

## SECCION DE MEDICINA EXPERIMENTAL

## EFECTOS DEL PEPTIDO NATRIURETICO ATRIAL (PNA) EN LA ISQUEMIA AGUDA Y REPERFUSION MIOCARDICA EN EL PERRO: SU IMPACTO EN EL CAMPO DE LOS RADICALES LIBRES DE OXIGENO

1, 2, 3 Dr. Ariosto Rosado  
 3 Dr. Rafael D. Hernández  
 1, 3 Dra. Angela Halls  
 1, 3 Dr. Humberto Bencosme

1, 3 Dra. María García  
 1, 3 Dr. Robert Tejada  
 1, 3 Dr. Miguel R. Ureña  
 1, 3 Dr. Sergio A. Bencosme

## RESUMEN:

Se ha demostrado *in vitro*<sup>17</sup> que las arritmias de reperfusión son prevenibles con una perfusión de PNA, y reportado *in vivo*<sup>8</sup> que se produce un aumento en la concentración de radicales libres de oxígeno durante la isquemia cardiaca y más aun durante la reperfusión, particularmente en los casos con fibrilación ventricular.<sup>5</sup>

Por otra parte, se ha visto<sup>11</sup> que el PNA tiene un efecto citoprotector frente a las alteraciones celulares inducidas por los radicales libres de oxígeno en los hepatocitos en cultivos. Para establecer si el PNA tiene un potencial terapéutico sobre los cambios isquémicos y las alteraciones del ritmo en el miocardio, se usó un modelo canino de isquemia y reperfusión administrándole un bolus de PNA en forma de Extracto Crudo de Tejido Atrial (ECTA) previo a la ligadura de la arteria coronaria. El PNA demostró tener un efecto protector tanto contra los cambios isquémicos como los del ritmo. Estas observaciones sugieren un potencial terapéutico en el manejo de las enfermedades isquémicas del miocardio. Por su importancia actual y futura, se amplía en la discusión acerca de las implicaciones de los radicales libres de oxígeno en función de la nueva visión que se tiene del PNA en este campo.

Péptido Natriurético Atrial Arritmia de Reperfusión Isquemia Radicales Libres de Oxígeno

## ABSTRACT:

It has been demonstrated *in vitro*<sup>17</sup> that reperfusion arrhythmias can be prevented with a perfusion of PNA, and reported *in vivo*<sup>8</sup> that there is an increase in the concentration of oxygen free radicals during cardiac ischemia and more so during reperfusion, particularly in cases with ventricular fibrillation.<sup>5</sup> It has also been shown<sup>11</sup> that PNA has a cytoprotective effect against cellular induced alterations by the oxygen free radicals in cell culture of hepatocytes. To determine if PNA has a therapeutic potential against ischemic changes and alterations of the rhythm in the myocardium a canine model of ischemia and reperfusion was used in which a bolus of PNA in the form of a crude extract of atrial tissue (ECTA) was given before ligating the coronary artery. PNA proved to have a protective effect for both ischemic changes and alterations of the rhythm. These observations suggests a therapeutic potential in the management of myocardial ischemic diseases. Because of its present and future importance, the discussion enlarges upon the implications of oxygen free radicals in terms of the new vista about the PNA in this field.

Atrial Natriuretic Peptide Reperfusion Arrhythmias Ischemia Oxygen Free Radicals

## INTRODUCCION

Al descubrir el Dr. Adolfo de Bold en el 1981 que el corazón producía una hormona, el Péptido Natriurético

1. Centro de Biología Humana y Experimental. Centro de Investigación, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, R.D.
2. Area de Ciencias Fisiológicas, Departamento de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Pontificia Universidad Católica Madre y Maestra, Santiago, R.D.
3. Departamento de Investigaciones Clínicas, Hospital Regional Universitario José María Cabral y Báez, Santiago, R.D.

Atrial (PNA),<sup>1,2</sup> abrió una cantera de nuevos conocimientos, al probarse en esta década que esta hormona participa activamente en una gran variedad de fenómenos biológicos de importancia en la clínica médica.<sup>3</sup>

En una publicación anterior de esta revista reportamos que el PNA, en forma de extracto crudo de tejido atrial (ECTA), tiene un efecto preventivo y supresivo sobre las arritmias cardiacas inducidas por acepromazina en la rata; ese trabajo enfatiza la actividad moduladora del PNA en la recién descubierta función endocrina y autocrina del sistema de conducción.<sup>4</sup>

Investigaciones en el campo de los radicales libres de oxígeno resaltan la íntima relación entre las lesiones provocadas por alteraciones en la oxigenación celular y la generación de metabolitos reducidos de oxígeno, tales como el

radical superóxido ( $O_2^{--}$ ), peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y radical hidróxilo altamente reactivo ( $OH\cdot$ ).<sup>5,6</sup> Las investigaciones del importante papel patogénico de estos metabolitos en diversos procesos como la isquemia y reperfusión cardíaca<sup>7,8</sup> y en el fallo renal isquémico agudo,<sup>9</sup> entre otros, sirven de guía y esperanza para mejorar el entendimiento y manejo terapéutico de estas enfermedades de tan alta mortalidad.

Como consecuencia, se han desarrollado múltiples abordajes terapéuticos para proteger y tratar aquellas lesiones producidas por la generación de radicales libres de oxígeno, y así evitar y reparar el daño tisular que ellos inducen.<sup>5-10</sup>

Utilizando hepatocitos en cultivos, se ha reportado recientemente que el PNA tiene una acción citoprotectora frente a las lesiones inducidas por hipoxia severa seguida de reoxigenación al igual que las ocurridas por contacto con el oxígeno reactivo.<sup>11</sup> Esta situación justifica especular que los efectos beneficiosos observados al usar altas concentraciones de PNA en el fallo renal in vivo<sup>12,13</sup> e in vitro<sup>12</sup> posiblemente resulten de un efecto citoprotector como el descrito para los hepatocitos.

El presente trabajo explora si los cambios isquémicos y del ritmo inducidos en el miocardio por oclusión aguda de la arteria coronaria descendente anterior durante la isquemia y la reperfusión puedan ser beneficiosamente modificados por el PNA y mejor entendidos a la luz de lo ya sabido sobre el papel etiopatogénico de los radicales libres de oxígeno en estos cambios.<sup>7,8,10</sup> De ser positivo, este estudio serviría para facilitar nuevos protocolos de investigación en aquellos campos de la clínica y la patología de los radicales libres de oxígeno, donde el PNA tendría un potencial terapéutico.

## MATERIALES Y METODO

### A. PREPARACION DEL PNA: EXTRACTO CRUDO DE TEJIDO ATRIAL (ECTA) DEL PERRO

Se utilizaron perros anestesiados con tiopental sódico (Nesdonal, Ch. de Mondeserat, C x A.; Specia, París, France) 20mg/Kg vía endovenosa (ev) los cuales fueron sacrificados con 2ml de KCl ev (Kalium Chlorides, 20 mmolK-/20 mmolCl-/10 mlH<sub>2</sub>O, Hausmann Laboratories Inc.; St. Gallen, Sweitzerland). Se les extrajo rápidamente el corazón, colocándolo de inmediato en un beaker de vidrio con solución salina 0.9% helada. Los atrios fueron disecados, secados rápidamente con papel de filtro, pesados y luego hervidos por 10 min en solución salina 0.9%, con una relación de 5ml por cada gramo de tejido atrial. El tejido se maceró en la solución salina remanente en un mortero de porcelana, se homogenizó y luego se centrifugó a 2500 rpm por 10 min. Al sobrenadante se le removió la capa superficial de grasa. Este extracto se hirvió de nuevo para llevarlo a una concentración de 0.5G de tejido atrial por ml de

la solución. El ECTA así preparado puede utilizarse de inmediato o almacenarse a  $-20^{\circ}C$  para uso posterior. El contenido exacto de PNA en nuestros extractos sólo podrá obtenerse a partir de la medición del PNA mediante radioinmunoensayo. Por conveniencia técnica usaremos aquí los términos ECTA y PNA indistintamente.

Para la preparación del vehículo control se tomaron 25ml de solución salina 0.9% y se hirvió hasta reducir el volumen a 10ml al igual que el ECTA.

### B. PREPARACION EXPERIMENTAL GENERAL

Se usaron perros "mestizos" de 8.6-19.5kg, ocho hembras y siete machos, anestesiados con tiopental sódico 20mg/kg vía ev, se colocó tubo endotraqueal para suplir ventilación con un respirador mecánico. Se cateterizó la vena femoral para infusión de líquidos y drogas. Se hizo una toracotomía izquierda seguida de exposición y disección de la arteria coronaria descendente anterior (ACDA).

Se inició monitoreo electrocardiográfico permanente utilizando un fisiógrafo de la Narco Bio-System conectado a un osciloscopio. Luego de un período de estabilización de 10min, se tomó un registro del ECG basal, que incluye las derivaciones bipolares y aumentadas de miembros, inmediatamente antes de iniciar el experimento según se describe en el Protocolo Experimental. Cada vez que las condiciones experimentales cambiaban, siguiendo el protocolo, se tomaba de nuevo un registro del ECG para fines de control.

Para establecer la presencia de isquemia y arritmia y evaluar los resultados electrocardiográficos de éstos, los cambios isquémicos se clasificaron como: leves, alteraciones de la onda T; moderados, alteraciones del segmento ST; severos, alteraciones del complejo QRS. Las arritmias se clasificaron como: leves, las que presentaban extrasístoles ventriculares aisladas; moderadas, las que presentaban extrasístoles ventriculares frecuentes incluyendo trigeminismo, bigeminismo y parejas de extrasístoles; severas, las que presentaban taquicardia ventricular (sostenida y no sostenida), flutter ventricular o fibrilación ventricular. Como se nota, esta clasificación permite identificar simultáneamente cambios isquémicos y del ritmo, excepto, naturalmente, cuando haya taquicardias ventriculares sostenidas y no sostenidas mayor de 5seg de duración, flutter o fibrilación ventricular.

Concluido el experimento, los atrios de estos perros fueron utilizados para obtener el ECTA como descrito en el acápite A de Material y Método.

### C. PROTOCOLO EXPERIMENTAL

GRUPO 1. Efecto del vehículo control sobre los cambios isquémicos y del ritmo inducidos por la ligadura de la ACDA y reperfusión.

A ocho perros se les administró 0.6ml del vehículo control por Kg de peso en 45 seg; luego de 2min se ligó la ACDA dejándose evolucionar durante 15min. A seguidas,

la ligadura fue retirada dejándose evolucionar durante 15 min más.

**GRUPO 2.** Efecto del PNA sobre los cambios isquémicos y del ritmo inducidos por la ligadura de la ACDA y reperfusión.

En este experimento se utilizaron siete perros a los que se les administró un bolus de PNA conteniendo el equivalente a 0.3G de tejido atrial por Kg de peso en 45 seg; luego de 2min se repite el procedimiento anteriormente descrito en el acápite 1 de este protocolo experimental.

## RESULTADOS

**GRUPO 1.** Efectos del vehículo control sobre los cambios isquémicos y del ritmo inducidos por la ligadura de la ACDA y reperfusión.

Los resultados de este grupo sirven de control para los del grupo 2 y están expresados para cada animal; en la figura 1A para los cambios isquémicos y en la figura 1B para los cambios del ritmo.

### CAMBIOS ISQUEMICOS

Durante los primeros 2.15 min después de la ligadura de la ACDA, todos los animales, excepto el 8, mostraron diversos grados de cambios isquémicos. En los 12.85 min subsiguientes todos los animales exhibieron cambios isquémicos, manteniéndose el mismo grado en 3 e incrementándose en 4 de 7 casos. El caso 8 desarrolló cambios isquémicos leves después de los 2.15min. Durante todo el período de reperfusión sólo fue posible valorar los cambios isquémicos en los animales 3 y 4, ya que en los demás la presencia de fibrilación ventricular no permitía evaluar con precisión los cambios isquémicos.

### TRASTORNOS DEL RITMO

Estos aparecieron durante los primeros 2.15min después de ligar la ACDA en 3 de 8 casos; un caso presentó arritmia ventricular severa que cesó espontáneamente y los otros dos presentaron arritmias moderadas. Durante los 12.85min subsiguientes se presentaron arritmias variadas en 5 de 8 casos. Durante el período de reperfusión hubo 6 de 8 casos con arritmia ventricular severa que pasó a un ritmo agonal entre 2 y 3 min. Se continuó la monitorización hasta completar los 15 min sin presentarse cambios del ritmo en ningún caso.

**GRUPO 2.** Efectos del PNA sobre los cambios isquémicos y del ritmo inducidos por la ligadura de la ACDA y la reperfusión.

### CAMBIOS ISQUEMICOS

Todos fueron leves y aparecieron en 3 de 7 casos (figura 1C) durante los primeros 2.15min después de la

ligadura. En los 12.85min subsiguientes aparecieron cambios isquémicos leves en todos los casos, persistiendo todo ese tiempo en sólo 3 de los 7 animales. Durante la reperfusión, 4 casos prosiguieron desde la fase de ligadura y desaparecieron espontáneamente antes de los 8 min. Los otros 3 casos continuaron hasta poco después de la reperfusión. En relación con los casos controles es evidente el retardo en la aparición y reducción del grado de los cambios isquémicos.

### TRASTORNOS DEL RITMO

Estos aparecieron únicamente en los animales 1 y 7. En el 1er. caso hubo arritmia leve durante la oclusión de la ACDA por un período total de 3min 5seg; en el animal 8 hubo arritmia de grado moderado que duró 15seg. En ambas situaciones hubo normalización espontánea y persistente de los trastornos del ritmo, condición que se mantuvo aun durante el período de reperfusión.

## DISCUSION

El presente trabajo muestra que el ECTA canino tiene un efecto atenuador sobre las alteraciones electrocardiográficas inducidas por la ligadura de la ACDA en el perro. Este efecto es visible para los cambios isquémicos durante la ligadura y la reperfusión, y más evidente aún, en relación directa a la aparición y severidad de las arritmias, tanto durante los períodos de isquemia como de reperfusión.

En función de nuestros resultados surgen las interrogantes: ¿Actúa el efecto atenuador del PNA sobre los daños miocárdicos de la isquemia y la reperfusión modificando los factores patogénicos asociados a la generación de radicales libres de oxígeno, fenómeno reconocido hoy día como propio de la isquemia cardiaca? ¿Podría considerarse a esta hormona como una sustancia antirradicales libres a la vez que usarse terapéuticamente como tal?

Evidentemente, este trabajo no aporta datos originales en cuanto al aspecto de radicales libres que permitan contestar estas preguntas de modo categórico. Sin embargo, las observaciones aquí presentadas son de interés y valor para las investigaciones que relacionan la patología de los radicales libres con las posibles funciones del PNA en el metabolismo del oxígeno. Por ello nos permitimos discutir, de modo más extenso y didáctico de lo que nuestros resultados y la naturaleza de este artículo en primer plano justifican.

En una célula aeróbica normal, el oxígeno sufre una reducción tetravalente al aceptar cuatro electrones para formar agua. Durante este proceso se forma el radical superóxido ( $O_2^-$ ), el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y el radical hidróxilo ( $OH\cdot$ ) altamente reactivo. Este proceso ocurre normalmente en la mitocondria donde el sistema citocromo-oxidasa acopla la producción de ATP a esta reducción tetravalente de  $O_2$ . Los metabolitos intermedios parcialmente reducidos del  $O_2$  están unidos fuertemente



a los sitios activos del sistema enzimático responsable de este proceso, por lo que normalmente no representan ningún peligro para la célula. Además, en caso de escape de radicales libres hacia el citosol, existen mecanismos protectores endógenos como son las enzimas superóxido dismutasa, catalasa, y glutatión peroxidasa y antioxidantes como el  $\alpha$ -tocoferol. Sólo hay peligro si la capacidad protectora de estos sistemas endógenos es sobrepasada.

La isquemia e hipoxia producen alteraciones celulares graves, pero más importante aún es que sirven de escenario para el desarrollo de cambios más dramáticos que ocurren al incrementarse la formación de radicales libres, a consecuencia de un nuevo influjo de oxígeno durante la reperfusión.

Los radicales libres son moléculas o fragmentos moleculares con electrones no apareados en su última órbita. Por ello, son altamente reactivos y tienden a iniciar reacciones en cadena que resultan en alteraciones químicas irreversibles sobre los lípidos y proteínas, causando daños estructurales y funcionales del sistema de membranas celular. Estos daños se han asociado a los procesos de diferenciación, envejecimiento, mitogénesis y carcinogénesis; así como a la fisiopatología de diversas enfermedades incluyendo el daño por isquemia-reperfusión del cerebro, corazón, piel, intestino, páncreas, hígado, músculo, riñón, pulmón y varios órganos más.<sup>14</sup>

En cuanto al corazón en particular, según investigaciones recientes, los radicales de oxígeno juegan un papel clave en el daño celular durante la isquemia y reperfusión del miocardio, al igual que en la génesis de las arritmias inducidas por reperfusión.

En un estudio donde se midió la concentración de radicales libres por espectrometría de Resonancia Magnética Nuclear (RMN) se observó en perros, que estos radicales aumentaban proporcionalmente a la duración de la isquemia y que durante la reperfusión alcanzaban concentraciones más elevadas en los primeros 60 seg, con respecto al período de isquemia retornando en 5 min a los valores de pre-reperfusión.<sup>7</sup> Es interesante señalar que estos autores encontraron un aumento en la concentración de radicales libres en las zonas no isquémicas en comparación con los animales controles operados pero no ligados. Para ellos, esto se debe a la acción de catecolaminas liberadas por el tejido isquémico.

En otro trabajo donde también se usó espectrometría de RMN, se obtuvieron resultados similares en cuanto a la producción de radicales libres durante la isquemia y la reperfusión. Por el contrario, tejidos totalmente anóxicos no generaban radicales libres.<sup>15</sup> Esta última situación difícilmente ocurre en la clínica de la isquemia miocárdica debido a lo frecuente de la circulación colateral en el hombre; lo mismo ocurre en el perro.<sup>10</sup>

Enfatizando lo expresado, citamos de la literatura que cuando la tensión de oxígeno (PO<sub>2</sub>) se reduce al 90%, la producción de radicales libres por el miocardio todavía mantiene un 83% de lo producido con valores normales de PO<sub>2</sub>.<sup>16</sup> Evidentemente en el hombre y el perro la exten-

sión y severidad del infarto, al igual que el nivel de producción de radicales libres, dependerá del grado de circulación colateral existente en cada caso en particular.<sup>7,10</sup>

Para interrumpir la producción de radicales de oxígeno por el tejido isquémico y reperfundido, se han usado varios agentes que actúan a diferentes niveles de su sistema productivo; entre los más usados están: los recogedores de radicales libres, inhibidores de la xantina oxidasa, queladores de hierro, agentes leucopénicos, bloqueadores de quimiotaxis y de la activación leucocitaria, agentes que interfieren con la adherencia leucocitaria al endotelio, anti-oxidantes y precursores de anti-oxidantes.<sup>10</sup>

En lo concerniente al PNA y a los radicales libres de oxígeno, el primer trabajo que une formalmente esta hormona con ellos fue hecho en cultivos de hepatocitos.<sup>11</sup> En ese sistema se observó un efecto citoprotector del PNA frente a los daños celulares producidos por hipoxia, oxígeno reactivo y reoxigenación al impedir esta hormona el influjo de Ca<sup>2+</sup> en estas células lesionadas. Entre los posibles mecanismos responsables de este efecto están aquellos dependientes del GMP-c que mantienen el balance del Ca<sup>2+</sup> celular como son: la modulación de la bomba de Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, la modulación de los canales de voltaje estímulo-dependiente del Ca<sup>2+</sup> y el intercambio de Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> presente en la membrana celular.

Estos resultados evidencian que el efecto citoprotector del PNA no depende exclusivamente de sus efectos beneficiosos bien conocidos sobre la hemodinámica tisular y homeostasis circulatoria, sino que incluye también mecanismos intracelulares. En este sentido, el PNA podría servir no sólo como otra opción terapéutica para evitar los daños inducidos por los radicales libres de oxígeno, sino también para entender mejor el uso armónico de la terapia antirradicales libres de oxígeno disponible.

En 1984 se reportó por primera vez que los radicales libres de oxígeno están involucrados en el daño tubular renal inducido por isquemia, ya que las ratas con oclusión de la arteria renal y administración previa de superóxido dismutasa, dimetilíourea o alopurinol presentaban menores alteraciones morfológicas y funcionales que en los animales no tratados.<sup>9</sup>

En 1987 se demostró que el PNA tenía un efecto protector en el fallo renal agudo post-isquémico in vivo<sup>12,13</sup> e in vitro<sup>12</sup> en la rata. Después de la ligadura de la arteria renal durante 60min, el PNA atenúa las alteraciones morfofuncionales post-isquémicas;<sup>13</sup> se le atribuyó este efecto citoprotector del PNA a los cambios hemodinámicos tisulares.<sup>12,13</sup> Considerando los efectos del PNA en los hepatocitos<sup>11</sup> y los cardiocitos ventriculares<sup>17</sup> conjuntamente con nuestros resultados pensamos, al igual que otros,<sup>11</sup> que en el fallo renal isquémico agudo<sup>12,13</sup> el PNA actúa no sólo por su acción vasodilatadora y mejoría hemodinámica, sino también por un efecto citoprotector mediante los mecanismos mencionados en relación con la hipoxia hepática.<sup>11</sup> Siendo así, el PNA actuaría como un citoprotector frente al incremento de los radicales libres de oxígeno en tres órganos diferentes, como consecuencia

de una patología común: isquemia-reperfusion. La ubicuidad de los radicales libres de oxígeno en condiciones patológicas en el hombre da mucho que pensar sobre el estudio de la biomedicina y la proliferación de nuevas investigaciones en el campo del PNA y el metabolismo del oxígeno.

En resumen, el efecto preventivo del PNA sobre las alteraciones electrocardiográficas producidas por la ligadura de la ACDA en el perro, así como la evolución biológica de estos animales, sugiere un potencial terapéutico citoprotector para esta hormona en las enfermedades isquémicas del miocardio.

El presente estudio no permite aportar conclusiones más precisas sobre dos temas que están todavía en evolución como son el de los radicales libres y el PNA, y en particular la interacción de éstos en la isquemia miocárdica. Con este trabajo se pretende sólo aportar elementos de pensamiento acerca de la posibilidad de que las drogas anti-radicales libres de oxígeno puedan jugar un papel crítico en el tratamiento de las enfermedades isquémicas del miocardio y donde el PNA podría tener un lugar importante.

## BIBLIOGRAFIA

1. De Bold, A.J.; Borenstein, H.B.; Veres, A.T.; Sonnenberg, H.: A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extracts in rat. *Life Sci*, 28:89-94, 1981.
2. De Bold, A.J.: On the shoulders of giants: The discovery of atrial natriuretic factor. *Can J Physiol Pharmacol*, 65:2007-2012, 1987.
3. Baxter, J.; Lewicki, J.; Gardner, D.: Atrial Natriuretic Peptide. *Biotechnology*, 6:529-543, 1988.
4. Rosado, A.; Hernández, R.; Halls, A.; Bencosme, H.; García, M.; Bencosme, S.A.: Efectos del péptido natriurético atrial sobre las arritmias inducidas por Acepromazina en la rata. Reporte preliminar. *Acta Médica Dominicana*. 11:224, 1989.
5. Fridovich, I.: The biology of oxygen radicals: General concepts, en *Oxygen radicals and tissue injury*. Barry Halliwell Editor, p.1-5, 1988.
6. Fisher, A.B.: Intracellular production of oxygen-derived free radicals, en *Oxygen radicals and tissue injury*. Barry Halliwell, editor, p.34-39, 1988.
7. Simpson, P.J.; Fantone, J.C. and Lucchesi, B.R.: Myocardial ischemia and reperfusion injury: Oxygen radicals and the role of the neutrophil, en *Oxygen radicals and tissue injury*. Barry Halliwell, editor, p.63-77, 1988.
8. Kobayashi, A.; Watanabe, H.; Ozawa, K.; Hayashi, H., and Yamazaki, N.: Oxygen-derived free radicals related injury in the heart during ischemia and reperfusion. *Japanese Circulation Journal*. 53:1122-1131, 1989.
9. Pallerm M.S.; Hoidal, J.R.; Ferris, T.F.: Oxygen free radicals in ischemic acute renal failure in the rat. *J Clin Invest* 74:1156-1164, 1984. Citado por Johnson y Col. The role of oxygens radicals in Kidney disease, en *Oxygen radicals and tissue injury*. p.115-121, 1988.
10. Cohen, M.V.: Free radicals in ischemic and reperfusion myocardial injury: Is this the time for clinical trials? *Ann Inter Med*. 111:918-931, 1989.
11. Von Ruecker, A.A.; Wild, M.; Rao, G.S. and Bidlingmaier, F.: Atrial natriuretic peptide protects hepatocytes against damage induced by hypoxia and reactive oxygen. Possible role of intracellular free ionized calcium. *J Clin. Chem. Clin. Biochem*, 27:531-537, 1989.
12. Nakamoto, M.; Shapiro, J.I.; Shanley, P.F.; Chan L. and Shrier, R.W.: In vitro and in vivo protective effect of Atriopeptin III on ischemic acute renal failure. *J. Clin. Invest*, 80: 689-705, 1987.
13. Shaw, S.G.; Weidmann, J.; Hodler, J.; Zimmermann, A., and Paternostro, A.: Atrial natriuretic peptide protects against acute ischemic renal failure in the rat. *J. Clin. Invest*, 80: 1232-1237, 1987.
14. Halliwell, B.: A radical approach human disease en oxygen radicals and tissue injury. Barry Halliwell, editor. p.139-143, 1988.
15. Zweier, J.L.; Flaherty, J.T.; Weisfeldt, I.: Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Natl Acad. Sci. USA*, 84:1404, 1987. Citado de la referencia No.8.
16. Woodward, B.; Manning, A.S.: Reperfusion arrhythmias: Are free radicals involved? In *Threatening arrhythmias during ischemia and infarction*. Ed. by Hearse DJ, Manning Janse MJ, Raven Press, New York, 1987. Citado de la referencia No.8.
17. Linz, W.; Schölkens, B.; Albus, U.; Petry, P.; Breipohl, G., and Knolle, J.: Atrial natriuretic factor protects the isolated working ischaemic rat heart against the action of angiotensin II. *J. Hypertension*, 6:5339, 1988.