

ARTÍCULO ORIGINAL

Cardioprotección ejercida por rosuvastatina en corazones de rata sometidos a isquemia - reperfusión

Vélez, Débora Elisabet^{1*}; Mestre Cordero, Victoria¹; Hermann, Romina¹; Perego, Juliana¹; Penida, Marianela¹; Marina Prendes, María Gabriela¹.

¹Laboratorio de Metabolismo y Fisiopatología Cardíaca, Cátedra de Fisiología, Departamento de Ciencias Biológicas. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. IQUIMEFA CONICET.

Contacto: Débora Elisabet Vélez; velez.debora@hotmail.com, dvelez@ffyb.uba.ar

Resumen Introducción: El uso profiláctico de las estatinas en pacientes con riesgo cardiovascular se ha incrementado últimamente, debido a su asociación con una menor mortalidad y morbilidad, relacionada con cardiopatías isquémicas. La presente investigación tiende a esclarecer si el tratamiento con estatinas induce cambios beneficiosos para aumentar la resistencia a los daños ocasionados por la isquemia reperfusión. Objetivos: Investigar la protección ejercida por la rosuvastatina (R) en un modelo de corazón perfundido Langendorff y su relación con la regulación de la apertura del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (PTPM). Materiales y métodos: Se utilizaron corazones de ratas Wistar hembras perfundidos retrógradamente. Se sometieron a 25 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión (RP). Se administró R 10 minutos antes de la isquemia (R1) y durante toda la reperfusión (R2). Se determinó la respuesta funcional, la liberación de creatina kinasa, el tamaño del infarto, la capacidad de síntesis de ATP y la sensibilidad a la apertura del PTPM. Resultados: Los corazones tratados con R tuvieron una recuperación postisquémica mayor respecto del grupo C (PxF (%) a los 5 min de RP: C 6,8 ± 2,0*; R1 24,3 ± 6,0; R2 19,0 ± 6,0; PDF (%) a los 5 min de RP: C 20,0 ± 3,0**; R1 6,0 ± 1,0; R2 3,8 ± 1,5) no habiéndose encontrado diferencias entre los tratamientos previos y posteriores a la isquemia. Así mismo, en estos corazones se observó un menor daño tisular (CK [U/g.h] durante los primeros 10 min de RP: C 60 ± 5; R1 32 ± 3; R2 28 ± 6; tamaño del infarto (%AR) C 62,0 ± 1,5; R1 41,6 ± 3,5*; R2 36,3 ± 3,2), mayor capacidad de síntesis de ATP (pmoles/μg de proteínas.min: C 1.82 ± 0,12**; R1, 8.89 ± 0,22; R2 9.30 ± 0,31) y una menor sensibilidad a la apertura del PTPM. Conclusiones: La R mejora la respuesta funcional cardíaca, asociada a una mayor preservación mitocondrial.

Palabras clave: Cardioprotección, isquemia, intervención percutánea coronaria, rosuvastatina, poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

Abstract

Introduction: The prophylactic use of statins in patients with cardiovascular risk has recently increased, due to its association with lower mortality and morbidity related to ischemic heart disease. The present investigation tends to clarify if the treatment with statins induces beneficial changes to increase the resistance to the damages caused by the ischemia reperfusion. Objectives: To investigate the possible protection exerted by rosuvastatin (R) in a Langendorff perfused heart model and its relation with the regulation of the opening of the Mitochondrial Permeability Transition Pore (MPTP). Materials and methods: Hearts from female Wistar rats were used, retrograde perfused, and subjected to 25 minutes of ischemia and 60 minutes of reperfusion (RP). R was given 10 minutes prior to ischemia (R1) or throughout reperfusion (R2). Functional response, creatine kinase (CK) release, infarct size, ATP synthesis capacity and sensitivity to MPTP opening were determined. Results: R-treated hearts had a greater postischemic recovery than the control group [(contractility (%) at 5 min of RP: control 6.8 ± 2*; R1 24.3 ± 6; R2 19 ± 6; left ventricle end diastolic pressure (%) at 5 min of RP: control 20 ± 3**; R1 6 ± 1; R2 3.8 ± 1.5), with no differences between pre-and post-ischemia treatments. Likewise, in these hearts, we observed: lower tissue damage [CK (U/g.w) during the first 10 minutes of RP: control 60 ± 5; R1 32 ± 3; R2 28 ± 6; infarct size (%AR) control 62.0 ± 1.5; R1 41.6 ± 3.5*; R2 36.3 ± 3.2], greater ability of ATP synthesis (pmoles/μg of proteins.min: control 1.82 ± 0.12**; R1, 8.89 ± 0,22; R2 9.3 ± 0,31) and lower sensitivity to the opening of the MPTP. Conclusions: R improves the cardiac functional response, associated with greater mitochondrial preservation.

Key words: Cardioprotection, ischemia, percutaneous coronary intervention, rosuvastatin, mitochondrial permeability transition pore.

Introducción

La cardiopatía isquémica representa la principal causa de muerte en el mundo entre las enfermedades cardiovasculares (ECV)¹. Las presentaciones clínicas de esta enfermedad, incluyen la isquemia asintomática, la angina de pecho estable, la angina inestable, el infarto de miocardio (IM), la insuficiencia cardíaca y la muerte súbita. Entre ellas, la enfermedad arterial coronaria es la manifestación que tiene mayor prevalencia.

Actualmente, las Guías de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología^{2,3} apuntan al uso de fármacos que disminuyan el riesgo trombótico en estos pacientes, como así también el consumo de oxígeno por parte del miocardio y al uso de estatinas, en conjunto con las estrategias de revascularización miocárdica, para restablecer el flujo coronario.

Debido a las complicaciones asociadas al indispensable restablecimiento del flujo coronario, relacionadas a la "injuria por isquemia-reperusión", los pacientes que padecen cardiopatías isquémicas presentan un riesgo de re hospitalización temprana, con aparición de síntomas o recurrencia de las complicaciones. En este aspecto, se sabe con un nivel de evidencia alto, que el uso de estatinas está asociado a una reducción de la mortalidad, morbilidad y reincidencia de estos eventos, aunque se desconoce ciertamente de qué manera modula estos efectos beneficiosos⁴⁻⁶. Su uso no sólo es recomendado al ingreso de los pacientes con síndrome coronario agudo (SCA), sino también a largo plazo, debido a los efectos beneficiosos independientes de la disminución de colesterol que estas poseen.

En un primer momento, las estatinas fueron utilizadas exclusivamente para combatir las dislipemias^{7,8}, sin embargo, en la última década se ha incrementado su uso en pacientes con riesgo cardiovascular o durante intervenciones percutáneas coronarias, debido a las acciones pleiotrópicas de las mismas, independientes de la disminución de colesterol^{4-6,11-15}.

Durante la isquemia, ocurren cambios bioquímicos en el miocito relacionados con la interrupción del riego sanguíneo, el cual obliga al miocardio a consumir únicamente glucosa mediante la glucólisis anaeróbica. Por lo tanto, la producción de ATP es insuficiente, y rápidamente se ve afectada la contractilidad cardíaca. En conjunto, comienzan a acumularse metabolitos tóxicos para la célula cardíaca, que pueden conducir a daños permanentes si la isquemia sostenida perdura 20-40 minutos o más¹⁶. Si bien el restablecimiento del flujo es imprescindible para salvar al tejido miocárdico, puede surgir una nueva lesión celular que anula el efecto beneficioso de la propia reperusión, conocida como *injuria por isquemia-reperusión*. La pérdida de la homeostasis del calcio es la principal causa del daño celular junto a la apertura del Poro de Transición de la Permeabilidad Mitocondrial (PTPM), una estructura multiproteica que en su forma abierta, permite una comunicación entre el citosol y la matriz mitocondrial. A lo largo de los años se han aislados numerosas proteínas que se cree forman parte de este complejo¹⁷⁻¹⁹, el cual se forma entre las membranas mitocondriales interna y externa.

La acumulación de especies reactivas de oxígeno y de protones en los primeros minutos de la reperusión serían clave para estabilizar la forma abierta del poro, provocando un desequilibrio osmótico debido al escape de moléculas de hasta 2000 Da a través del PTPM, lo que provoca entre otros eventos, la pérdida de la selectividad mitocondrial, pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cese de la fosforilación oxidativa por la interrupción del gradiente electroquímico en el espacio inter-membrana, y posterior hidrólisis de ATP como consecuencia de la reversión de la bomba F_1F_0 ATPasa. Si la apertura no cesa, el único destino posible del miocito es la muerte celular por necrosis²⁰⁻²⁵.

Estos antecedentes señalan la importancia de profundizar la investigación tendiente a dilucidar si el tratamiento con estatinas induce a cambios beneficiosos que realcen los mecanismos endógenos, con los que cuenta el miocardio para aumentar la resistencia a los daños ocasionados por la isquemia reperusión.

De lo expuesto y debido al extendido empleo de la rosuvastatina en la clínica médica y a las escasas publicaciones existentes sobre las acciones cardioprotectoras directas de las mismas, se decidió investigar si es posible la protección ejercida por la rosuvastatina en nuestro modelo y su relación con la regulación de la apertura del PTPM.

Materiales y Métodos

Protocolo experimental

El presente estudio fue realizado conforme a la Guía de Protección y uso de Animales de Laboratorio (1996, National Academy Press, 2101 Constitution Ave. NW, Washington, DC20055, USA), y a la ley Argentina N° 14346 relacionada con la protección animal y al Comité de Ética de la Facultad de Farmacia y Bioquímica (CICUAL, Expediente 31654-2014, ratificado en junio del 2015).

Para este trabajo se utilizaron ratas Wistar hembras de 250 - 300gr sometidas a ciclos de 12 horas de luz-oscuridad, alimentadas *ad libitum*. Los corazones fueron removidos rápidamente y se colocaron en buffer salino para luego ser montados en un aparato de perfusión retrógrada tipo Langendorff (Hugo Sachs Electronic, March-Hugstetten, Germany). Dichos corazones se perfundieron isovolumétricamente a una presión constante de 70 mmHg con un solución Krebs-Bicarbonato, compuesta por (en mmol/L: NaCl 120; NaHCO₃ 25; KCl 4,8; MgSO₄ 1,33; K H₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,6; Na₂EDTA 0,02; glucosa 10), gaseado con gas compuesto por 95 % O₂ Y 5 % CO₂ (pH 7,4) y mantenido a 37°C. Además, estos fueron asignados en random a cada uno de los grupos que se describen a continuación:

*Control (C): sometidos a 25 minutos de estabilización, 25 minutos de isquemia global total (IS) y 60 minutos de reperusión (RP);

*Rosuvastatina en estabilización (R1): 3 µM (Laboratorios Roemmers) fueron agregados al medio de perfusión 10 minutos antes de la isquemia, seguidos de 25 minutos de IS y 60 minutos de RP;

*Rosuvastatina en perfusión (R2): luego de la estabilización y de la IS, se perfundió el corazón durante 60 minutos con R 3 μ M hasta el final de la RP (Esquema 1).

Medición de la funcionalidad cardíaca

La aurícula izquierda fue removida con el fin de colocar en el ventrículo izquierdo un balón conectado a un transductor para obtener el valor de la presión desarrollada por el ventrículo izquierdo (PDVI). Con el uso de transductores y el empleo de un programa informático de adquisición de datos, desarrollado en el laboratorio. También se obtuvieron las velocidades de contracción y relajación (+dP/dT y -dP/dT), y la presión de fin de diástole ventricular izquierda (PDF) con el fin de medir la actividad contráctil y el desarrollo de contractura respectivamente. Se calculó el producto de la PDVI y la frecuencia. Para este trabajo, solo se tuvieron en cuenta corazones con PDVI mayor a 60mmHg y una frecuencia por arriba de 200 lpm al final del período de estabilización (n = 6 / grupo).

Liberación de creatina kinasa.

Para estimar la extensión de la necrosis, se midió el flujo coronario con el fin de medir la actividad de la creatina kinasa (CK) liberada al medio durante los primeros 10 minutos de la perfusión (UI/gh). La actividad de la enzima se midió espectrofotométricamente a 30°C (n = 6 por grupo).

Evaluación del tamaño del infarto.

Al finalizar el experimento, los corazones fueron removidos, congelados y cortados en rebanadas de 0,8 a 1 mm de espesor. Luego de ser descongelados, los cortes fueron incubados a temperatura ambiente con cloruro de trifeníltetrazolium al 1 % en buffer fosfato (100 mM, pH 7,4) durante 20 minutos, y fijados en formaldehído al 10 %. Se cuantificó el área de tejido no viable por medio del análisis fotográfico, utilizando el programa Image J. Debido a que los corazones fueron sometidos a isquemia global, el área de riesgo está representada por la totalidad del tejido ventricular. (n = 6 / grupo).

Medición de la capacidad de síntesis de ATP.

Las mitocondrias de los corazones se aislaron por centrifugación diferencial luego de homogeneizar el tejido en buffer conteniendo sacarosa (300 mM sacarosa, 10 mM Tris-Cl, 2 mM EGTA, 5 mg/ml BSA, pH 7,4). Se lavó el pellet mitocondrial en el buffer de aislamiento carente de BSA. Las mitocondrias aisladas con este procedimiento han demostrado ser metabólicamente activas con un índice respiratorio de 3,5 - 5,0 con succinato y 8,0 - 10,0 con glutamato/malato y razones ADP/O correspondientes de 1,5 - 1,7 y 2,5 - 2,7.

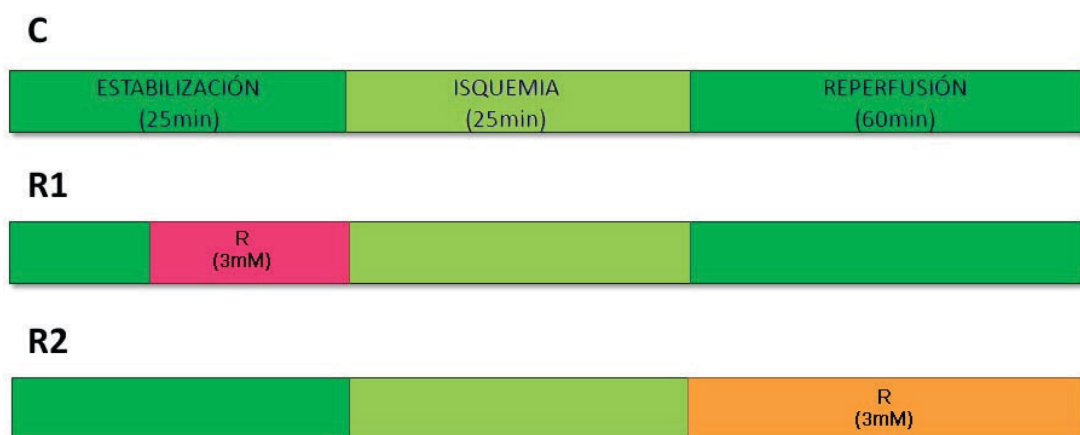
Debido a que está bien documentado en la literatura que el complejo I de la cadena respiratoria es el que presenta mayor sensibilidad a la injuria por isquemia-reperfusión, la síntesis mitocondrial de ATP se realizó en presencia de los sustratos piruvato y malato. Las mitocondrias (1 mg proteína / ml) son incubadas en medio conteniendo (mM): KCl 125, MOPS 20, Tris 10, EGTA 0,5, KH_2PO_4 2,5, Cl_2Mg 2,5, malato 2,5, piruvato 2,5, pH 7,4 a 30° C en un agitador metabólico durante 5 min. Luego se agregó 2,5 mM ADP (la concentración a emplear de ADP es la que corresponde a la concentración fisiológica medida en los miocitos). Se extrajeron alícuotas en intervalos de 30 seg durante 8 min deteniendo la reacción mediante el agregado de ácido perclórico. El sobrenadante neutralizado se empleó para medir ATP por bioluminiscencia mediante la reacción ATP dependiente luciferasa / luciferina (FFLA-SIGMA). La medición de proteínas se realizó por el método de Lowry empleando BSA como testigo. La velocidad de síntesis de ATP fue expresada como pmoles de ATP / min.ug de proteína mitocondrial (n = 6 / grupo).

Medida de la apertura del PTPM

Inmediatamente antes de la IS sostenida y al finalizar los 60 minutos de RP, se aislaron mitocondrias siguiendo el mismo método que para el análisis de la síntesis de ATP mitocondrial.

Se midió la caída de la absorbancia a 540 nm de una suspensión de mitocondrias durante 8 minutos a 25°C, sometidas a diferentes concentraciones de CaCl_2 , utilizando ciclosporina A

Esquema 1: protocolos de trabajo. Administración de rosuvastatina (R) 3 μ M 10 minutos previos a la isquemia (R1) y posterior a esta, hasta el final de la perfusión (R2).



como inhibidor de la apertura del PTPM.

Análisis estadístico

Los resultados fueron expresados como la media \pm error estándar de la media (ESM). Los cambios en la función contráctil ventricular se compararon estadísticamente usando un ANOVA de tres factores para medidas repetidas en un factor seguido por el test de Tukey. Todos los demás datos experimentales se evaluaron estadísticamente utilizando ANOVA bidireccional seguido por el test de Tukey. El nivel de probabilidad menor a 0,05 fue utilizada como criterio de significancia biológica.

Resultados

Se pudo demostrar que la R suministrada en el medio de perfusión 10 minutos antes de la IS y durante la RP mejoró la recuperación postisquémica de los corazones, en comparación con los corazones control. El grupo R1 mejoró la recuperación postisquémica de la contractilidad, respecto del grupo C, sin hallarse diferencias significativas con el tratamiento R2. De la misma manera, la PDF fue menor para ambos tratamientos, mientras que la velocidad de contracción (+dP/dT) y de relajación (-dP/dT) [%] de ambos tratamientos, demostraron ser significativamente mayores respecto del grupo control a los 5 minutos de la

RP, a pesar de que desde el minuto 20 hasta el minuto 30 de la RP, la velocidad de relajación del grupo R1 fue significativamente mayor al del R2 (Figura 1).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos respecto del tamaño del infarto y la liberación de creatina kinasa (CK), la R demostró atenuar significativamente el daño al tejido, no solo a través de una menor liberación de CK [(U/g.h) durante los primeros 10 min de RP (Figura 2), sino también a través de la estimación del tamaño del infarto [% AR], no habiendo diferencias entre los distintos tratamientos, previos y posteriores a la IS (Figura 3).

Con el fin de establecer una asociación entre la mejor respuesta postisquémica observada en los corazones tratados con R y la preservación de las mitocondrias del tejido cardíaco o a un menor número de mitocondrias dañadas, se evaluó la capacidad de síntesis de ATP. De esta manera se corroboró una mayor síntesis de ATP en los corazones tratados con R respecto del control, nuevamente, sin encontrarse diferencias entre ambos tratamientos (Figura 4).

Teniendo en cuenta que el tratamiento de R preisquémico y postisquémico no refiere diferencias en cuanto a la recuperación posterior a la IS y que el daño tisular que se produce para ambos tratamientos es similar y significativamente menor respecto de los corazones C, se decidió evaluar la sensibilidad a la

Figura 1: medición de la funcionalidad cardíaca. Medición de la presión sistólica x frecuencia (Px F), la presión diastólica final (PDF) y las velocidades de relajación y contracción, respectivamente [-dP/dT] [+dP/dT] para todos los grupos, aquellos tratados con R previos a la isquemia [R1] o durante la reperfusión [RP] [R2]. Los resultados se expresan como % relativo de recuperación. [*p<0,05 vs R1 y R2; **p<0,01 vs R1 y R2; #p<0,01 vs C y R1n = 6 / grupo].

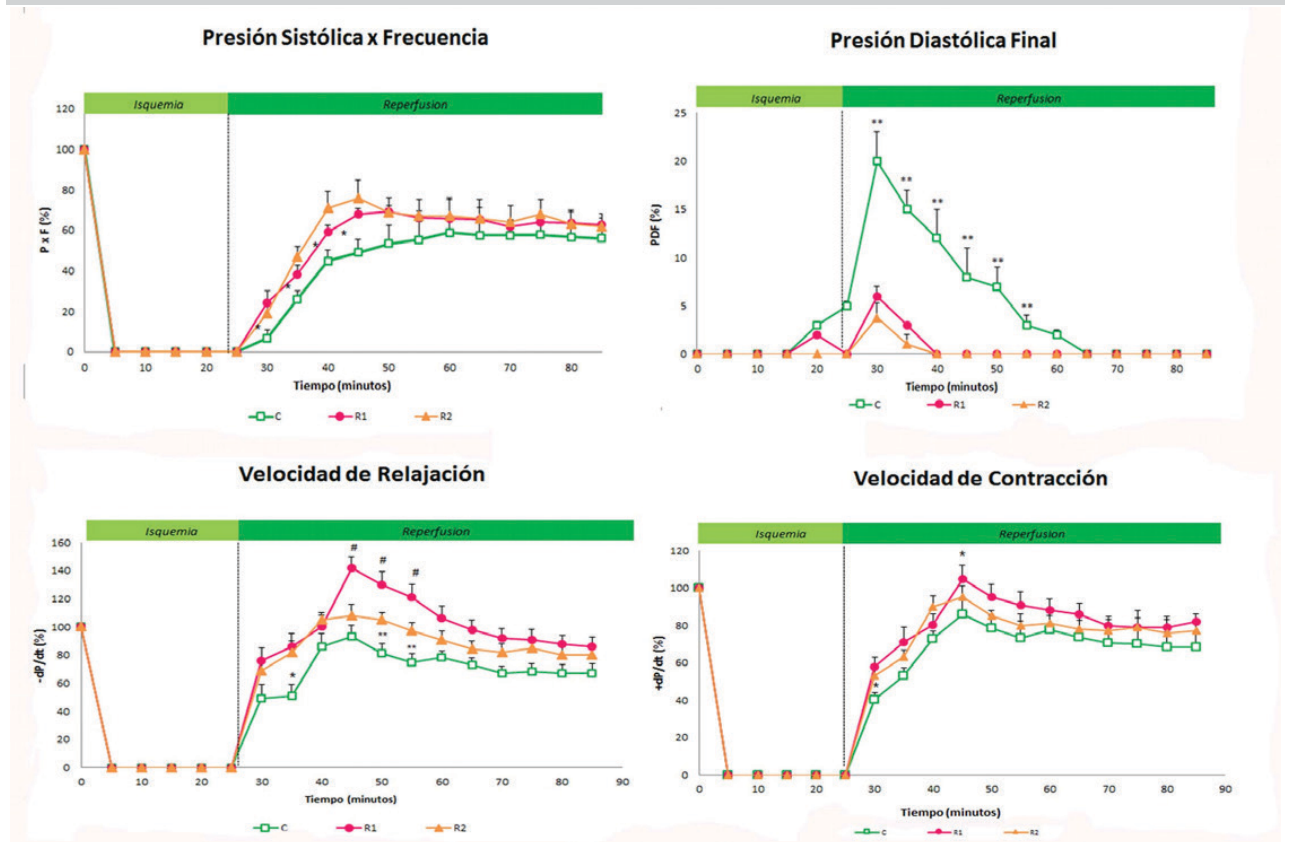


Tabla I. Sensibilidad a la apertura del poro de transición de la permeabilidad mitocondrial.

Grupos	Concentraciones crecientes de CaCl ₂				
	100 mM Ca ²⁺	200 mM Ca ²⁺	300 mM Ca ²⁺	400 mM Ca ²⁺	500 mM Ca ²⁺
C	1,56 ± 0,31	2,50 ± 0,34*	2,25 ± 0,30	2,40 ± 0,27	2,36 ± 0,21
R	0,48 ± 0,18	0,75 ± 0,15	1,24 ± 0,20*	1,34 ± 0,22	1,35 ± 0,12

► Los resultados se expresaron como % de caída de la absorbancia a 540nm. * p<0,05 vs % de caída de Abs en respuesta a todas las concentraciones menores de Ca²⁺ en el mismo grupo (n=6 por grupo).

apertura del PTPM en aquellos corazones tratados con R previos a la IS, de manera tal de reproducir con este modelo la situación más cercana con la que actualmente se asocia el uso de la R, en pacientes que de manera aguda deben enfrentarse a una situación que restablezca el flujo coronario posteriormente al SCA que padecen.

En tal sentido, se pudo comprobar que la R disminuyó la sensibilidad de las mitocondrias a la apertura del PTPM respecto de los grupos control (% caída de la absorbancia a 540nm, 200µM y 300µM de CaCl₂, respectivamente) C: 2,50 ± 0,34; R: 0,75 ± 0,15*/ C: 2,25 ± 0,30; R: 1,24 ± 0,20*; [*p<0.05 vs % caída de la absorbancia en respuesta a todas las concentraciones menores de CaCl₂ en el mismo grupo] (Tabla I).

Discusión

La recuperación funcional postisquémica es equivalente en todos los corazones tratados con R, tanto previo a la IS como durante la RP. La administración de R mejoró la recuperación posisquémica de la contractilidad y atenuó el desarrollo de la PDF, consistentemente con los trabajos de otros autores^{26,27}; aunque en este caso, no se observaron diferencias significativas entre R1 y R2, con excepción de la velocidad máxima de relajación donde R2 presentó una mayor recuperación que R1.

Trabajos previos han determinado que el tratamiento con es-

tatinas durante la perfusión produce una reducción del tamaño de infarto de los corazones sometidos a IS - RP²⁸. No obstante, en este modelo, los corazones tratados con R durante la RP no demostraron diferencias significativas respecto de aquellos tratados con R 10 minutos antes de la IS. La mejor funcionalidad postisquémica de los corazones tratados con R se correlaciona con la disminución del daño tisular y la menor liberación de CK respecto del grupo C.

Así mismo, las mitocondrias provenientes de corazones tratados con R presentaron una mayor capacidad de síntesis de ATP. Nuevamente, la cantidad de ATP sintetizada por las mitocondrias provenientes de los corazones sometidos a R antes y después de la IS no tuvieron diferencias entre sí, aunque fueron significativamente mayores al grupo C, sugiriendo que la recuperación de estos corazones podría estar relacionada a una mayor preservación de las mitocondrias del miocito.

Considerando los resultados, se direccionó la investigación hacia el tratamiento que tiene mayor similitud con aquel que actualmente se utiliza en la clínica médica, teniendo en cuenta que R es utilizada no sólo en pacientes dislipémicos, con mayor riesgo de sufrir una cardiopatía isquémica, sino también en aquellos que de manera aguda deben enfrentarse a un procedimiento que reestablezca el flujo coronario como consecuencia de un SCA. Se decidió, entonces, estudiar la sensibilidad a la

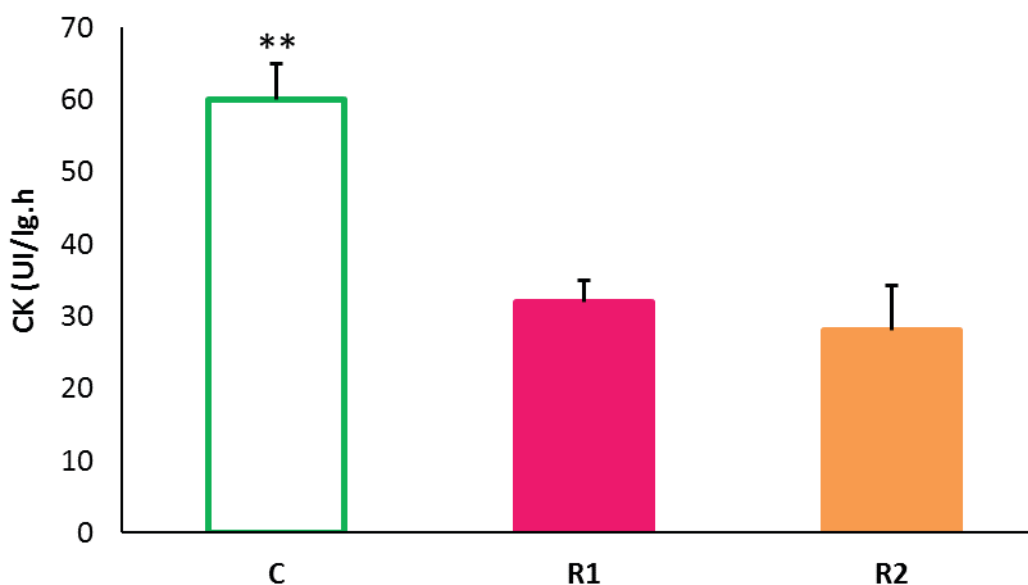
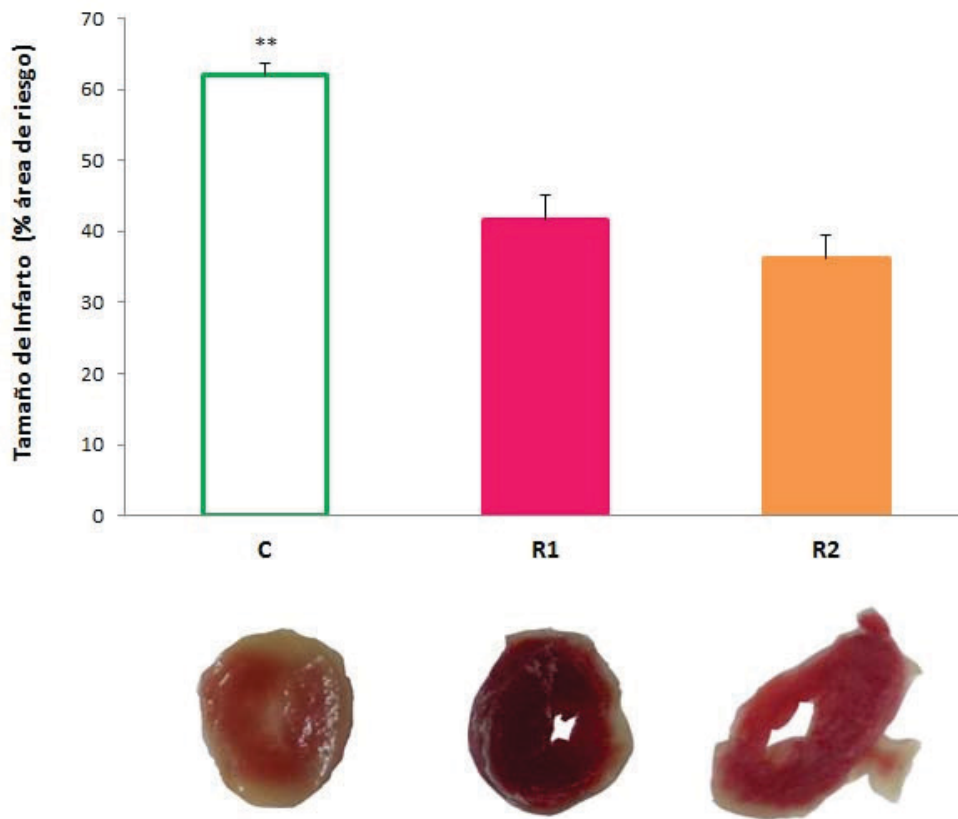
Figura 2. Liberación de la creatina kinasa [CK] durante los primeros 10 minutos de la perfusión. Los resultados se expresan como UI/g.h [**p<0,01 vs R1 y R2; n = 6 / grupo].

Figura 3. Estimación del tamaño del infarto, expresado como % de área de riesgo [AR] (** $p < 0,01$ vs R1 y R2; $n = 6$ / grupo).

apertura del PTPM en aquellas mitocondrias provenientes de corazones que fueron tratados con R previos a la IS. Al respecto, se han encontrado estudios previos en pacientes con SCA sometidos a PCI tratados con R⁶.

En efecto, los corazones pertenecientes al grupo R1 demostraron tener una menor sensibilidad a la apertura del PTPM, demorando todos aquellos mecanismos que llevan al miocito a muerte celular. En este aspecto, los resultados obtenidos se correlacionan con la mayor capacidad de síntesis de ATP de sus mitocondrias.

Observando los resultados obtenidos, es posible pensar en un mediador que promueva un retardo en la apertura del poro, que como consecuencia aumente el pool de ATP del miocito de manera que éste pueda recuperarse más rápidamente del entorno nocivo que representan los primeros minutos de la RP.

Por otra parte, recientemente Henning y col.²⁹ han podido demostrar que la Protein Kinasa B o Akt se encuentra implicada en la limitación de la apoptosis y de la necrosis en cultivos de miocitos sujetos a hipoxia. Al respecto, la enzima Akt tiene una reconocida capacidad para proteger al corazón de la injuria por isquemia-reperusión³⁰, aunque todavía se desconoce el mecanismo exacto por el cual esta proteína promueve la cardioprotección. Algunos autores postularon que la Akt podría intervenir en la recuperación posisquémica de estos corazones a nivel mitocondrial, modulando la sensibilidad a la apertura del PTPM³¹ de manera indirecta, a través de una proteína intermediaria³²⁻³⁵.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, esta investigación sugiere que los efectos cardioprotectores de R podrían estar relacionados con una preservación de la estructura y de la actividad mitocondrial, lo que se acompaña con una mayor capacidad de síntesis de ATP de las mismas, lo que podría beneficiar al miocito frente a la situación de injuria por IS - RP en la cual la célula está metabólicamente exigida.

Por lo expuesto, el objetivo de este trabajo es, que en un futuro, se pueda dilucidar si la Akt podría participar de la modulación de la apertura del PTPM, utilizando un inhibidor de la vía que promueva la activación de la Akt, como wortmanina.

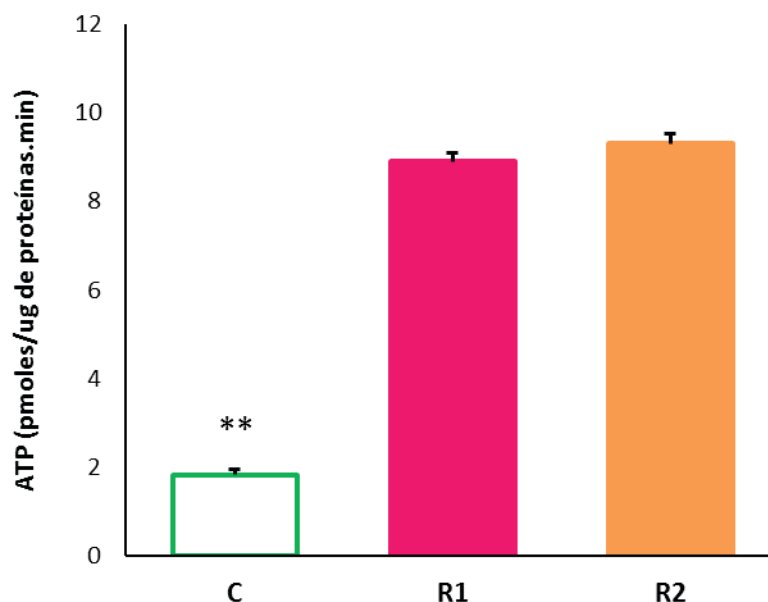
Agradecimientos

Los autores agradecemos a María de las Mercedes Fernández Pazos y Federico Reznik por su enorme colaboración técnica en este trabajo. Esta investigación fue posible gracias al apoyo de la Universidad de Buenos Aires y al Instituto de Química y Metabolismo del Fármaco- CONICET. También agradecemos a los Laboratorios Roemmers por la gentileza de habernos donado la rosuvastatina que utilizamos en esta investigación.

Fuente de financiamiento: Código de Proyecto y Título: UBACYT 20020130100267BA "Participación de la autofagia y de la proteína kinasa B (Akt) en la cardioprotección ejercida por la administración aguda de estatinas en corazones sometidos a isquemia - reperusión". 2014-2017

Director: María Gabriela Marina Prendes

Figura 4: capacidad de síntesis de ATP en los corazones expresados como pmoles/ μ g de proteínas.min. [$*p < 0,05$ vs R1 y R2; n=6/grupo]



Referencias bibliográficas

- Global Atlas on cardiovascular disease prevention and control, WHO library Cataloguing-in-Publication Data Global atlas on cardiovascular disease prevention and control 2015. Edited by Shanthi Mendiset al. ISBN 978 92 4 156437 3, 2015.
- Guía de Práctica Clínica de la Sociedad Europea de Cardiología para el manejo del síndrome coronario agudo en pacientes sin elevación persistente del segmento ST. Rev Esp Cardiol.65 (2):173.e1-e55, 2012.
- Guía ESC 2015 sobre el tratamiento de los síndromes coronarios agudos en pacientes sin elevación persistente del segmento ST. RevEspCardiol.68(12): 1125.e1-e64, 2015
- Carlo Briguori et al. Rosuvastatin for Reduction of Myocardial Damage during Coronary Angioplasty - The Remedy Trial. Cardiovasc Drugs Ther, doi10.1007/s10557-016-6672-3. 2016
- Mario Leoncini, MD, et al. Early high-dose rosuvastatin and cardioprotection in the Protective effect of Rosuvastatin and Antiplatelet Therapy On contrast-induced acute kidney injury and myocardial damage in patients with Acute Coronary Syndrome (PRATO-ACS) study, Am Heart J168:792-7, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ahj.2014.08.005>, 2014
- Jiang F, et al. Rosuvastatin Reduces Ischemia-Reperfusion Injury in Patients With Acute Coronary Syndrome Treated With Percutaneous Coronary Intervention. Clin. Cardiol. (9):530-5. DOI:10.1002/clc.2229, 2014.
- Endo A. The discovery and development of HMG-CoA reductase inhibitors. J Lipid Res. 33:[11]:1569-1582, 1992.
- Istvan E, Deisenhofer J. Structural Mechanism for Statin Inhibition of HMG-CoA Reductase. Science 292(5519):1160-1164, 2001.
- The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischaemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with pravastatin in patients with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. N Engl J Med 339: 1349-1357, 1998.
- Sacks FM, Pfeffer MA, Moye LA, Rouleau JL, Rutherford JD, Cole TG, Brown L, Warnica JW, Arnold JM, Wun CC, Davis BR, Braunwald E. The effect of pravastatin on coronary events after myocardial infarction in patients with average cholesterol levels. Cholesterol and Recurrent Events Trial investigators. N Engl J Med 335: 1001-1009, 1996.
- Pan Y, Tan Y, Li B, Li X. Efficacy of high-dose rosuvastatin preloading in patients undergoing percutaneous coronary intervention: a meta-analysis of fourteen randomized controlled trials. Lipids Health Dis,14:97. DOI 10.1186/s12944-015-0095-1, 2015.
- Jiao Y,Hu F, Zhang Z, Gong K, Sun X, Li A, Liu N. Efficacy and Safety of Loading-Dose Rosuvastatin Therapy in Elderly Patients with Acute Coronary Syndromes Undergoing Elective Percutaneous Coronary Intervention. Clin Drug Investig,35(12):777-784. DOI 10.1007/s40261-015-0335-1, 2015.
- Zhou Q, Liao JK. Statins and Cardiovascular Diseases: From Cholesterol Lowering to Pleiotropy. Curr Pharm Des., 15(5):467-478, 2009.
- Kavalipati N, Shah J, Ramakrishan A, Vasawala H. Pleiotropic effects of statins. Indian J EndocrinolMetab., 19(5):554-62. doi: 10.4103/2230-8210.163106, 2015.
- Kinlay Schwartz GG, Olsson AG, Rifai N, Sasiela WJ, Szarek M, Ganz P, Libby Pet al, Effect of Atorvastatin on Risk of Recurrent Cardiovascular Events After an Acute Coronary

- Syndrome Associated With High Soluble CD40 Ligand in the Myocardial Ischemia Reduction with Aggressive Cholesterol Lowering (MIRACL) Study. *Circulation*, 110:386-391. DOI: 10.1161/01.CIR.0000136588.62638.5E, 2004.
16. Solaini G, Harris DA. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J*. 390 (Pt 2): 377–394. doi:10.1042/BJ20042006, 2005.
 17. Zamzami N, Kroemer G. The mitochondrion in apoptosis: how Pandora's box opens. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2: 67–71, 2001. PubMed: 11413468.
 18. Paolo Bernardi et al. The Mitochondrial Permeability Transition Pore: Channel Formation by F-ATP Synthase, Integration in Signal Transduction, and Role in Pathophysiology. *Physiol Rev*. 2015 Oct; 95(4): 1111–1155 PMID: PMC4600949. doi: 10.1152/physrev.00001.2015
 19. Valeria Giorgio et al. Dimers of mitochondrial ATP synthase form the permeability transition pore. *PNAS* 2013. doi/10.1073/pnas.1217823110
 20. Halestrap AP. What is the mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 46: 821–831, 2009.
 21. Leung AWC, Halestrap AP. Recent progress in elucidating the molecular mechanism of the mitochondrial permeability transition pore. *Biochim Biophys Acta* 1777(7-8):946-952, 2008.
 22. Zucchi R, Ghelardoni S, Evangelista S. Biochemical basis of ischemic heart injury and of cardioprotective interventions. *Curr Med Chem*, 14(15):1619-1637, 2007.
 23. Marina Prendes MG, Torresín E, González M, Fernández MA, Perazzo JC, Savino EA, Varela A. Protection of ischaemic-reperfused rat heart by dimethylamiloride is associated with inhibition of mitochondrial permeability transition. *Clin Exp Physiol Pharmacol* 35(2): 201-206, 2008.
 24. Marina Prendes MG, et al. Involvement of mitochondrial permeability transition, glutathione status, pentose phosphate pathway and oxidative damage in the protective effect of fasting on the ischaemic-reperfused rat heart. *Clin Exp Physiol Pharmacol* 36(7): 637-642, 2009.
 25. Marina Prendes MG et al. Role of mitochondrial permeability transition pore and mitochondrial ATP-sensitive potassium channels in the protective effects of ischemic preconditioning in isolated hearts from fed and fasted rats. *J Physiol Biochem*, 70(3):791-800, 2014.
 26. KELLE, et al. The combined effect of rosuvastatin and ischemic pre- or post-conditioning on myocardial ischemia-reperfusion injury in rat heart. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 19: 2468-2476. 2015.
 27. Garg M. Chronic oral administration of low-dose combination of fenofibrate and rosuvastatin protects the rat heart against experimentally induced acute myocardial infarction. *Fundamental & Clinical Pharmacology* 30 394–405 doi: 10.1111/fcp.12204. 2016.
 28. D'Annunzio V. Rosuvastatin Given During Reperfusion Decreases Infarct Size and Inhibits Matrix Metalloproteinase-2 Activity in Normocholesterolemic and Hypercholesterolemic Rabbits. *J Cardiovasc Pharmacol* 2009;53:137–144. 2009.
 29. Henning RJ, et al. Human umbilical cord blood mononuclear cells activate the survival protein Akt in cardiac myocytes and endothelial cells that limits apoptosis and necrosis during hypoxia. *Transl Res*. 159(6):497-506, 2012.
 30. Vélez D et al. Effects of wortmannin on cardioprotection exerted by ischemic preconditioning in rat hearts subjected to ischemia-reperfusion. *J Physiol Biochem* 72(1):83-91. DOI 10.1007/s13105-015-0460-6, 2016
 31. Ong B, et. al. Akt protects the heart against ischaemia-reperfusion injury by modulating mitochondrial morphology. *Thromb Haemost*. 113(3):513-21. ID: 1000466526, 2015.
 32. Miyamoto S, et al. Akt mediated mitochondrial protection in the heart: metabolic and survival pathways to the rescue. *J Bioenerg Biomembr*, 41(2): 169–180. Doi:10.1007/s10863-009-9205-y, 2009.
 33. Nishihara M, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore complex in GSK-3-mediated myocardial protection. *J Mol Cell Cardiol*. 43 (5):564-570. doi:10.1016/j.yjmcc.2007.08.010, 2007.
 34. Das S, Wong et al. Glycogen Synthase Kinase 3 Inhibition Slows Mitochondrial Adenine Nucleotide Transport and Regulates Voltage-Dependent Anion Channel Phosphorylation. *Circ Res*, 24;103(9):983-991. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.108.178970, 2008.
 35. Liu C Rosuvastatin postconditioning protects isolated hearts against ischemia–reperfusion injury: The role of radical oxygen species, PI3K–Akt–GSK-3 pathway, and mitochondrial permeability transition pore.. *Cardiovascular Therapeutics* 2017; 35: 3–9. DOI: 10.1111/1755-5922.12225. 2017