

## Artículo de Revisión

## EL PORO DE TRANSICIÓN DE PERMEABILIDAD MITOCONDRIAL (PTP<sub>m</sub>) COMO BLANCO DE ESTRATEGIAS CARDIOPROTECTORAS EN DAÑO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA: ROL DE LOS ANESTÉSICOS INHALATORIOS

JAVIER PEZOA M.\*

**Palabras clave:** Isquemia; reperfusión, cardioprotección, poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTP<sub>m</sub>).

### INTRODUCCIÓN

La enfermedad isquémica del corazón, una de las principales causas de mortalidad en las sociedades industrializadas, está caracterizada por un flujo sanguíneo insuficiente a regiones determinadas del miocardio, que en consecuencia experimentan necrosis tisular (infarto)<sup>1</sup>. Esta entidad clínica se puede desarrollar como consecuencia de muchas enfermedades, incluyendo hipertensión arterial, aterosclerosis, dislipidemia y diabetes mellitus<sup>1</sup>. Durante las últimas dos décadas la revascularización aguda con drogas trombolíticas o procedimientos intervencionistas, ha emergido como el tratamiento estándar para pacientes con infarto agudo del miocardio<sup>2</sup>. Aunque la restauración del flujo sanguíneo a un corazón isquémico es esencial para prevenir el daño celular irreversible, la reperfusión *per se* puede aumentar la lesión tisular más allá de la que produciría la isquemia en solitario<sup>2,3</sup>. El daño celular posterior a la reperfusión de un miocardio isquémico previamente viable ha sido definido como daño por isquemia-reperfusión<sup>3</sup>. Las alteraciones funcionales que se pueden observar en esta entidad patológica incluyen: depresión de la función contráctil cardíaca o “*aturdimiento miocárdico*”, reactividad vascular disminuida, fenómeno de no reflujo y arritmias<sup>1-3</sup>. Varios mecanismos han sido propuestos como mediadores (independientes o interrelacionados) del daño por isquemia-reperfu-

sión. Entre ellos podemos destacar la activación del complemento, la activación leucocitaria, la formación de radicales libres y la activación de la apoptosis y la necrosis (entendiendo la misma como un fenómeno regulado)<sup>2-4</sup>. En relación a estas dos últimas, la mitocondria, tradicionalmente relacionada a la generación de energía para la extensa y variada gama de funciones celulares, puede ejercer un rol esencial en eventos tan radicalmente opuestos como la muerte celular por apoptosis y necrosis<sup>4,5</sup>. A este respecto, abundante evidencia ha demostrado que durante la isquemia y posterior reperfusión, eventos moleculares de naturaleza variable pueden determinar la permeabilización de la membrana mitocondrial interna<sup>6-8</sup>. Por su parte, dependiendo del número de mitocondrias afectadas por este fenómeno, la célula puede entrar en proceso de muerte celular tanto apoptótica como necrótica, lo que en suma determinará la pérdida de cardiomiocitos por parte del miocardio<sup>4</sup>.

Teniendo en cuenta lo expuesto previamente, cabe destacar que una comprensión acabada de los mecanismos moleculares por los cuales se induce la apoptosis y/o la necrosis durante la isquemia-reperfusión, ostenta una importancia central para lograr el desarrollo adecuado de estrategias terapéuticas que en el futuro permitan limitar la activación de estos procesos celulares, en el contexto de eventos durante los cuales la irrigación del miocardio se ve comprometida.

\* Escuela de Postgrado, Magíster en Fisiopatología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Licenciado en Medicina.

En esta revisión se analizan en forma breve los principales mecanismos moleculares involucrados en la activación de la apoptosis y la necrosis durante el daño por isquemia-reperfusión, haciendo énfasis en el rol que desempeña la inducción del poro de transición de permeabilidad mitocondrial (PTPm). De igual manera, se expone la evidencia disponible acerca de la posible actividad precondicionante (o postcondicionante) que otorgaría la administración de ciertos agentes con capacidad para inhibir la apertura del PTPm.

### **MECANISMOS DE MUERTE CELULAR DURANTE LA ISQUEMIA - REPERFUSIÓN**

La muerte celular a continuación de un episodio de isquemia-reperfusión ha demostrado tener presentaciones tanto de apoptosis como de necrosis.

La apoptosis, originalmente descrita por Kerr y colegas en 1972, está caracterizada por condensación y fragmentación de la cromatina, encogimiento celular y protrusión de la membrana plasmática con liberación de cuerpos apoptóticos (estructuras que contienen componentes celulares), los que posteriormente son fagocitados<sup>9</sup>. Aunque estas descripciones morfológicas no se aplican completamente a la mayor proporción de la muerte celular en un contexto de isquemia-reperfusión, los mecanismos de la apoptosis han sido probadamente implicados en la pérdida de células durante esta forma de daño tisular<sup>10,11</sup>. A este respecto, se ha demostrado que la supresión de proteínas antiapoptóticas o la sobreexpresión de proteínas antiapoptóticas, reducen la muerte celular mediada por isquemia-reperfusión<sup>12,13</sup>; y que la administración de inhibidores de caspasas (cuya activación es considerada uno de los principales mecanismos de muerte celular apoptótica) reduce el tamaño del infarto<sup>14</sup>, sugiriendo un importante rol para la activación de la apoptosis en daño por isquemia-reperfusión.

Por otra parte, la muerte celular por necrosis está caracterizada por hinchazón celular que lleva a ruptura irreversible de la membrana plasmática con liberación de componentes citosólicos, lo que posteriormente desencadena una respuesta inflamatoria (un importante componente del daño por isquemia-reperfusión)<sup>4</sup>. De hecho, la liberación de troponina y creatina kinasa que ocurre durante la isquemia-reperfusión, se debería a la liberación necrótica de dichos componentes intracelulares<sup>4</sup>. Respecto del mecanismo que determina la ruptura de la membrana plasmática, se sugiere que la combinación entre pérdida de la producción de ATP y desregulación iónica con hinchazón celular, conspiran

para gatillar este evento determinante de la muerte celular por necrosis (ver siguiente apartado).

### **ACTIVACIÓN DE LA APOPTOSIS Y LA NECROSIS DURANTE LA ISQUEMIA - REPERFUSIÓN: ROL DEL PTPm**

Hoy es ampliamente sabido que la apoptosis y la necrosis contribuyen a la muerte celular asociada con daño por isquemia-reperfusión. Sin embargo, los mecanismos responsables de su inducción no han sido aún completamente dilucidados.

Respecto a los eventos precedentes a la apoptosis y la necrosis, abundante evidencia sugiere que una importante proporción de estas formas de muerte celular puede ser gatillada cuando la isquemia es seguida de un período de reperfusión<sup>4,15,16</sup>, más allá de la isquemia en solitario. Esta diferencia tiene implicancias clínicas de suma importancia, puesto que si un daño adicional ocurre durante la reperfusión, ello representaría una oportunidad para intervenir con estrategias cardioprotectoras introducidas dentro de dicho periodo, y por ende con posterioridad al evento isquémico<sup>4</sup>. En relación a lo anterior, una larga lista de estudios ha sugerido que la introducción de drogas o estrategias cardioprotectoras en etapas muy tempranas de la reperfusión, pueden reducir el tamaño del infarto significativamente<sup>4</sup>. Entre éstas, los inhibidores del PTPm han reportado ofrecer protección al miocardio cuando son administrados al inicio de la reperfusión<sup>17</sup>.

La transición de permeabilidad mitocondrial (TPm) fue descrita por primera vez a finales de los 70s por Haworth y Hunter, y describe un fenómeno en el cual se produce un cambio abrupto en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna en respuesta a calcio, estrés oxidativo y depleción de ATP, entre otros factores<sup>18</sup>. Estudios posteriores han demostrado que la TPm está determinada por la apertura de un poro no específico (hoy conocido como PTPm) cuya identidad molecular es aún hoy motivo de debate<sup>19,20</sup>. La contribución del PTPm al daño por isquemia-reperfusión fue propuesta por primera vez en 1987, cuando se observó que ciertos factores que incrementan la probabilidad de apertura del poro, prevalecen en el contexto del daño por isquemia-reperfusión<sup>21</sup>. Dichos factores incluían una elevación en los niveles de  $Ca^{2+}$  y  $P_i$  tisular, y depleción de los niveles de nucleótidos de adenina durante el periodo de isquemia, seguido de una explosión de estrés oxidativo e influjo de calcio al momento de la reperfusión.

La mayor consecuencia de la apertura del PTPm es que la membrana mitocondrial interna no

sigue representando una barrera para los protones, lo que lleva a disipación de la fuerza otorgada por la gradiente protónica. El desacoplamiento resultante de la fosforilación oxidativa lleva entonces a un cese en la producción de ATP por parte de la mitocondria, con el consecuente déficit energético para las funciones celulares<sup>5</sup>. Otra consecuencia de la apertura del PTPm es que toda molécula de bajo peso molecular (incluyendo cofactores e iones) se equilibrará a través de la membrana interna, lo que finalmente determinará un incremento en el volumen mitocondrial<sup>5</sup>. Esto ocurre porque el aumento en la permeabilidad de la membrana mitocondrial interna a moléculas pequeñas, media el equilibrio de todo osmolito de bajo peso molecular, mientras que retiene proteínas dentro de sus respectivos compartimentos. Como la concentración proteica de la matriz mitocondrial es mayor que la del citosol y la del espacio intermembranoso, ésta ejerce una presión coloidosmótica que conduce a hinchazón de la matriz mitocondrial<sup>6-8</sup>. La membrana mitocondrial interna (la cual se encuentra plegada sobre sí misma formando las crestas mitocondriales) puede acomodarse a este incremento en el volumen de la matriz sin romperse. Sin embargo, la membrana mitocondrial externa (que tiene menor área de superficie) no tiene tal capacidad, por lo que finalmente sufre ruptura<sup>5,22</sup>. Este evento libera los contenidos del espacio intermembranoso al citosol, lo cual incluye factores proapoptóticos como el citocromo *c*, iniciando así el proceso de apoptosis<sup>22,23</sup>. Paralelamente (como ya se ha expuesto), si un gran número de mitocondrias sufre TPm la célula pierde la capacidad de producir ATP, fuente energética necesaria para mantener la homeostasis iónica, la que en consecuencia deja de existir. Esto determina aumento del volumen celular, ruptura de la membrana plasmática y muerte celular por necrosis.

En conjunto, la evidencia ha demostrado que la mitocondria emerge como un importante mediador y regulador de las distintas formas de muerte celular que participan en el daño por isquemia-reperusión. En particular, el PTPm parece comportar el mayor regulador tanto de la muerte celular por apoptosis como por necrosis.

### Características del PTPm

A lo largo de las últimas décadas se ha podido establecer que el PTPm es un canal no selectivo con un corte molecular de alrededor de 1,5 kDa, cuya apertura induce la transición al estado hinchado de la mitocondria. Este aumento en el volumen mitocondrial puede ser evidenciado gracias a la

disminución en la dispersión de la luz observada en estudios con suspensiones de mitocondrias<sup>4,5,18</sup>. El gatillante primario para la apertura del PTPm es el aumento de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  en la matriz mitocondrial<sup>18</sup>. De hecho, *in vitro*, es posible inducir la apertura del PTPm mediante adición de calcio, y luego reestablecer su estado cerrado al quelar el calcio previamente administrado<sup>18,21</sup>. Notablemente, la especificidad del sitio de unión para el calcio parece ser absoluta, pues otros cationes divalentes como  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ba}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  actúan como inhibidores de la apertura del canal<sup>18,24</sup>. Por otra parte, se ha demostrado que los protones ( $\text{H}^+$ ) interfieren con la unión del  $\text{Ca}^{2+}$  al sitio de gatillo, lo que daría cuenta de la potente inhibición sobre la apertura del PTPm ejercida por un pH bajo (como el que prevalece durante el periodo de isquemia)<sup>18,25</sup>. No obstante, la concentración de calcio requerida para la apertura del poro ha demostrado ser altamente dependiente de las condiciones prevalentes<sup>5</sup>. De esta manera, la apertura del poro puede ocurrir sin administración extra de calcio si se agrega un inductor del canal. Este es el ejemplo del estrés oxidativo, el cual puede sensibilizar el poro a las  $[\text{Ca}^{2+}]$  de la matriz mitocondrial en reposo<sup>26</sup>. En otras palabras, el aumento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de la matriz puede ser insuficiente por sí solo para desencadenar la apertura del PTPm, y por ende la intervención de factores adicionales (como estrés oxidativo, depleción de nucleótidos de adenina, concentraciones elevadas de fosfato y depolarización mitocondrial) resultaría crítica en algunas ocasiones<sup>5</sup>. De hecho, estos factores (especialmente el estrés oxidativo) pueden ser más importantes que el incremento en la  $[\text{Ca}^{2+}]$  en situaciones como la isquemia - reperusión<sup>7,27</sup>.

Respecto a los nucleótidos de adenina, se piensa que estos ejercen un efecto inhibitorio sobre la apertura del PTPm, que estaría mediado por su unión a un sitio presente en la translocasa de nucleótidos de adenina (ANT, *por sus siglas en inglés*). En relación a ello, la evidencia ha sugerido que la sensibilidad del PTPm a la apertura por elevación de la  $[\text{Ca}^{2+}]$  de la matriz, puede ser reducida por ATP y por ADP, pero no por sus complejos con  $\text{Mg}^{2+}$  o por otros nucleótidos que no son transportados por ANT (como AMP, GDP o GTP)<sup>28,29</sup>.

No obstante los conocimientos que se han adquirido respecto del funcionamiento de la TPm, la identidad molecular exacta del PTPm ha sido elusiva a las investigaciones. De hecho, el rol del PTPm (si lo tiene) en células sanas aún no ha sido establecido. Por esta razón, una amplia y exhaustiva búsqueda se ha llevado a cabo de la mano de distintos grupos de investigadores, con el fin de dilucidar los

componentes estructurales y reguladores de este canal no selectivo. A este respecto, varias son las moléculas que se ha propuesto participan en la configuración de este poro mitocondrial, pero solo unas pocas han sido significativamente sustentadas (o descartadas) con evidencia:

- **Ciclofilina-D:** la ciclofilina-D (CyP-D, *por sus siglas en inglés*) es una peptidil-propil cis-trans isomerasa presente en la matriz mitocondrial. Esta proteína es una molécula de 18 kDA codificada por el gen nuclear *PPIF* y sintetizada con una secuencia de destinación, la que es escindida tras su translocación a la matriz mitocondrial<sup>5</sup>. Su rol en la apertura del PTPm ha sido sugerido gracias a estudios que han analizado la pérdida de la función de CyP-D, ya sea mediante su inhibición farmacológica con ciclosporina A (CsA) o mediante knockout para su expresión<sup>19,30</sup>. La evidencia ha observado que si bien la pérdida de CyP-D no previene la apertura del PTPm, sí incrementa significativamente la carga de calcio requerida antes de que dicho evento ocurra<sup>28,31</sup>. Esta evidencia es consistente con la hipótesis de que la apertura del PTPm involucra un cambio conformacional en una proteína de la membrana mitocondrial interna, el que es gatillado por calcio pero facilitado por CyP-D, y que por ende puede ocurrir en ausencia de esta isomerasa si un estímulo de intensidad suficiente es desencadenado<sup>5</sup>.
- **Translocasa de nucleótidos de adenina:** como se ha expuesto previamente, existe evidencia que ha sugerido un rol para ANT en la apertura del PTPm<sup>28,29</sup>. De hecho, un modelo teórico para el PTPm propone que CyP-D se une a ANT, y que cuando ello ocurre en presencia de elevación de la  $[Ca^{2+}]$ , se produce un cambio conformacional en ANT que induce que el mismo forme un poro no selectivo<sup>28,32</sup>. Sin embargo, la ablación genética de ANT ha revelado que esta proteína no es esencial para el funcionamiento del canal, pues mitocondrias de hígado de ratón carentes de ANT1 y ANT2 aún exhiben transición de permeabilidad sensible a CsA<sup>33</sup>. Esto sugiere que otra proteína es el componente crítico que forma el poro del PTPm, con ANT desempeñando con mayor probabilidad un papel regulador.
- **Transportador de fosfato mitocondrial:** evidencia emergente sugiere que el transportador de fosfato mitocondrial (PiC, *por sus siglas en inglés*) exhibe un rol clave en la formación del PTPm. En congruencia con esta hipótesis se ha logrado demostrar la unión de CyP-D a PiC. Más aún, dicha unión ha probado ser in-

hibida frente a la administración de CsA, pero aumentada en condiciones de estrés oxidativo<sup>34</sup>. Sin embargo, nuevos estudios serán requeridos con el fin de probar un rol esencial de PiC en la formación estructural del PTPm.

### INHIBICIÓN DEL PTPm COMO ESTRATEGIA CARDIOPROTECTORA EN DAÑO POR ISQUEMIA - REPERFUSIÓN

El revolucionario descubrimiento realizado por Reimer y Jenning en 1986, acerca de que el tamaño del infarto del miocardio puede ser dramáticamente reducido si el miocardio es sometido a precondicionamiento isquémico (usando periodos breves de isquemia y reperfusión miocárdica), ha generado una amplia y exhaustiva búsqueda para dilucidar las vías de transducción de señales subyacentes a este poderoso efecto cardioprotector endógeno<sup>35</sup>.

Como ya se ha expuesto, la apertura del PTPm ha demostrado resultar en muerte celular tanto necrótica como apoptótica. Esto se debe a que durante la reperfusión se produce un notable aumento en la  $[Ca^{2+}]$  de la matriz mitocondrial, lo que asociado con un incremento en las especies reactivas del oxígeno (debido al retorno de grandes cantidades de oxígeno a la célula) y con la restauración del pH normal (el pH ácido inhibe al PTPm), resulta en la apertura del PTPm. Este evento por su parte depleta a la célula de ATP, lo que puede desencadenar la necrosis celular, y activa la vía mitocondrial para la apoptosis<sup>4</sup>. Por lo expuesto previamente, cabría esperar que la inhibición de la apertura del PTPm en un contexto de isquemia-reperfusión, debiera tener un efecto protector sobre el miocardio afectado. De hecho, la evidencia ha sustentado tal afirmación. Así, en 1991 el grupo de Crompton fue el primero en demostrar que el pretratamiento con CsA de corazones de rata sujetos a isquemia-reperfusión simulada, mejoraba la supervivencia celular de los cardiomiocitos<sup>36</sup>. Posteriormente, nuevas investigaciones demostraron que administrar CsA en el momento de la reperfusión miocárdica, mejoraba la recuperación de la contracción post isquémica y preservaba los niveles de ATP en corazones de rata profundos<sup>37</sup>. Más recientemente, un importante estudio demostró por primera vez que el precondicionamiento isquémico ejerce su efecto cardioprotector mediante la inhibición de la apertura del PTPm<sup>38</sup>. En conjunto, la evidencia expuesta sugiere que el PTPm comporta un importante blanco para el diseño de estrategias terapéuticas cardioprotectoras. Extrapolando esto a un contexto clínico, una droga capaz de inhibir directamente la apertura del

PTPm, tendría el potencial de ser de gran valor para proteger al corazón durante cirugías cardíacas o durante el tratamiento de trombosis coronaria. Aunque la afirmación anterior es alentadora, no es posible obviar ciertas limitantes presentadas por algunas de las estrategias cardioprotectoras usadas en los estudios descritos. A modo de ejemplo, Csa o sangliferina A (Sfa) no resultan totalmente adecuadas para la cardioprotección en humanos por 2 razones. Primero, tienen el potencial de generar efectos colaterales no deseados mediante su interacción con otras ciclofilinas como Cyp-A<sup>7</sup>. Segundo, su habilidad para inhibir la apertura del PTPm puede ser sobrepasada si la magnitud del estímulo responsable de la apertura del PTPm ( $[Ca^{2+}]$ , estrés oxidativo o depleción de nucleótidos de adenina) es incrementada<sup>5</sup>. Estas dificultades han impulsado la búsqueda de nuevas drogas que demuestren capacidad de inhibir la apertura del PTPm (y por ende de ser cardioprotectoras), pero que además resulten seguras para su uso en clínica. De entre éstas, los anestésicos inhalatorios del tipo halogenados se han alzado como una nueva opción, viable y segura, para ejercer inhibición del PTPm en un contexto de isquemia-reperusión.

### Rol de los anestésicos inhalatorios

En la última década un número creciente de estudios ha centrado sus esfuerzos en la búsqueda de agentes farmacológicos capaces de inhibir la apertura del PTPm durante episodios de isquemia-reperusión. Un grupo de fármacos que ha despertado especial interés, debido a su amplio uso en clínica (con probada seguridad en humanos) y a su potencial capacidad para limitar el tamaño y la severidad del daño del miocárdico durante eventos de isquemia-reperusión, son los anestésicos inhalatorios halogenados. En relación a esto, anestésicos volátiles como sevoflurano han demostrado proteger el miocardio de pacientes sometidos a cirugía de bypass coronario, superando incluso a anestésicos con conocida actividad cardioprotectora como propofol (un anestésico de administración endovenosa)<sup>39</sup>. Más recientemente, nueva evidencia ha demostrado que el efecto cardioprotector de algunos de estos anestésicos estaría mediado por una actividad inhibitoria sobre el PTPm. Así, desflurano ha demostrado mejorar la resistencia del PTPm a la apertura inducida por calcio, determinando que se requieran mayores cargas de este ión para desencadenar la T<sub>PM</sub><sup>40</sup>. En forma similar, se ha demostrado que el postcondicionamiento con sevoflurano tiene efecto protector contra el daño por isquemia-

reperusión miocárdico, y que dicho efecto estaría asociado a la inhibición de la apertura del PTPm<sup>41</sup>. No obstante estos resultados, los mecanismos moleculares exactos a través de los cuales este grupo farmacológico inhibe la apertura del PTPm aún permanecen inciertos. Es por esta razón que nuevos estudios serán requeridos para mejorar la comprensión de tales vías de señalización, permitiendo así realizar ensayos clínicos a gran escala y en forma segura.

### CONCLUSIÓN

La isquemia es una situación patológica que pone en riesgo la integridad de los tejidos y por ende la vida de los pacientes. Su frecuencia en la práctica médica determina que una gran proporción de los casos que los profesionales de la salud deben encarar, correspondan a alguna forma de presentación de esta interrupción al aporte sanguíneo normal de un órgano. Sin lugar a dudas en la actualidad el tratamiento de elección de la isquemia sigue siendo la restauración del flujo sanguíneo, en un lapso de tiempo que impida una lesión tisular irreversible (infarto). No obstante, al optar por esta estrategia terapéutica, se debe tener en mente la posibilidad de que el cuadro clínico que se enfrenta empeore debido a los efectos deletéreos que la reintroducción del aporte sanguíneo a los tejidos puede tener sobre un órgano previamente isquémico. Este nuevo tipo de insulto tisular, que en conjunto se denomina daño por isquemia-reperusión, ha sido motivo de extensa investigación y experimentación en las últimas décadas. Si bien es casi indudable que la apertura del PTPm ejerce un papel fundamental en la génesis de esta clase de lesión al miocardio, muchas son aún las interrogantes por aclarar en relación a la identidad y configuración molecular del poro, y a las vías de señalización encargadas de regularlo.

En vista de que la restitución del flujo sanguíneo seguirá comportando el tratamiento de primera línea frente a una isquemia miocárdica, no resulta irracional afirmar que el desarrollo de drogas u otras medidas terapéuticas, que permitan atenuar este tipo de injuria (o mejor aún prevenirla) en pacientes que sufran de eventos coronarios o que sean sometidos a cirugías con interrupción y derivación del flujo sanguíneo, debería representar una meta de importancia central para los equipos de investigación. En este contexto, los anestésicos inhalatorios se han alzado como un potencial candidato para reducir la magnitud del daño por isquemia-reperusión, al tener la capacidad de inhibir la

apertura del PTPm. Sin embargo, poco se sabe aún acerca de los mecanismos moleculares que median el efecto supresor de estos fármacos sobre el poro mitocondrial. Por ende, se requiere que nuevas y futuras investigaciones sigan desentrañando las brechas moleculares que aún se presentan en este

campo de la biología celular. Ello permitirá el desarrollo de agentes capaces de limitar la inducción de la apoptosis y la necrosis durante la isquemia-reperfusión, logrando con ello reducir la masa tisular perdida, mejorar la función miocárdica y disminuir la incidencia de arritmias mortales.

## REFERENCIAS

- Ferdinandy P, Schulz R. Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in myocardial ischaemia-reperfusion injury and preconditioning. *Br J Pharmacol* 2003; 138: 532-543.
- Zweier JL, Hassan MA. The role of oxidants and free radicals in reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2006; 70: 181-190.
- Weiskopf RB. Pathophysiology, clinical manifestations, and prevention of ischemia-reperfusion injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-1138.
- Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury. *Physiol Rev* 2008; 88: 581-609.
- Halestrap AP. What is mitochondrial permeability transition pore? *J Mol Cell Cardiol* 2009; 46: 821-831.
- Halestrap AP, Kerr PM, Javadov S, et al. Elucidating the molecular mechanism of the permeability transition pore and its role in reperfusion injury of the heart. *Biochim Biophys Acta* 1998; 1366: 79-94.
- Halestrap AP, Clarke SJ, Javadov S. Mitochondrial permeability transition pore opening during myocardial reperfusion - a target for cardioprotection. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 372-385.
- Bernerdi P. Mitochondrial transport of cations: channels, exchangers, and permeability transition. *Physiol Rev* 1999; 79: 1127-1155.
- Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 1972; 26: 239-257.
- Anversa P, Cheng W, Liu Y, et al. Apoptosis and myocardial infarction. *Basic Res Cardiol* 1998; 3: 8-12.
- Crow MT, Mani K, Nam YJ, et al. The mitochondrial death pathway and cardiac myocyte apoptosis. *Circ Res* 2004; 95: 957-970.
- Hochhauser E, Kivity S, Offen D, et al. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003; 284: H2351-H2359.
- Chen Z, Chua CC, Ho YS, et al. Overexpression of Bcl-2 attenuates apoptosis and protects against myocardial I/R injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001; 280: H2313-H2320.
- Mocanu MM, Baxter GF, Yellon DM. Caspase inhibition and limitation of myocardial infarct size: protection against lethal reperfusion injury. *Br J Pharmacol* 2000; 130: 197-200.
- Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994; 94: 1621-1628.
- Scarabelli TM, Knight RA, Rayment NB, et al. Quantitative assessment of cardiac myocyte apoptosis in tissue sections using the fluorescence-based TUNEL technique enhanced with counterstains. *J Immunol Meth* 1999; 228: 23-28.
- Hausenloy DJ, Duchon MR, Yellon DM. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening at reperfusion protects against ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2003; 60: 617-625.
- Haworth RA, Hunter DR. The Ca<sup>2+</sup>-induced membrane transition in mitochondria: II. Nature of the Ca<sup>2+</sup> trigger site. *Arch Biochem Biophys* 1979; 195: 460-467.
- Crompton M, Ellinger H, Costi A. Inhibition by cyclosporin A of a Ca<sup>2+</sup>-dependent pore in heart mitochondria activated by inorganic phosphate and oxidative stress. *Biochem J* 1988; 255: 357-360.
- Crompton M. The mitochondrial permeability transition pore and its role in cell death. *Biochem J* 1999; 341: 233-249.
- Crompton M, Costi A, Hayat L. Evidence for the presence of a reversible Ca<sup>2+</sup>-dependent pore activated by oxidative stress in heart mitochondria. *Biochem J* 1987; 245: 915-918.
- Kroemer G, Dallaporta B, Resche-Rigon M. The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu Rev Physiol* 1998; 60: 619-642.
- Green DR, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. *Science* 2004; 305: 626-629.
- Bernerdi P, Vassanelli S, Veronese P, et al. Modulation of the mitochondrial permeability transition pore-effect of protons and divalent cations. *Biol Chem* 1992; 267: 2934-2939.
- Halestrap AP. Calcium-dependent opening of a non-specific pore in the mitochondrial inner membrane is inhibited at pH values below 7 - implications for the protective effect of low pH against chemical and hypoxic cell damage. *Biochem J* 1991; 278: 715-719.
- Lenartowicz E, Bernardi P, Azzone GF. Phenylarsine oxide induces the cyclosporin-A-sensitive membrane permeability transition in rat liver mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 1991; 23: 679-688.
- Kim JS, Jin YG, Lemasters JJ. Reactive oxygen species, but not Ca<sup>2+</sup> overloading, trigger pH- and mitochondrial permeability transition-dependent death of adult rat myocytes after ischemia-reperfusion. *Am J Physiol, Heart Circ Physiol* 2006; 290: H2024-H2034.
- Halestrap AP, Woodfield KY, Connern CP. Oxidative stress, thiol reagents, and membrane potential modulate the mitochondrial permeability transition by affecting nucleotide binding to the adenine nucleotide translocase. *J Biol Chem* 1997; 272: 3346-3354.
- Novgorodov SA, Guduz TI, Jung DW, et al. The nonspecific

- inner membrane pore of liver mitochondria-modulation of cyclosporin sensitivity by ADP at carboxyatractyloside-sensitive and insensitive sites. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 180: 33-38.
30. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, et al. Loss of cyclophilin D reveals a critical role for the mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature* 2005; 434: 658-662.
31. Basso E, Fante L, Fowlkes J, et al. Properties of the permeability transition pore in mitochondria devoid of cyclophilin D. *J Biol Chem* 2005; 280: 18558-18561.
32. Halestrap AP, Davidson AM. Inhibition of Ca<sup>2+</sup>-induced large amplitude swelling of liver and heart mitochondria by cyclosporin A is probably caused by the inhibitor binding to mitochondrial matrix peptidyl-propyl cis-trans isomerase and preventing it interacting with the adenine nucleotide translocase. *Biochem J* 1990; 268: 153-160.
33. Kokoszka JE, Waymire KG, Levy SE, et al. The ADP / ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* 2004; 427: 461-465.
34. Leung AWC, Varanyuwatana P, Halestrap AP. The mitochondrial phosphate carrier interacts with cyclophilin D and may play a key role in the permeability transition. *J Biol Chem* 2008; 283: 26312-26323.
35. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74: 1124-1136.
36. Nazareth W, Yafei N, Crompton M. Inhibition of anoxia-induced injury in heart myocytes by cyclosporin A. *J Mol Cell Cardiol* 1991; 23: 1351-1354.
37. Griffiths EJ, Halestrap AP. Protection by cyclosporin A of ischemia/reperfusion-induced damage in isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1993; 25: 1461-1469.
38. Hausenloy D, Maddock H, Baxter G, et al. Inhibiting mitochondrial permeability transition pore opening: a new paradigm for myocardial preconditioning? *Cardiovasc Res* 2002; 55: 534-543.
39. Conzen PF, Fischer S, Detter C, et al. Sevoflurane provides greater protection of the myocardium than propofol in patients undergoing off-pump coronary artery bypass surgery. *Anesthesiology* 2003; 99: 826-833.
40. Piriou V, Chiari P, Gateau-Roesch O, et al. Desflurane - induced preconditioning alters calcium-induced mitochondrial permeability transition. *Anesthesiology* 2004; 100: 581-588.
41. He W, Zhang FJ, Wang SP, et al. Postconditioning of sevoflurane and propofol is associated with mitochondrial permeability transition pore. *J Zhejiang Univ Sci B* 2008; 9: 100-108.