

# Poscondicionamiento: un nuevo mecanismo protector. Su comparación con el preconditionamiento en el infarto experimental

MARTÍN DONATO<sup>†</sup>, VERÓNICA D'ANNUNZIO<sup>1</sup>, MELINA SABÁN<sup>2</sup>, LAURA FLOR, RICARDO J. GELPI<sup>3</sup>

## RESUMEN

Episodios breves de isquemia/reperusión realizados antes de una isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto (precondicionamiento isquémico, Pre-con). El presente trabajo se realizó con el objetivo de determinar si episodios breves de isquemia/reperusión realizados después de una isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto al igual que el preconditionamiento. Corazones aislados de conejo perfundidos según la técnica de Langendorff se sometieron a 30 minutos de isquemia y 30 minutos de reperusión (G1, n = 10). En el grupo 2 (G2, n = 8) se realizó un protocolo de Pre-con consistente en 5 minutos de isquemia y 5 minutos de reperusión, previo a 30 minutos de isquemia. En el grupo 3 (G3, n = 8) se realizaron 2 ciclos de 30 segundos de isquemia/reperusión luego de 30 minutos de isquemia (poscondicionamiento isquémico, Pos-con). Se evaluaron la presión desarrollada (PDVI mm Hg), la presión diastólica final (PDFVI mm Hg) y el tamaño de infarto con empleo de clorhidrato de tetrazolio.

En el G1 la PDVI alcanzó  $39,8 \pm 4,1$  mm Hg a los 30 minutos de la reperusión. En el G2 y el G3 los valores de PDVI, alcanzados a los 30 minutos de la reperusión, fueron de  $36,9 \pm 2,9$  mm Hg y  $37,6 \pm 4,5$  mm Hg, respectivamente.

La PDFVI aumentó en el G1 hasta  $48,2 \pm 4,5$  mm Hg, a los 30 minutos de la reperusión, en el G2 y el G3 la PDFVI alcanzó  $44,9 \pm 4,3$  mm Hg y  $66 \pm 12,5$  mm Hg, respectivamente. El área de infarto obtenido en el G1 fue de  $16,6 \pm 2,2\%$ . En el G2 y el G3 fue de  $5,1 \pm 1,8\%$  y  $4,2 \pm 1,5\%$ , respectivamente ( $p < 0,05$  versus grupo control).

El Pos-con reduce el tamaño de infarto en la misma magnitud que el Pre-con, sin modificar la disfunción ventricular postisquémica.

REV ARGENT CARDIOL 2004;72:258-262.

Recibido: 4/2004

Aceptado: 6/2004

Dirección para separatas:

Gelpi, Ricardo J. - Instituto de Fisiopatología Cardiovascular, Facultad de Medicina, Universidad de Buenos Aires. J. E. Uriburu 950 - Piso 2 (C1114AAD) Buenos Aires - Argentina.

Tel./Fax: 4962-4945

e-mail: rgelpi@fmed.uba.ar

## Palabras clave

> Infarto de miocardio - Protección miocárdica - Poscondicionamiento isquémico

## INTRODUCCIÓN

En 1986, Murry y colaboradores (1) describieron por primera vez el preconditionamiento isquémico como un fenómeno por el cual episodios breves de isquemia y reperusión realizados antes de una isquemia prolongada reducen el tamaño de infarto. Este mecanismo de protección endógena se ha descrito en numerosas especies, (2, 3) incluido el hombre. (4, 5) Sin embargo, su aplicación en el ámbito clínico se ve limitada ya que es necesario que la intervención se realice antes de que se produzca el episodio de isquemia. (6-8)

Así, Zhao y colaboradores (9) mostraron que 3 ciclos de 30 segundos de isquemia y reperusión luego de un período de isquemia prolongado reducen el tamaño de infarto y atenúan la disfunción endotelial en perros. Este "nuevo" mecanismo de protección denominado poscondicionamiento isquémico presenta un

grado de protección similar a la observada con el preconditionamiento isquémico. Además, recientemente, Kin y colaboradores (10) mostraron que el poscondicionamiento isquémico reduce el tamaño de infarto en la rata. Sin embargo, la magnitud de la protección alcanzada en esta especie fue menor que la obtenida con el preconditionamiento isquémico.

El mecanismo por el cual el poscondicionamiento reduce el tamaño de infarto es poco conocido. En este sentido, existe evidencia experimental que demuestra una atenuación de la producción de radicales libres derivados del oxígeno en los primeros minutos de la reperusión. (9, 10)

Sin embargo, estos estudios (9, 10) utilizaron isquemia regional y especies con gran producción de radicales libres. (11) Además, en este tipo de modelos experimentales existen variaciones en los parámetros hemodinámicos, en el flujo colateral y en el tamaño del área de riesgo, con lo cual se dificulta la evalua-

ción de la función ventricular y del tamaño de infarto. (12) Por lo tanto, sería de relevancia demostrar la existencia de este mecanismo de protección y compararlo con el preconditionamiento isquémico en un modelo experimental con control estricto de variables y en una especie cuyo corazón tenga mayores similitudes con el humano en lo que respecta a la circulación colateral y al mecanismo de producción de radicales libres. (13)

Así, el objetivo del siguiente estudio fue determinar, en un modelo con isquemia global, si episodios breves de isquemia y reperfusión realizados inmediatamente después de un episodio de isquemia prolongada (poscondicionamiento isquémico) reducen el tamaño de infarto en la misma magnitud que el preconditionamiento isquémico.

**MATERIAL Y MÉTODOS**

**Modelo experimental**

Se utilizaron conejos neocelandeses hembras, los cuales pesaban 1,8 a 2 kg. Los animales fueron anestesiados por vía subcutánea con una mezcla de ketamina (75 mg/kg) y xylazina (0,75 mg/kg). Luego de la inducción anestésica se les administró tiopental sódico (35 mg/kg) por vía endovenosa y se realizó rápidamente una toracotomía lateral izquierda, se aisló la arteria aorta, se colocó una cánula en dicha arteria y se fijó con hilo de lino. A través de esta vía se introdujo solución de Krebs-Henseleit heparinizada para eliminar la sangre de todo el árbol coronario; inmediatamente se extrajo el corazón del animal. Estas maniobras se realizaron en un tiempo no mayor de 60 segundos para evitar el deterioro del preparado por isquemia.

Una vez extraído, el corazón se colocó, por intermedio de la cánula, en un sistema de perfusión según la técnica de Langendorff modificada y se perfundió con solución de Krebs-Henseleit, compuesta como sigue: NaCl 118,5 mmol/L, KCl 4,7 mmol/L, NaHCO<sub>3</sub> 24,8 mmol/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L, MgSO<sub>4</sub> 1,2 mmol/L, CaCl 2,5 mmol/L y dextrosa 10 mmol/L; esta solución se termostatóizó a 37°C y equilibró con una mezcla de 95% O<sub>2</sub>-5% CO<sub>2</sub>, para obtener un pH de 7,45 ± 0,02.

**Análisis de datos**

En el ventrículo izquierdo se colocó un balón de látex atado a uno de los extremos de un tubo rígido de polietileno, pasándolo por el anillo mitral a través de un ojal practicado en la orejuela izquierda. El otro extremo del tubo se conectó a un transductor de presión Deltram II (Utah Medical System), lo cual permitió medir la presión en el interior del ventrículo izquierdo (PVI). La presión intraventricular izquierda se registró en tiempo real en una computadora PC 486 provista con plaqueta convertora analógica-digital. El flujo coronario, controlado con una bomba peristáltica (APEMA, modelo BS5), se reguló para conseguir una PPC de 80 mm Hg, para luego mantenerlo constante. El efluente proveniente de las venas de Tebesio se drenó mediante un delgado tubo de polietileno que atravesaba la pared libre ventricular.

Se suturaron dos electrodos de un marcapaso (QRS Ingeniería Médica) a la aurícula derecha para estimular al corazón y así mantener la frecuencia cardíaca constante durante todo el experimento, en un valor de 175 latidos/minuto. El preparado así obtenido se dejó estabilizar durante 20 minutos antes de comenzar su estudio; de este modo es posible mantenerlo estable durante aproximadamente dos horas.

El componente sistólico (estado contráctil) se evaluó a través de la presión desarrollada ventricular izquierda, la

cual se obtiene restando la presión diastólica final (PDFVI) a la presión sistólica pico. En el estudio de la función diastólica se consideró la rigidez miocárdica (componente pasivo). Las propiedades pasivas del miocardio pueden analizarse graficando la relación entre la presión ventricular diastólica y el volumen. A partir de esta relación, el concepto de rigidez ventricular se define como el cambio en la presión diastólica necesario para incrementar una unidad de volumen (dP/dV). Dado que en el modelo experimental utilizado no existen cambios en el volumen intraventricular ni en las propiedades intrínsecas de la pared ventricular, las variaciones en el valor de la PDFVI son un índice de rigidez miocárdica.

**Medición del tamaño de infarto**

Después de finalizada la evaluación de la función ventricular, los corazones se cortaron en secciones de 2 mm de espesor desde la punta hasta la base. Los cortes se incubaron en una solución al 1% de cloruro de 2,3,5-trifeniltetrazolio (Sigma Chemical Co), a pH 7,8 y a 37°C, durante 10 minutos. Con esta técnica, el tejido viable se tiñe de color rojo mientras que la zona no teñida corresponde al área de infarto. En el corazón aislado, sometido a isquemia global, no es necesario estimar la incidencia del flujo colateral ni definir el área de riesgo con partículas fluorescentes ya que la misma corresponde al tejido miocárdico total. Posteriormente, las secciones se calcularon en hojas de acetato y el área de la pared ventricular y las áreas infartadas se midieron utilizando planimetría computarizada (Analizador de imágenes: Image Pro Plusá, versión 3.0). El tamaño de infarto se expresó como porcentaje del área del ventrículo izquierdo.

**Protocolo experimental**

Se conformaron tres grupos experimentales (Figura 1):

Grupo 1 (n = 10): se realizó una isquemia global de 30 minutos seguida de un período de reperfusión de 30 minutos. La isquemia se provocó mediante disminución brusca del flujo aportado por la bomba de perfusión.

Grupo 2 (n = 8): se realizó un protocolo de preconditionamiento isquémico que consistió en 5 minutos de isquemia seguidos de 5 minutos de reperfusión, previos a 30 minutos de isquemia global. Luego se reperfundió durante 30 minutos.

Grupo 3 (n = 8): se realizó un protocolo que consistió en 2 ciclos de 30 segundos de isquemia y reperfusión inmediatamente después de 30 minutos de isquemia global (Pos-con). Luego se reperfundió durante 30 minutos.

**Análisis estadístico**

Los resultados se expresaron como la media ± error estándar (EE) y los datos se analizaron por análisis de varianza segui-

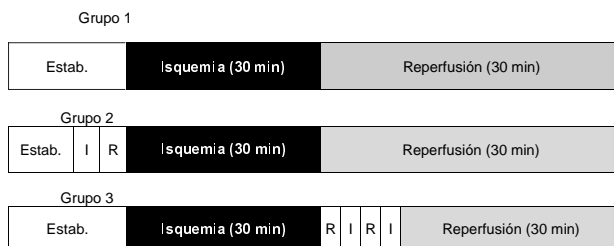


Fig. 1. Esquema de los protocolos experimentales realizados. I: Isquemia; R: Reperfusión. En el protocolo de preconditionamiento isquémico, los episodios breves de isquemia/reperfusión fueron de 5 minutos. En el protocolo de poscondicionamiento, los ciclos de isquemia/reperfusión tuvieron una duración de 30 segundos.

do por la prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se consideró una diferencia significativa cuando el valor de p fue menor de 0,05.

**RESULTADOS**

En la Figura 2 pueden observarse los valores de la PDVI (panel superior) y de la PDFVI (panel inferior) expresados como porcentaje del valor basal en el grupo control, en el grupo con preconditionamiento isquémico y en el grupo con poscondicionamiento isquémico.

En el grupo control, la presión desarrollada alcanzó un valor de  $39,8 \pm 4,1$  mm Hg a los 30 minutos de la reperfusión. Cuando se realizó un protocolo de preconditionamiento isquémico, el valor de la presión desarrollada, a los 30 minutos de la reperfusión, fue de  $36,9 \pm 2,9$  mm Hg. Por último, al realizar un protocolo de poscondicionamiento isquémico, la presión desarrollada, a los 30 minutos de la reperfusión, fue de  $37,6 \pm 4,5$  mm Hg.

La presión diastólica final, en el grupo control, aumentó hasta  $48,2 \pm 4,5$  mm Hg, a los 30 minutos de la reperfusión. Al realizar un protocolo de preconditionamiento isquémico, la presión diastólica final alcanzó  $44,9 \pm 4,3$  mm Hg en el mismo período. En el grupo de corazones sometidos a un protocolo de poscondicionamiento isquémico, la presión diastólica

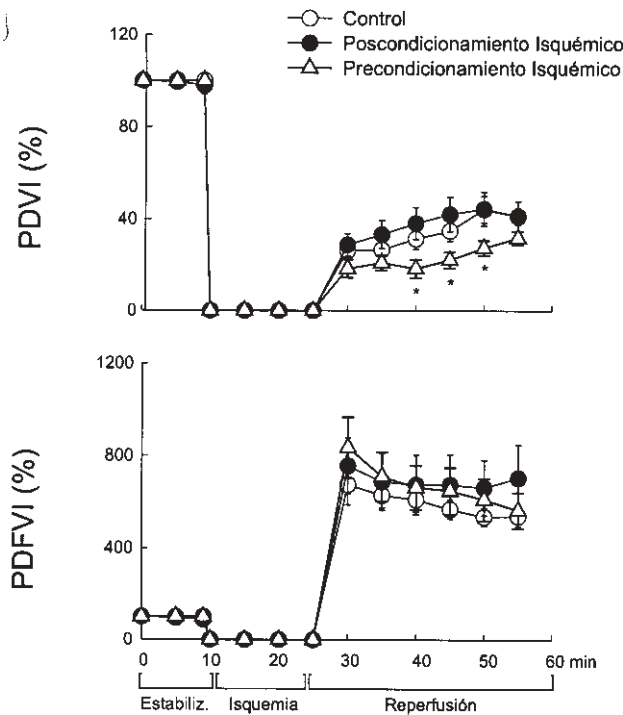


Fig. 2. Se observan los cambios en la presión desarrollada del ventrículo izquierdo, PDVI (panel superior) y en la presión diastólica final del ventrículo izquierdo, PDFVI (panel inferior) durante la estabilización, el período de isquemia y a los 30 minutos de la reperfusión.

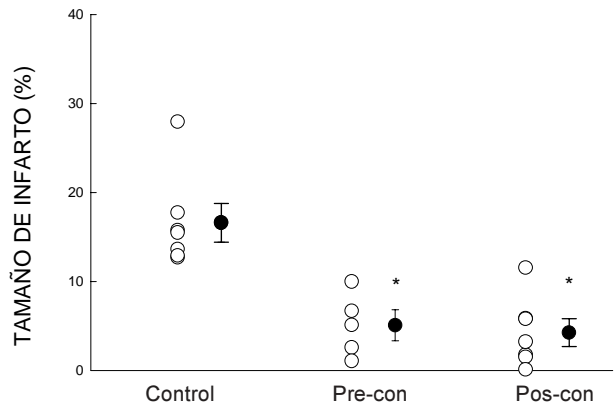


Fig. 3. Se observa el tamaño de infarto, expresado como porcentaje del área del ventrículo izquierdo, en los 3 grupos estudiados. ○ Experimentos individuales. ● Media ± error estándar. \*: p < 0,05 versus grupo control. Pre-con: Precondicionamiento isquémico. Pos-con: Poscondicionamiento isquémico.

final alcanzó, a los 30 minutos del mencionado período,  $66,8 \pm 12,6$  mm Hg.

De esta manera, ni el preconditionamiento isquémico ni el poscondicionamiento isquémico atenuaron la disfunción ventricular posisquémica, producto de 30 minutos de isquemia global.

En la Figura 3 se muestra el tamaño de infarto, expresado como porcentaje del área total del ventrículo izquierdo, en los tres grupos estudiados: control, preconditionamiento isquémico y poscondicionamiento isquémico. Los corazones sometidos a 30 minutos de isquemia global tuvieron el  $16,6\% \pm 2,2\%$  de infarto. En los grupos sometidos a preconditionamiento isquémico y poscondicionamiento isquémico, el tamaño de infarto fue del  $5,1\% \pm 1,8\%$  y  $4,2\% \pm 1,6\%$ , respectivamente (p < 0,05 versus grupo control).

**DISCUSIÓN**

En nuestro trabajo demostramos que un protocolo de dos ciclos de 30 segundos de isquemia y reperfusión realizados inmediatamente después de una isquemia prolongada reduce significativamente el tamaño de infarto sin atenuar la disfunción posisquémica. Este efecto protector fue de la misma magnitud que el alcanzado con el preconditionamiento isquémico.

En relación con esto, algunos trabajos (14, 15) mostraron que es posible proteger al corazón realizando intervenciones durante la reperfusión. Zhao y colaboradores (9) demostraron que 3 ciclos de 30 segundos de isquemia y reperfusión realizados en forma posterior a una isquemia regional de 60 minutos disminuye el 40% el tamaño de infarto y atenúa la disfunción endotelial en un modelo de perro con el tórax abierto e instrumentado. De la misma manera, Kin y colaboradores (10) mostraron que el poscondicionamiento isquémico provoca una reducción en el tamaño de infarto, en ratas sometidas a 30 minutos de isquemia regional, sólo si el

protocolo se realiza inmediatamente luego del período de isquemia. En este estudio, la disminución en el tamaño de infarto alcanzada con el preconditionamiento fue significativamente mayor que la observada con el poscondicionamiento isquémico. Nuestro trabajo extiende los hallazgos encontrados por estos autores (9, 10) en algunos aspectos importantes.

Los estudios mencionados usaron un modelo de isquemia regional, donde el estado contráctil puede estar influido por la presencia de circulación colateral. Además, en este tipo de modelos experimentales, la función sistólica se modifica por las variaciones en la precarga y poscarga. Otro concepto para tener en cuenta es que los cambios en las condiciones de carga del corazón disminuyen el consumo de oxígeno y por lo tanto mejoran la relación aporte/demanda durante la isquemia. Al utilizar, en nuestro trabajo, un modelo de corazón aislado e isovolumico con isquemia global y flujo coronario constante eliminamos las influencias mencionadas.

Además, estos trabajos (9, 10) se realizaron en especies que presentan diferencias importantes con el corazón de conejo, como la concentración de xantina oxidasa y la mayor circulación colateral. El conejo, al tener una circulación colateral reducida y ausencia de la enzima xantina oxidasa, representa una especie muy similar al ser humano y esto resulta importante al estudiar los mecanismos de protección miocárdica.

Si bien nuestro estudio no se diseñó para describir los mecanismos involucrados en el poscondicionamiento isquémico, podemos hacer algunas especulaciones al respecto.

Zhao y colaboradores (9) mostraron una disminución de la producción de radicales libres durante la reperfusión, en perros sometidos a un protocolo de poscondicionamiento isquémico. Esto se evidenció al evaluar la concentración de malonildialdehído (MDA) durante la reperfusión. De la misma manera, Kin y colaboradores (10) demostraron una producción menor de estas especies reactivas en un modelo de rata con isquemia regional. En nuestro modelo experimental utilizamos solución de Krebs-Henseleit para perfundir los corazones; este perfusato no contiene neutrófilos que puedan producir radicales libres. Por otro lado, la producción de estas moléculas por parte de las células endoteliales y de los miocitos es escasa. Además, al utilizar una especie como el conejo, que al igual que el ser humano no posee la enzima xantina oxidasa, la participación de estos metabolitos, en este modelo experimental, es casi inexistente.

Una posible hipótesis que explique el mecanismo del poscondicionamiento isquémico podría ser la activación de los receptores de adenosina. Así, Xu y colaboradores (16) demostraron que al administrar AMP 579, un agonista  $A_1$  y  $A_2$  de los receptores de adenosina, durante la reperfusión, el tamaño de infarto disminuye significativamente. En el mismo sentido, Budde y colaboradores (17) mostraron que la administración

de adenosina durante la reperfusión disminuye el tamaño de infarto en perros luego de 60 minutos de isquemia. Este efecto sólo estuvo presente si la droga se administraba por un período prolongado. De esta manera, podría existir una relación entre el poscondicionamiento isquémico y la activación de los receptores de adenosina. Previamente demostramos (18) que la adenosina administrada desde el inicio de la reperfusión atenúa la disfunción ventricular posisquémica a través de la activación de los receptores  $A_1$  purinérgicos en un modelo de isquemia global en conejos. Sin embargo, en ese estudio utilizamos un tiempo corto de isquemia global (15 minutos), por lo que los hallazgos no pueden extrapolarse directamente al presente trabajo.

En resumen, en un modelo con isquemia global y control estricto de variables, el poscondicionamiento isquémico reduce el tamaño de infarto en la misma magnitud que el preconditionamiento isquémico, sin atenuar la disfunción ventricular posisquémica. Este "nuevo" mecanismo fisiológico de protección deberá estudiarse en detalle para dilucidar su mecanismo intrínseco, ya que podría tener extrapolación al ámbito clínico, particularmente en aquellos pacientes sometidos a angioplastia primaria.

## SUMMARY

### Post-conditioning: A novel mechanism of protection. A comparison with preconditioning in experimental infarction

Brief ischemia/reperfusion periods performed before a prolonged ischemia decreases infarct size (Ischemic preconditioning, Pre-con). Our aim was to determine if brief ischemia/reperfusion episodes performed immediately after prolonged ischemia decreased infarct size in the same manner as Pre-con. Isolated and isovolumic rabbit hearts were perfused according to Langendorff technique and underwent 30 minutes of global ischemia and 30 minutes of reperfusion (G1, n = 10). In group 2 (G2, n = 8) we performed 5 minutes of ischemia/reperfusion before 30 minutes of global ischemia. In Group 3 (G3, n = 8) we performed two 30 second cycles of ischemia/reperfusion immediately after 30 minutes of ischemia (Ischemic post-conditioning, Pos-con). We evaluated left ventricular developed pressure (LVDP mmHg), left ventricular end diastolic pressure (LVEDP mmHg) and infarct size with triphenyl tetrazolium chloride.

In the control group, LVDP reached  $39.8 \pm 4.1$  mmHg at 30 minutes of reperfusion. In Pre-con and Pos-con groups, LVDP values at 30 minutes of reperfusion were  $36.9 \pm 2.9$  mmHg and  $37.6 \pm 4.5$  mmHg, respectively.

LVEDP increased in G1 up to  $48.2 \pm 4.5$  mmHg, at 30 minutes of reperfusion. In G2 and G3 LVEDP values were  $44.9 \pm 4.3$  mmHg and  $66. \pm 12.5$  mmHg, respectively. Infarct size in G1 was  $16.6 \pm 2.2\%$  and in G2 and G3 were  $5.1 \pm 1.8\%$  and  $4.2 \pm 1.5\%$ , respectively ( $p < 0.05$  vs. Control group).

Pos-con reduced infarct size in the same magnitude that Pre-con, without modifying post ischemic ventricular dysfunction.

**Key words:** Myocardial infarction - Myocardial protection - Ischemic post-conditioning

**BIBLIOGRAFÍA**

1. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986;74:1124-36.
2. Cave AC, Horowitz GL, Apstein CS. Can ischemic preconditioning protect against hypoxia-induced damage? Studies of contractile function in isolated perfused rat hearts. *J Mol Cell Cardiol* 1994; 26:1471-86.
3. Ytrehus K, Liu Y, Downey JM. Preconditioning protects ischemic rabbit heart by protein kinase C activation. *Am J Physiol* 1994; 266:H1145-52.
4. Deutsch E, Berger M, Kussmaul WG, Hirshfeld JW Jr, Herrmann HC, Laskey WK. Adaptation to ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty. Clinical, hemodynamic, and metabolic features. *Circulation* 1990;82:2044-51.
5. Yellon DM, Alkhalafi AM, Pugsley WB. Preconditioning the human myocardium. *Lancet* 1993;342:276-7.
6. Doval H. Precondicionamiento: ¿Es un mecanismo fisiopatológico clínicamente relevante? *Rev Argent Cardiol* 2004;72:84-7.
7. Giorgi M, Schygiel P, Suárez G, Sökn F, Ahuad Guerrero RA, Tronge J. Síndrome de preconditionamiento isquémico en el anciano. Efectos de la angina o equivalentes en las 24 horas previas a un infarto agudo de miocardio. *Rev Argent Cardiol* 2003;71:149 (abstract).
8. Del Valle HF, Lascano EC, Negroni JA. Diferente mecanismo de cardioprotección por preconditionamiento temprano y tardío contra las arritmias hipertróficas y diabéticas. *Rev Argent Cardiol* 2003;71:109 (abstract).
9. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic preconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-88.
10. Kin H, Zhao ZQ, Sun HY, Wang NP, Corvera JS, Halkos ME, et al. Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res* 2004;62:74-85.
11. Downey JM, Hearse DJ, Yellon DM. The role of xanthine oxidase during myocardial ischemia in several species including man. *J Mol Cell Cardiol* 1988;202:55-63.
12. Verdouw PD, van den Doel MA, de Zeeuw S, Duncker DJ. Animal models in the study of myocardial ischaemia and ischaemic syndromes. *Cardiovasc Res* 1998;39:121-35.
13. Downey JM, Miura T, Eddy LJ, Chambers DE, Mellert T, Hearse DJ, et al. Xanthine oxidase is not a source of free radicals in the ischemic rabbit heart. *J Mol Cell Cardiol* 1987;19:1053-60.
14. Xu Z, Yang XM, Cohen MV, Neumann T, Heusch G, Downey JM. Limitation of infarct size in rabbit hearts by the novel adenosine receptor agonist AMP 579 administered at reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 2000;32:2339-47.
15. Norton ED, Jackson EK, Turner MB, Virmani R, Forman MB. The effects of intravenous infusions of selective adenosine A1-receptor and A2-receptor agonists on myocardial reperfusion injury. *Am Heart J* 1992;123:332-8.
16. Xu Z, Downey JM, Cohen MV. Timing and duration of administration are crucial for antiinfarct effect of AMP 579 infused at reperfusion in rabbit heart. *Heart Dis* 2003;5:368-71.
17. Budde JM, Morris CD, Velez DA, Muraki S, Wang NP, Guyton RA, et al. Reduction of infarct size and preservation of endothelial function by multidose intravenous adenosine during extended reperfusion. *J Surg Res* 2004;116:104-15.
18. Donato M, Morales M, Bagnarelli A, Scapin O, Gelpi RJ. Exogenous adenosine and postischemic dysfunction in the isolated rabbit heart. *Medicina* 1999;59:339-47.