

Inhibición de la transición de la permeabilidad mitocondrial y del daño por reperfusión miocárdica por ciclosporina A

Edmundo Chávez,* Noemí García,* Natalia Pavón*

Resumen

Introducción: Los resultados presentados en este estudio indican que el inmunosupresor ciclosporina A actúa como una droga cardio-protectora. **Métodos:** Este efecto fue analizado durante el desarrollo de arritmias por reperfusión, después de un período de isquemia de 5 minutos de la ligadura de la coronaria, en corazones de ratas anestesiadas. **Resultados:** Los resultados indican que la ciclosporina inhibe la transición de la permeabilidad mitocondrial; además cuando se administra antes de la oclusión coronaria, a la dosis de 20 mg/kg, efectivamente protege contra la alta incidencia de arritmias, y la disminución de la presión sanguínea. Además inhibe el aumento de las enzimas lactic deshidrogenasa y creatina cinasa en el plasma. **Conclusiones:** Proponemos que el efecto protector está relacionado con su bien documentada acción inhibitoria del daño mitocondrial inducido por el Ca²⁺.

Summary

INHIBITION OF PERMEABILITY TRANSITION AND MYOCARDIC REPERFUSION DAMAGE BY CYCLOSPORINE A

Introduction: The results presented in this study indicate that the immunosuppressor cyclosporine A acts as a cardioprotective drug. **Methods:** This effect was analyzed during development of reperfusion-induced arrhythmias after 5 min period of coronary ligation in hearts of rats under anesthesia. **Results:** The results indicate that cyclosporine inhibits Ca²⁺-induced mitochondrial damage; furthermore, when given before coronary occlusion, at a dose of 20 mg/kg, effectively protects against the high incidence of arrhythmias and the fall in blood pressure induced by reperfusion. In addition, it inhibits the delivery of lactic dehydrogenase and creatine kinase enzymes to the plasma. **Conclusions:** We propose that the protective effect could be related with its well documented action to restrain Ca²⁺-induced damage of mitochondrial functions.

(Arch Cardiol Mex 2007; 77, S4, 77-81).

Palabras clave: Mitocondria. Ciclosporina A. Calcio. Corazón. Isquemia. Reperfusión.

Key words: Mitochondria. Cyclosporine A. Calcium. Heart. Ischemia. Refusion.

Introducción

L a reperfusión de arterias coronarias para limitar el daño miocárdico por isquemia, y por lo tanto la extensión de la necrosis es posible mediante la terapia trombolítica, angioplastía coronaria o la instalación de puentes arteriales mediante cirugía. Sin embargo, el restablecimiento del flujo coronario al miocardio isquémico puede precipitar una serie de even-

tos, i.e., i) arritmias por reperfusión, ii) daño vascular y no reflujo, iii) parálisis funcional miocárdica, iv) posible aceleración de la necrosis, y v) apoptosis y edema celular. En síntesis, el daño por reperfusión podría significar muerte celular.¹ En años recientes se ha acumulado un número importante de evidencias sugiriendo que los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) contribuyen de manera importante al daño tis-

* Departamento de Bioquímica.

Instituto Nacional de Cardiología, "Ignacio Chávez".

Correspondencia: Edmundo Chávez. Departamento de Bioquímica. Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". (INCICH, Juan Badiano Núm. 1. Col. Sección XVI, Tlalpan 14080, México, D.F.). Tel. 5573-2911 (ext 1214, 1390).

lar después de un período de isquemia.² De acuerdo a lo anterior, utilizando modelos de isquemia reperfusión se ha concluido que los atrapadores de ROS tienen efectos benéficos sobre la viabilidad de los miocitos.³ Un factor adicional en la patofisiología del daño involucra a la sobrecarga intracelular del Ca²⁺.⁴ Por lo tanto para asegurar un alto grado de cardioprotección se ha utilizado una terapia combinada con antagonistas de los canales de Ca²⁺ y atrapadores de radicales libres.⁵

Por otro lado, la acumulación masiva del Ca²⁺ en la matriz mitocondrial induce la apertura de un poro inespecífico con un diámetro de 2-3 nm que permite la salida de iones y metabolitos.⁶ Esto último lleva al desacoplamiento de la fosforilación oxidativa, hinchamiento de las mitocondrias y desaparición del potencial eléctrico transmembranal.⁷ Este daño mitocondrial subyace en el daño producido por la reperfusión seguida de un período de isquemia.⁸

El daño producido por el Ca²⁺ es inhibido por la droga inmunosupresora ciclosporina A (CSA) protege de manera eficaz a las mitocondrias contra el daño inducido por la acumulación masiva del Ca²⁺⁹ y el estrés oxidativo. El mecanismo por el cual CSA protege está relacionado con su unión a la enzima ciclofilina, lo que a su vez inhibe la síntesis de linfocinas, entre ellas la interleucina 6, y en consecuencia, disminuye la quimiotaxis de un gran número de neutrófilos capaces de liberar ROS y enzimas líticas. En mitocondrias, la CSA se une a la ciclofilina D cerrando el poro inespecífico. La naturaleza química de este poro no está bien definida; sin embargo, se ha propuesto que la adenin-nucleótido translocasa se convierte en tal poro.¹⁰ Basados en estos antecedentes este estudio fue diseñado con el fin de investigar si la CSA es capaz de proteger al miocardio contra el daño por reperfusión. Encontramos que la CSA administrada i.v. a ratas a una dosis de 20 mg/kg, efectivamente protege al tejido miocárdico contra el daño inducido por la reperfusión después de un período de 5 min de isquemia.

Métodos

Ratas Wistar con peso corporal de 250-300 g fueron anestesiadas con pentobarbital (55 mg/kg, i.p.). Bajo anestesia las ratas fueron entubadas y ventiladas. La ciclosporina fue administrada, a una dosis de 20 mg/kg, 30 min antes de iniciar el experimento. Despues de una toraco-

tomía la arteria coronaria izquierda fue ocluida con seda 6-0 durante 5 min; la reperfusión se inició al retirar el hilo de seda. Un electrodo de superficie fue utilizado para monitorear la frecuencia y las arritmias cardíacas. La presión sanguínea fue monitoreada a través de una cánula colocada en la femoral. Las determinaciones enzimáticas se estimaron de la sangre tomada del ventrículo izquierdo. Las mitocondrias se aislaron por homogeneización del tejido en sacarosa 0.25 M siguiendo el patrón estándar de centrifugación. El transporte de Ca²⁺ se siguió en un espectrofotómetro a 675-685 nm utilizando Arsenazo III. La transición de la permeabilidad fue promovida utilizando carboxiatractilósido, un inhibidor del acarreador de ADP/ATP.

Resultados y discusión

La fijación de la adenin-nucleótido translocasa en la orientación M, esto es hacia la matriz mitocondrial, permite la transformación de este acarreador en un poro inespecífico sensible a CSA.¹⁰ La Figura 1, trazo a, muestra que la adición de 2 μM de carboxiatractilósido promueve la transición de la permeabilidad y la rápida salida del Ca²⁺ intramitocondrial. El trazo b señala que la presencia de 0.5 μM de CSA cierra el poro, por lo

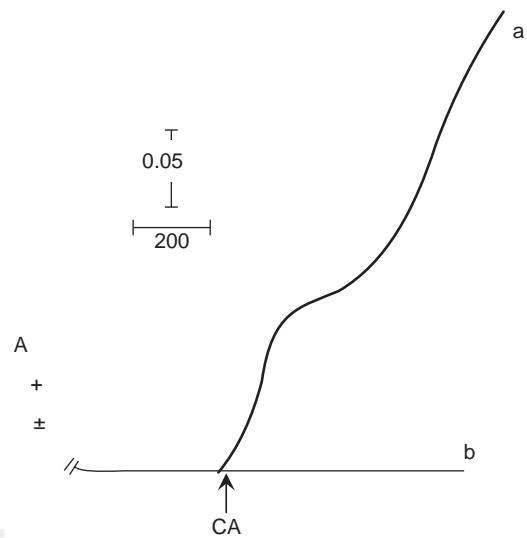


Fig. 1. Efecto de la CSA sobre la transición de la permeabilidad mitocondrial inducida por carboxiatractilósido. Dos mg de proteína mitocondrial fueron añadidos a un medio conteniendo 125 mM KCl, 10 mM succinato, 2 mM fosfato, 50 μM CaCl₂, 10 mM HEPES, 200 μM ADP, 5 μg rotenona, 2 μg oligomicina, y 50 μM Arsenazo III. Donde se señala 0.5 μM CSA y 1 μM de carboxiatractilósido (CAT) fueron añadidos. Volumen final 3 mL. Temperatura 25 °C.

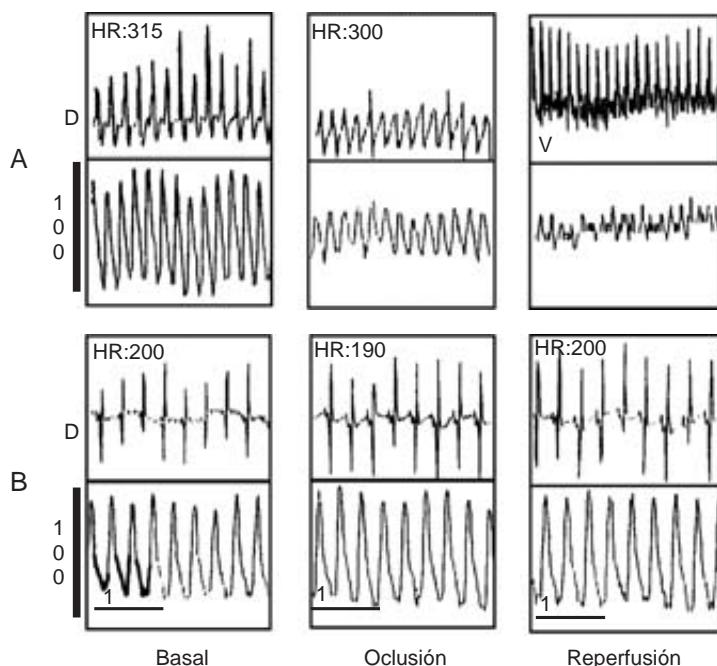


Fig. 2. Efecto protector de la CSA sobre la generación de arritmias inducidas por la isquemia-reperfusión. El Panel A muestra las arritmias que aparecen después de la reperfusión en ratas control. El Panel B muestra la disminución de arritmias en ratas inyectadas con CSA. La parte inferior de los trazos muestra la tensión arterial.

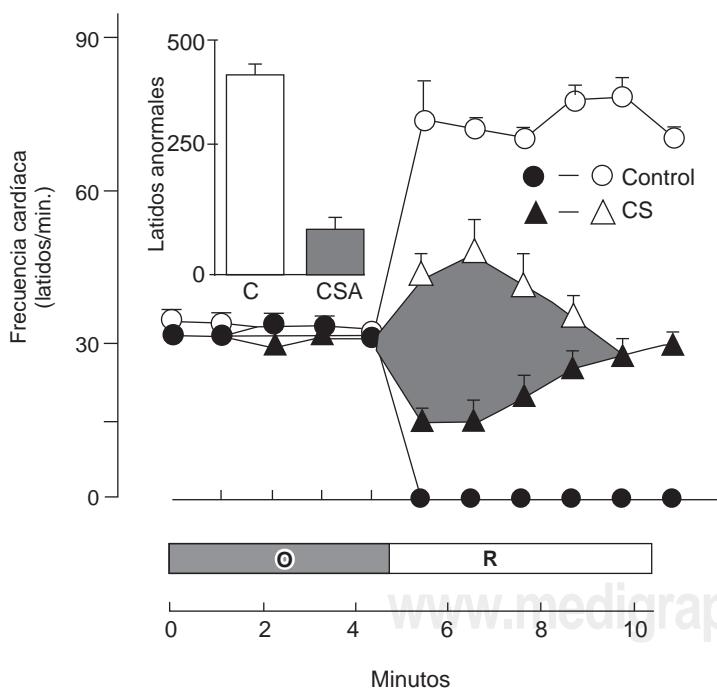


Fig. 3. Curso temporal de la frecuencia cardíaca en ratas control y ratas tratadas con CSA. Al tiempo indicado la arteria coronaria fue ocluida. La reperfusión se inició donde se indica. Los latidos controles son indicados por ● y ○, y las tratadas por △ y ▲. El inserto muestra la diferencia en la incidencia de arritmias entre el control y las tratadas con CSA.

que se impide la salida del Ca^{2+} . Este efecto de la CSA se debe a su unión con la enzima ciclofilina D impidiendo su interacción con la translocasa. Considerando que la transición de la permeabilidad mitocondrial subyace en el daño por reperfusión. El panel A de la *Figura 2* muestra que en ratas control la aumentada incidencia de taquicardia y fibrilación ventricular permanece sin cambio durante aproximadamente 6 min después de la reperfusión. De hecho, el corazón no regresa al ritmo sinusal. El análisis paralelo de la presión arterial muestra que este parámetro disminuyó completamente durante el período de reperfusión. El panel B de la *Figura 2* señala el efecto protector de la CSA sobre el daño inducido por reperfusión. El trazo de EGC indica que en ratas tratadas previamente con una dosis de 20 mg/kg de CSA el efecto arritmogénico de la reperfusión disminuye considerablemente en un período de tiempo de aproximadamente 2 min, con retorno al ritmo sinusal por el resto del tiempo que dura el experimento. Debe hacerse notar que la frecuencia cardíaca aumentó a sólo 200 latidos por minuto sobre la velocidad observada durante el período de isquemia. En las ratas control el incremento fue de 500 latidos por minuto. Contrario a lo observado en las ratas control la presión sanguínea no disminuyó en las tratadas con CSA.

En la *Figura 3* se muestra el análisis cuantitativo de la frecuencia cardíaca en ratas control y en las tratadas con CSA. Como se indica el promedio de latidos durante el período de isquemia fue de 310 ± 10 por minuto. Despues de 3 min de reperfusión, este valor se incrementó a 800 ± 50 , en ratas control y permanece sin cambio por el tiempo restante. La incidencia de latidos normales disminuyó completamente. La administración de CSA produjo una importante reducción en la frecuencia de los latidos anormales inducidos por la reperfusión, los cuales alcanzaron un valor de 560 ± 20 latidos/min. Esta velocidad fue significativamente más baja que la observada en ratas control (800 latidos/min). Un descubrimiento importante de este experimento fue que la frecuencia disminuyó progresivamente, hasta retornar al ritmo sinusal 5 minutos después de la reperfusión. La incidencia de latidos normales fue más alta que en el control, i.e., 200/min, 2 min después de iniciada la reperfusión. La diferencia entre latidos anormales en ratas control y en aquéllas tratadas con CSA es mostrada en el inserto de la *Figura 3*, claramente se muestra que la incidencia de las arritmias por

Tabla I.

Enzima	Basal	Después de la reperfusión	
		Control	+ CSA
LDH	267	660	350
CK	541	2,728	801

Concentraciones plasmáticas de deshidrogenasa láctica y creatina cinasa en ratas control y tratadas con CSA. Los valores se expresan en UI/L.

reperfusión es menor que en las ratas tratadas. Para evaluar bioquímicamente el efecto cardioprotector de la CSA, se determinaron los plasmáticos de las enzimas LDH y CK. La *Tabla I* muestra que en ratas control la reperfusión aumenta los niveles de estas enzimas de 267 y 541 UI/L a 660 y 2728/UI/L respectivamente, mientras que los valores correspondientes fueron 350 y 801 en ratas tratadas con CSA. Estos valores indican una ausencia de daño inducida por la CSA.

La microscopía de luz del tejido cardíaco (*Fig. 4A*) en ratas control muestra que, en general, las fibras miocárdicas pierden su patrón estriado, hay edema intersticial que causa la separación de las fibras. La *Figura 4B* muestra una microfotografía del tejido cardíaco de ratas tratadas con CSA. En general, como se observa, está en buena forma, la imagen del tejido estriado permanece normal. Es clara la ausencia de edema.

En el presente estudio analizamos el efecto de la CSA sobre la vulnerabilidad del corazón de ratas a presentar arritmias, y taquicardia ventricular durante la reperfusión, seguida de un período de isquemia. Cuando se administró 30 min previos a la oclusión de la arteria coronaria, la CSA disminuyó la incidencia de arritmias ventriculares. La protección por CSA contra el desarrollo de inestabilidad eléctrica por la reperfusión correlacionó con los bajos niveles de LDH y CK liberados a la circulación. Estudios recientes sobre la protección del daño por reperfusión involucran la acción de ROS. Sin embargo, la CSA no tiene propiedades de atrapador de estos radicales por lo

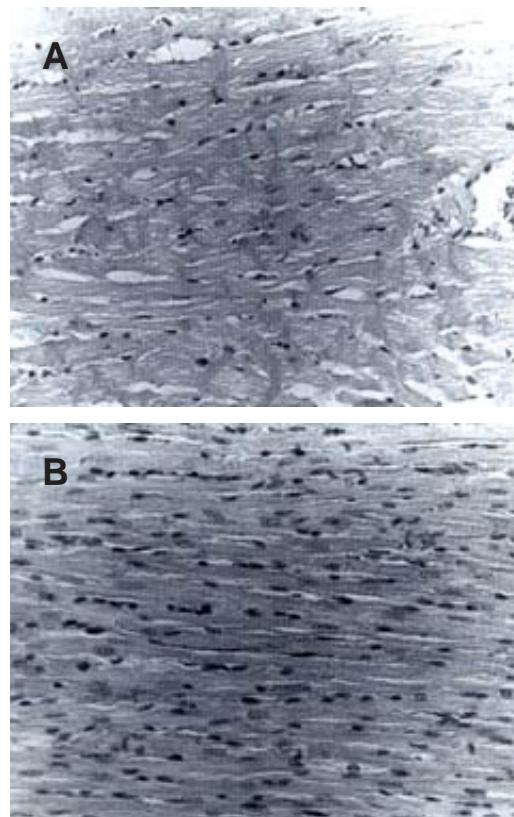


Fig. 4. Imagen histológica del tejido cardíaco. La sección histológica de las ratas control muestra un severo edema intersticial, el cual produce separación de las fibras. El tratamiento con CSA previene la mayoría del daño.

que su mecanismo de acción debe ser diferente. Se conoce que el sitio de acción de la CSA, en mitocondrias aisladas, es la ciclofilina D que se encuentra unida a la ANT y bloquea el poro inespecífico de transición de la permeabilidad. Esto último preservaría la fosforilación oxidativa y la función contrátil de las células miocárdicas. Sin embargo, no podemos descartar que la CSA inhibe la reacción inflamatoria y en consecuencia la acumulación de neutrófilos, lo que lleva al daño celular en la isquemia miocárdica.

Referencias

- JENNINGS RB, REIMER KA, STEENBERGEN C: *M myocardial ischemia revisited: The osmolar load, membrane damage, and reperfusion*. J Mol Cell Cardiol 1986; 18: 769-780.
- BOLLI R, ET AL: *Direct evidence that oxygen-derived free radicals contribute to postischemic myocardial dysfunction in the intact dog*. Proc Natl Acad Sci USA 1989; 86: 4695-4699.
- BERNIER M, ET AL: *Reperfusion arrhythmias, dose-related protection by anti-free radical interventions*. Am J Physiol 265, H1344-H1352, 1989.
- OPIE LA, COETZEE WA: *Role of calcium ions in reperfusion arrhythmias relevance to pharmacological intervention*. Cardiovasc. Drug Ther 2, 1989, 623-633.

5. JULIA PL, ET AL: *Studies of controlled reperfusion after ischemia. XXI Reperfusate composition: Superiority of blood cardioplegia damage-importance of endogenous oxygen free radical savensis in red blood cells.* J Thorac Vardiovasc Surg 1991; 101: 303-313.
6. GARCÍA N, GARCÍA JJ, CORREA F, CHÁVEZ E: *The permeability transition pore as a pathway for the release of mitochondrial DNA.* Life Sci 2005; 76: 2873-2880.
7. GARCÍA N, ZAZUETA C, CARRILLO R, CORREA F, CHÁVEZ E: *Copper sensitizes the mitochondrial permeability transition to carboxyatractyloside and oleate.* Mol Cell Biochem 2000; 209: 119-123.
8. HALESTRAP AP, CLARKE SJ, JAVADOV SA: *Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion-a target for cardio-protection.* Cardiovasc Res 61, 372-385.
9. CHAVEZ E, ZAZUETA C: *Cyclosporin, from clinical to basic research.* Curr Top Pharm 1998; 4: 183-192.
10. ZAZUETA C, SÁNCHEZ C, GARCÍA N, CORREA F: *Possible involvement of the adenine nucleotide translocase in the activation of the permeability transition pore induced by cadmium* Int. J Biochem Cell Biol 2000; 32: 1093-1101.