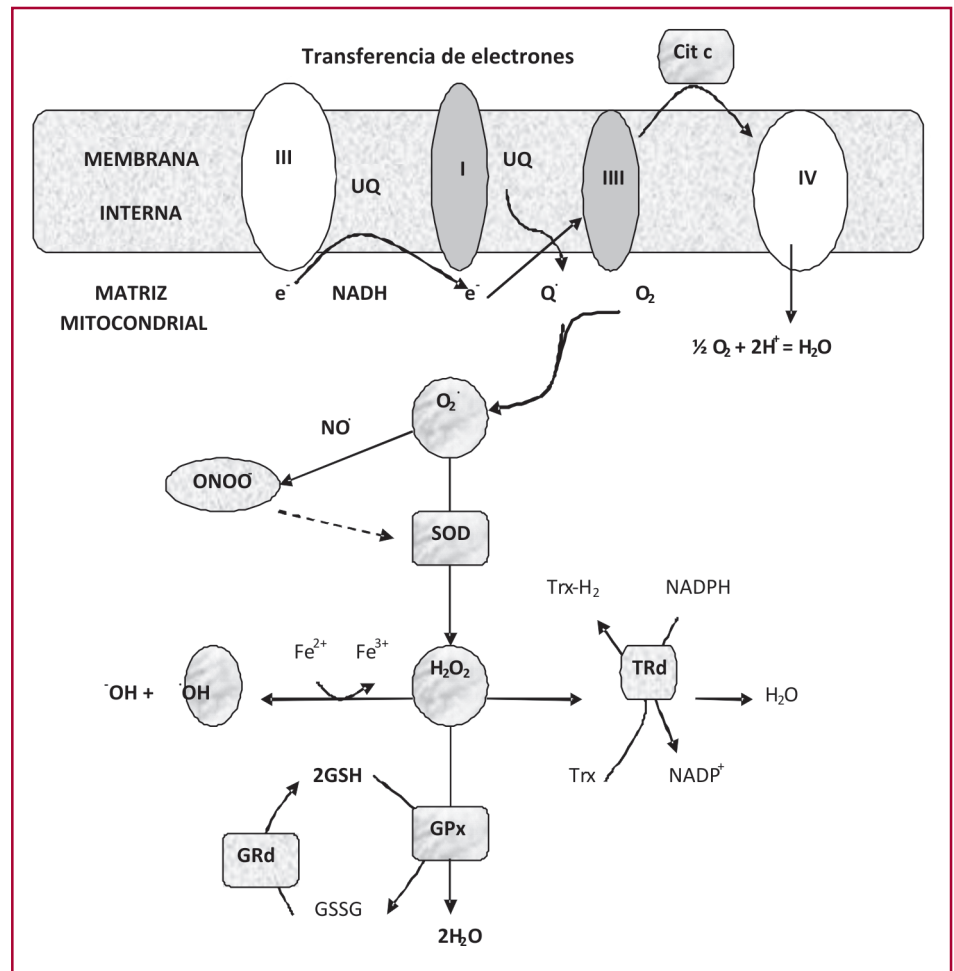
cleótidos, especialmente de  $NAD^+$  y ADP. Este proceso afecta el potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi$ ), la generación de ATP y por consiguiente se produce la muerte celular por necrosis. (34)

La liberación de citocromo *c* a través de los poros transcientes de permeabilidad mitocondrial (PTPm) también puede activar rutas de muerte celular de tipo apoptótico. (36) Este proceso es regulado por la familia de proteínas Bcl-2, cuyo sitio de acción son los PTPm. Estudios recientes han revelado que concentraciones bajas de óxido nítrico (NO) generadas en la mitocondria pueden prevenir la apertura de estos poros a través de un mecanismo que involucra la inhibición de la acumulación de  $Ca^{2+}$  en la mitocondria. (37) Otros efectos antiapoptóticos del NO en concentraciones moderadas pueden estar relacionados con la inhibición de los procesos de peroxidación lipídica (POL), el cual desempeña un papel fundamental en la apertura de estos poros. (35)

### ÓXIDO NÍTRICO E ISQUEMIA/REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO

El NO es un vasodilatador endógeno, involucrado en varios procesos fisiológicos en el organismo. Este agente es sintetizado por una familia de enzimas denomi-

**Fig. 2.** Generación de ERO durante la fosforilación oxidativa a partir de los complejos I y III de la cadena de transporte electrónico. El complejo I (NADH-ubiquinona óxido-reductasa) cataliza la primera transferencia electrónica. Posteriormente, la ubiquinona Q10 (UQ) del complejo III cataliza la conversión del oxígeno molecular en anión superóxido ( $O_2^-$ ). A partir de este radical se forman otras ERO, como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidroxilo ( $OH$ ). GPx: Glutación peroxidasa. GRd: Glutación reductasa. GSH: Glutación reducido. GSSG: Forma oxidada del glutación. NO: Óxido nítrico. ONOO $^-$ : Peroxinitrito. Cit c: Citocromo c. TRd: Tiorredoxina reductasa. Trx: Tiorredoxina, forma reducida. Trx- $H_2$ : Tiorredoxina, forma oxidada. NADPH: Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma reducida). NADP $^+$ : Fosfato de dinucleótido de nicotinamida y adenina (forma oxidada).



nadas óxido nítrico sintetasas (NOS) a través de la oxidación enzimática del grupo guanidino de la L-arginina para formar L-citrulina y NO. Esto ocurre en dos reacciones secuenciales en las que se utilizan como cofactores NADPH y tetrahidroxipterina ( $BH_4$ ) e involucra además al oxígeno. Los efectos fisiológicos del NO (vasorrelajación, señalización neuronal) están mediados por la activación de una isoforma soluble de la guanilato ciclasa (GC); sin embargo, la explicación de sus modos de acción durante procesos fisiopatológicos es mucho más compleja. (38)

El NO se ha asociado con la protección contra la muerte celular provocada por isquemia en un gran número de estudios, (36) aunque su mecanismo y modo de acción no se ha esclarecido del todo. (21) Este agente vasodilatador endógeno se requiere para que se produzca el efecto citoprotector inducido por el preconditionamiento isquémico (PI) en el corazón. (37, 39) Este efecto podría producirse durante la isquemia o la reperfusión; sin embargo, aún no es posible circunscribirlo a uno de estos momentos. Además, algunos estudios sugieren que el NO puede potenciar los

mecanismos apoptóticos en respuesta al proceso de I/R en forma dependiente de la dosis. (40, 41) Aun cuando la mayoría de los estudios apuntan hacia un papel citoprotector del NO durante la I/R miocárdica y el PI, resulta de gran importancia identificar los mecanismos responsables de este tipo de efecto protector. (42) Éstos podrían estar relacionados con el incremento de monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) mediado por el NO, (42, 43) la modulación de la acumulación de  $Ca^{2+}$  intracelular, (44) la apertura de canales del  $K^+$  dependientes del ATP mitocondriales (45, 46) o a través de la inhibición de la PMT durante el fenómeno de I/R. (47-49)

Otros estudios atribuyen la capacidad protectora del NO durante la reperfusión a la recuperación del  $\Delta\Psi$ , lo cual no estuvo relacionado con la activación de la guanilato ciclasa (GC) ni con la inhibición de los canales del  $K^+$  dependientes del ATP, sino que más bien pudo deberse a la modulación del EO originado durante la isquemia. (21) Todas estas evidencias refuerzan el criterio de que el NO es capaz de conferir citoprotección y modular los procesos de muerte celular asociados con la I/R en el corazón.

### **RADICAL ANIÓN SUPERÓXIDO E ISQUEMIA/ REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO**

Una de las ERO generadas en la mitocondria es el  $O_2^-$ . (50) En condiciones fisiológicas, el  $O_2^-$  participa en varios mecanismos de señalización y control celular; sin embargo, una pérdida en la regulación de su producción se asocia con estados patológicos de gran interés en la práctica médica. (49)

La generación de  $O_2^-$  a partir de los complejos I y III de la cadena transportadora de electrones ocurre tanto en la matriz mitocondrial como en el espacio intermembrana. (50) Dada la incapacidad del  $O_2^-$  para difundirse a través de la membrana interna de la mitocondria, pueden verse afectadas diferentes estructuras y funciones de esta organela. Con dependencia de la localización de este radical libre (RL), se producen daños en lípidos, proteínas y ADN. (51) El daño en el ADN mitocondrial (ADNm) originado por el  $O_2^-$  durante la I/R del miocardio afecta la síntesis de péptidos codificados por éste y que participan en la cadena de transporte electrónico. Esto trae como consecuencia la generación de una cantidad mayor de ERO y finalmente la muerte celular. (49) Además, una generación persistente de  $O_2^-$  provoca una disrupción del balance redox celular, lo que favorece la activación del factor de transcripción nuclear NF- $\kappa$ B con la consecuente expresión del factor de necrosis tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), de óxido nítrico sintetasa inducible (iNOS), entre otros, así como de ASK-1, la cual induce la activación de las rutas de muerte celular mitocondrial vía MAPK p38 o JNK. (52, 53)

Por otra parte, el  $O_2^-$  es capaz de reaccionar con el NO y formar peroxinitrito (ONOO $^-$ ), el cual desempeña un papel fundamental en los daños celulares relacionados con la I/R. (49)

### **PEROXINITRITO E ISQUEMIA/REPERFUSIÓN DEL MIOCARDIO**

El ONOO $^-$  es un potente oxidante biológico, que se forma a través de la reacción que se produce entre el NO y el  $O_2^-$ . (54) Existen evidencias crecientes que apuntan a la generación de ONOO $^-$  como el mecanismo responsable de la muerte celular en una serie de enfermedades, entre las que se encuentra la aterosclerosis (55) y la I/R del miocardio. (56)

La oxidación de proteínas, lípidos y ADN, así como la nitración de los residuos tirosina de las proteínas, representan las consecuencias más importantes del ONOO $^-$  en los sistemas biológicos. (57, 58) Con dependencia de la magnitud de los daños oxidativos provocados por el ONOO $^-$ , las células pueden morir a través de procesos necróticos o apoptóticos. (59)

Se acepta en general que la necrosis celular está relacionada con la activación de la enzima nuclear poli(ADP-ribosa)polimerasa (PARP). El daño colateral más importante como consecuencia de la activación de esta enzima lo constituye la depleción de las

reservas de NAD $^+$  celular. Esto se traduce en una actividad glucolítica reducida, así como en una depresión de la cadena transportadora de electrones mitocondrial, lo cual culmina en una falla energética y necrosis celular. (60)

Durante los últimos años ha sido centro de atención la relación del ONOO $^-$  con las enfermedades cardiovasculares (ECV). (61) Diversos estudios revelan la acumulación de nitrotirosina, un marcador del daño inducido por el ONOO $^-$ , en hipoxia miocárdica, (62) I/R (63) y en procesos de trasplante de corazón. (64) Los mecanismos que median los efectos necróticos del ONOO $^-$  sobre las células del corazón incluyen la inhibición de enzimas clave como la Ca $^{2+}$  ATPasa dependiente del retículo sarcoplasmático y la creatinasa, (65) la activación de metaloproteinasas, (66) la modulación de la familia de las MAP cinasas (67) y el NF $\kappa$ B, (68) así como la activación de la enzima PARP. (69) En estudios recientes, Levrant y colaboradores concluyeron que además de los efectos necróticos del ONOO $^-$  sobre el cardiomiocito, este agente oxidante también puede provocar la muerte celular a través de mecanismos apoptóticos. Estos investigadores observaron que, en cultivo de células, las características de la muerte celular inducida por el ONOO $^-$  compartían semejanzas con la apoptosis, como, por ejemplo, fragmentación del ADN y alteraciones morfológicas del núcleo, así como la activación de la caspasa-3 y el clivaje de la enzima PARP. Por estas razones se puede pensar que esta ERO constituye un contribuyente fundamental del daño y muerte celular en una amplia variedad de patologías cardiovasculares. (70)

### **CONCLUSIÓN**

Entre los mecanismos fisiopatológicos de la I/R, uno de los más impactantes es sin lugar a dudas el que postula la participación de las ERO durante ambas fases del proceso. El desequilibrio redox y el subsecuente EO, presente en diversas patologías, continuará siendo centro de atención y debate en la comunidad científica. La aparición de resultados paradójicos y el intento por explicarlos impulsarán los esfuerzos que se realizan en este campo de investigación para contribuir así al esclarecimiento de su papel en la fisiopatología de muchas enfermedades. Todo aporte que se realice en este sentido tendrá indudablemente un impacto positivo en la salud humana.

---

### **SUMMARY**

#### **Role of Reactive Oxygen Species in Myocardial Damage Induced by Ischemia/Reperfusion**

Coronary artery diseases are one of the main causes of death in the western countries. Myocardial damage is one of the pathological manifestations of this type of diseases and it

may be the consequence of the episodes of ischemia/reperfusion. The mechanisms responsible for myocardial damage induced by ischemia/reperfusion are complex, yet a few factors linked with this process have been identified. Reactive oxygen species and oxidative stress have been involved in cell damage during an episode of ischemia/reperfusion. We performed a review of this matter through a bibliographic search in Medline to determine the role of reactive oxygen species during myocardial ischemia/reperfusion.

**Key words** > Ischemia - Reperfusion - Reactive Oxygen Species - Oxidative Stress

## BIBLIOGRAFÍA

1. Reeve JL, Duffy AM, O'Brien T, Samali A. Don't lose heart-therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease. *J Cell Mol Med* 2005;9:609-22.
2. Powers SK, Quindry JC, Kavazis AN. Exercise-induced cardioprotection against myocardial ischemia-reperfusion injury. *Free Radic Biol Med* 2008;44:193-201.
3. Downey JM. Free radicals and their involvement during long-term myocardial ischemia and reperfusion. *Annu Rev Physiol* 1990;52:487-504.
4. Bolli R, Marbán E. Molecular and cellular mechanisms of myocardial stunning. *Physiol Rev* 1999;79:609-34.
5. Honda HM, Korge P, Weiss JN. Mitochondria and ischemia/reperfusion injury. *Ann N Y Acad Sci* 2005;1047:248-58.
6. Gottlieb RA. Mitochondria and apoptosis. *Biol Signals Recept* 2001;10:147-61.
7. Nakagawa T, Shimizu S, Watanabe T, Yamaguchi O, Otsu K, Yamagata H, et al. Cyclophilin D-dependent mitochondrial permeability transition regulates some necrotic but not apoptotic cell death. *Nature* 2005;434:652-8.
8. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischemia and reperfusion. *Biochem J* 2005;390:377-94.
9. Gottlieb RA. Mitochondrial signaling in apoptosis: mitochondrial daggers to the breaking heart. *Basic Res Cardiol* 2003;98:242-9.
10. Martinou JC, Green DR. Breaking the mitochondrial barrier. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2001;2:63-7.
11. Sun KT, Yeatman LA, Buxton DB, Chen K, Johnson JA, Huang SC, et al. Simultaneous measurement of myocardial oxygen consumption and blood flow using [1-carbon-11] acetate. *J Nucl Med* 1998;39:272-80.
12. Dobson GP, Himmelreich U. Heart design: free ADP scales with absolute mitochondrial and myofibrillar volumes from mouse to human. *Biochem Biophys Act* 2002;1553:261-7.
13. Trueblood NA, Ramasamy R, Wang LF, Scafer S. Niacin protects the isolated heart from ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000;279:H764-71.
14. French JP, Quindry JC, Falk DJ, Staib JL, Lee Y, Wang KK, et al. Ischemia-reperfusion-induced calpain activation and SERCA2a degradation are attenuated by exercise training and calpain inhibition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H128-36.
15. Zweier JL, Fertman J, Wei G. Nitric oxide and peroxynitrite in postischemic myocardium. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:11-22.
16. Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004;305:626-9.
17. Hoffman JW Jr, Gilbert TB, Poston RS, Silldorff EP. Myocardial reperfusion injury: etiology, mechanisms, and therapies. *J Extra Corpor Technol* 2004;36:391-411.
18. Zweier JL, Talukder MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006;70:181-90.
19. Martínez G, Popov I, Pérez G, Al Dalaen SM, Horwat R, Giuliani A, et al. Contribution to characterization of oxidative stress in diabetic patients with macroangiopathic complications. *Act Farm Bonaerense* 2005;24:197-203.
20. León OS, Martínez G, García I, Bilbao T, Ledesma L. Balance antioxidante/pro-oxidante: salud y enfermedad. 1ª ed. Ciudad de La Habana, 2004. p. 2, 61.
21. Iwase H, Robin E, Guzy RD, Mungai PT, Vanden Hoek TL, Chandel NS, et al. Nitric oxide during ischemia attenuates oxidant stress and cell death during ischemia and reperfusion in cardiomyocytes. *Free Radic Biol Med* 2007;43:590-9.
22. Levraut J, Iwase H, Shao ZH, Vanden Hoek TL, Schumacker PT. Cell death during ischemia: relationship to mitochondrial depolarization and ROS generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H549-58.
23. Marczin N, El-Habashi N, Hoare GS, Bundy RE, Yacoub M. Antioxidants in myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutic potential and basic mechanisms. *Arch Biochem Biophys* 2003;420:222-36.
24. Griendling KK, FitzGerald GA. Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I. Basic mechanism and in vivo monitoring of ROS. *Circulation* 2003;108:1912-6.
25. Ganguly K, Kundu P, Banerjee A, Reiter RJ, Swarnaker S. Hydrogen peroxide-mediated down regulation of matrix metalloproteinase-2 in indomethacin-induced acute gastric ulceration is blocked by melatonin and other antioxidants. *Free Radic Biol Med* 2006;41:911-25.
26. Angelos MG, Kutala VK, Torres CA, He G, Stoner JD, Mohammad M, et al. Hypoxic reperfusion of the ischemic heart and oxygen radical generation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H341-7.
27. Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, James AM, Smith RA, Murphy MP, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J* 2005;19:1088-95.
28. Li C, Jackson RM. Reactive species mechanisms of cellular hypoxia reoxygenation injury. *Am J Physiol Cell Physiol* 2002;282:C227-41.
29. Hamilton KL, Staib JL, Phillips T, Hess A, Lennon SL, Powers SK. Exercise antioxidants, and HSP72: protection against myocardial ischemia/reperfusion. *Free Radic Biol Med* 2003;34:800-9.
30. Wickens AP. Ageing and the free radical theory. *Respir Physiol* 2001;128:379-91.
31. Cai L. Suppression of nitrate damage by metallothionein in diabetic heart contributes to the prevention of cardiomyopathy. *Free Radic Biol Med* 2006;41:851-61.
32. Siems W, Capuzzo E, Lucano A, Salerno C, Crifò C. High sensitivity of plasma membrane ion transport ATPases from human neutrophils towards 4-hydroxyl-2,3-trans-nonanal. *Life Sci* 2003;73:2583-90.
33. Kang SM, Lim S, Song H, Chang W, Lee S, Bae SM, et al. Allopurinol modulates reactive oxygen species generation and Ca<sup>2+</sup> overload in ischemia/reperfused heart and hypoxia-reoxygenated cardiomyocytes. *Eur J Pharmacol* 2006;535:212-9.
34. Crompton M. The role of Ca<sup>2+</sup> in the function and dysfunction of the heart mitochondria. En: Lange GA, editor. *Calcium and the heart*. 1990. p. 167-98.
35. Brookes PS, Levenon AL, Shiva S, Sarti P, Darley-Usmar VM. Mitochondria: regulators of signal transduction by reactive oxygen and nitrogen species. *Free Radic Biol Med* 2002;33:755-64.
36. Brookes PS, Salinas EP, Darley-Usmar K, Eiserich JP, Freeman BA, Darley-Usmar VM, et al. Concentration-dependent effects of nitric oxide on mitochondrial permeability transition and cytochrome c release. *J Biol Chem* 2000;275:20474-79.
37. Bell RM, Yellon DM. The contribution of endothelial nitric oxide synthase to early preconditioning threshold. An investigation in eNOS knockout mice. *Cardiovasc Res* 2001;52:274-80.
38. Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003;140-41:113-24.
39. Lebuffe G, Schumacker PT, Shao ZH, Anderson T, Iwase H, Vander Hoek TL. ROS and NO trigger early preconditioning: relationship to

- mitochondrial K<sup>+</sup> ATP channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;284:H299-308.
40. Ing DJ, Zang J, Dzau VJ, Webster KA, Bishopric NH. Modulation of cytokine-induced cardiac myocyte apoptosis by nitric oxide, Bak and Bcl-x. *Circ Res* 1999;84:21-33.
41. Andréka P, Tran T, Webster KA, Bishopric NH. Nitric oxide and promotion of cardiac myocyte apoptosis. *Mol Cell Biochem* 2004; 263:35-53.
42. Jones SP, Bolli R. The ubiquitous role of nitric oxide in cardioprotection. *J Mol Cell Cardiol* 2006;40:16-23.
43. Oldenburg O, Quim Q, Krieg T, Yang XM, Philipp S, Critz SD, et al. Bradykinin induces mitochondrial ROS generation via NO, cGMP, PKG and mito K<sup>+</sup> ATP channel opening and leads to cardioprotection. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;286:H468-76.
44. Rakhit RD, Mojat MH, Marber MS, Duchon MR. Mitochondria as targets for nitric oxide-induced protection during stimulated ischemia and reoxygenation in isolated neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 2001;103:2617-23.
45. Wang YG, Kudo M, Xu MF, Ayub A, Asharf M. Mitochondrial K(ATP) channel as an end effector of cardioprotection during late preconditioning: triggering role of nitric oxide. *J Mol Cell Cardiol* 2001;33:2037-46.
46. Qin Q, Yang XM, Cui L, Critz SD, Cohen MV, Browner NC, et al. Exogenous NO triggers preconditioning via cGMP and mito KATP-dependent mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004;287:H712-8.
47. Wang GW, Liem DA, Vondriská TM, Honda HM, Korge P, Pantaleon DM, et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction via modulation of mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005;288:H1290-5.
48. Beckman KB, Ames BN. The free radical theory of ageing matures. *Physiol Rev* 1998;78:547-81.
49. Meany DL, Poe BG, Navratil M, Moraes CT, Arriaga EA. Superoxide released into mitochondria matrix. *Free Radic Biol Med* 2006;41:950-9.
50. Muller FL, Liu Y, Van Remmen H. Complex III releases superoxide to both sides of the inner mitochondria membrane. *J Biol Chem* 2004;279:49064-73.
51. Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD. Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 2002;21:1616-27.
52. Diwan A, Tran T, Misra A, Mann DL. Inflammatory mediators and the failing heart: a translational approach. *Curr Mol Med* 2003; 3:161-82.
53. Wollert KC, Drexler H. Regulation of cardiac remodeling by nitric oxide: focus on cardiac myocytes hypertrophy and apoptosis. *Heart Fail Rev* 2002;7:317-25.
54. Beckman JS, Koppenol WH. Nitric oxide, superoxide and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 1996;271: C1424-37.
55. Rubbo H, O'Donnell V. Nitric oxide, peroxynitrite, and lipoxygenase in atherogenesis: mechanistic insights. *Toxicology* 2005; 208:305-17.
56. Szabó G, Bährle S. Role of nitrosative stress and poly(ADP-ribose)polymerase activation in myocardial reperfusion injury. *Curr Vasc Pharmacol* 2005;3:215-20.
57. Ischiropoulos H. Biological selectivity and functional aspects of protein tyrosine nitration. *Biochem Biophys Res Commun* 2003; 305:776-83.
58. Denicola A, Radi R. Peroxynitrite and drug-dependent toxicity. *Toxicology* 2005;208:273-88.
59. Virág L, Szabó E, Gergely P, Szabó C. Peroxynitrite-induced cytotoxicity: mechanism and opportunities for intervention. *Toxicol Lett* 2003;140-141:113-24.
60. Szabó C. Poly(ADP-ribose)polymerase activation by nitrogen species—Relevance for the pathogenesis of inflammation. *Nitric Oxide* 2006;14:169-79.
61. Pacher P, Schulz R, Liaudet L, Szabó C. Nitrosative stress and pharmacological modulation of heart failure. *Trends Pharmacol Sci* 2005;26:302-10.
62. Teng RJ, Ye YZ, Parks DA, Beckman JS. Urate produced during hypoxia protects heart proteins from peroxynitrite-mediated protein nitration. *Free Radic Biol Med* 2002;33:1243-9.
63. Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2003;138:532-43.
64. Pieper GM, Nilakantan V, Chen M, Zhou J, Khanna AK, Henderson Jr JD, et al. Protective mechanisms of a metalloporphyrinic peroxynitrite decomposition catalyst, WW85, in rat cardiac transplants. *J Pharmacol Exp Ther* 2005;314:53-60.
65. Lokuta AJ, Maertz NA, Meethal SV, Potter KT, Kamp TJ, Valdinia HH, et al. Increased nitration of sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase in human heart failure. *Circulation* 2005;111:988-95.
66. Wang W, Sawicki G, Schulz R. Peroxynitrite-induced myocardial injury is modulated through matrix-metalloproteinase 2. *Cardiovasc Res* 2002;53:165-74.
67. Pesse B, Levrant S, Feihl F, Waeber B, Gavillet B, Pacher P, et al. Peroxynitrite activates ERK via Raf-1 and MEK, independently from EGF receptor and p21 (Ras) in H9C2 cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol* 2005;38:765-75.
68. Levrant S, Pesse B, Feihl F, Waeber B, Pacher P, Rolli J, et al. Peroxynitrite is a potent inhibitor of NF-(kappa)B activation triggered by inflammatory stimuli in cardiac and endothelial cell lines. *J Biol Chem* 2005;280:34878-87.
69. Liaudet L, Szabó E, Timashpolsky L, Virág L, Cziráki A, Szabó C. Suppression of Poly(ADP-ribose)polymerase activation by 3-aminobenzamide in a rat model of myocardium infarction: long-term morphological and functional consequences. *Br J Pharmacol* 2001; 133:1424-30.
70. Levrant S, Vannay-Bouchiche, Pesse B, Pacher P, Feihl F, Waeber B, et al. Peroxynitrite is a major trigger of cardiomyocyte apoptosis in vitro and in vivo. *Free Radic Biol Med* 2006;41:886-95.