



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS
BIOMÉDICAS
FACULTAD DE MEDICINA**

**BASES MOLECULARES DEL POST-
ACONDICIONAMIENTO EN CORAZONES
REPERFUNDIDOS. PAPEL DE LA MITOCONDRIA, CON
ÉNFASIS EN LA PARTICIPACIÓN DEL PORO DE LA
TRANSICIÓN DE LA PERMEABILIDAD
MITOCONDRIAL.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A :

M. en C. FRANCISCO CORREA SEGURA

DOCTORADO
en
CIENCIAS
BIOMÉDICAS

**DIRECTORA DE TESIS:
DRA. ANA CECILIA ZAZUETA MENDIZÁBAL**

México 2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Agradecimientos:

Al departamento de Bioquímica del Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Al apoyo de beca de CONACyT 121010 así como al proyecto 090742.

RESUMEN

La reperfusión arterial coronaria es el tratamiento para reducir el tamaño del infarto en la patología isquémica cardiaca. Paradójicamente, el restablecimiento del flujo coronario produce daño sobre el miocardio isquémico, condición a la que se conoce como daño letal por reperfusión. Entre las muchas estrategias que se han desarrollado para evitar el daño por reperfusión, destaca la propuesta por el grupo de Zhao, quienes demostraron que episodios breves de isquemia-reperfusión llevados a cabo antes de establecer la reperfusión reducen el tamaño del infarto. Estas maniobras de isquemia-reperfusión son conocidas como post-acondicionamiento. Aunque no se ha definido un mecanismo único de cardioprotección hasta el momento, hay quienes aseguran que los mecanismos podrían converger en las vías de producción de energía. El objetivo de este trabajo fue analizar la relación entre la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento y su efecto sobre la función mitocondrial, además del papel que juegan en la cardioprotección otras vías de obtención de energía como la glucólisis.

La maniobra de post-acondicionamiento mantuvo el trabajo cardiaco desde los primeros minutos de la reperfusión. Medimos diversos parámetros de integridad mitocondrial y encontramos que la función mitocondrial se conservó intacta por efecto de la maniobra. Esto fue evaluado al medir el hinchamiento mitocondrial, el transporte de calcio y el contenido de NAD^+ . La integridad mitocondrial se asoció con una disminución en el estrés oxidativo, medido por la carbonilación de proteínas y la actividad de la enzima aconitasa. Por otro lado, la aplicación de la maniobra de post-acondicionamiento antes de la reperfusión prolongada

promovió un incremento sostenido de la translocación de GLUT 4, así como la activación de la vía glucolítica durante los primeros minutos de la reperfusión. La inhibición de la vía glucolítica con el ácido yodoacético, abatió el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento, y en estas condiciones no se encontró una disminución de la capacidad oxidativa de la mitocondria. La contribución de la glucólisis para mantener la función contráctil del corazón se observó en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento y perfundidos con 2-desoxi-glucosa, así como en corazones en los cuales el ácido yodoacético fue administrado durante la reperfusión. Nuestros resultados indican que la integridad mitocondrial se mantiene en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento por una disminución en la sobrecarga de calcio, así como una disminución en la generación de especies reactivas de oxígeno. En este trabajo sugerimos que la compartimentalización funcional del metabolismo energético en términos de la utilización de la glucosa en condiciones de isquemia y reperfusión se modifica por efecto de los ciclos de la maniobra del post-acondicionamiento, lo que favorece la cardioprotección.

ABSTRACT

Paradoxically, although rapid initiation of reperfusion is the most effective treatment to reduce infarct size resulting from myocardial ischemia, it has the potential to induce additional lethal injury that is not evident at the end of the ischemia. This condition is known as reperfusion injury. Several strategies have been developed to contend against reperfusion injury. A recent report described that brief periods of ischemia-reperfusion, applied at the onset of the coronary reflow, significantly reduced the infarct size. This mechanical maneuver is known as post-conditioning. The cardioprotective pathways activated by post-conditioning may converge on mitochondria or in other energy producing pathways. Thus the purpose of this work was to characterize the inhibition status of the mitochondrial permeability transition early after the post-conditioning maneuver and before long reperfusion was established. Also, we investigated the relevance of the glycolytic pathway in preserving the cardiac function of the post-conditioning heart. We observed that the post-conditioning maneuver applied to isolated rat hearts, promoted cardiac mechanical function recovery and maintained mitochondrial integrity. This was evaluated by measuring mitochondrial swelling, calcium transport and NAD⁺ content. Mitochondrial integrity was associated with decrease in oxidative stress, measured by carbonylation of proteins and aconitase activity. On the other hand, post-conditioning maneuver applied to isolated rat hearts after prolonged ischemia and before reperfusion, promoted a sustained increase of GLUT-4 translocation and activation of the glycolytic pathway during ischemia and early reperfusion. Iodoacetate inhibited the protective effect of post-conditioning, without affecting the mitochondrial oxidative capacity. Glycolysis contribution to

maintain mechanical function at early reperfusion was observed in post-conditioned hearts perfused with 2-deoxy-D-glucose and in hearts in which iodoacetate was administered only during reperfusion. Our results indicate that mitochondrial integrity is maintained in the post-conditioning heart by diminishing calcium overload and ROS generation and that a functional compartmentation of energy anaerobic metabolism, at early reperfusion, plays a significant role in cardiac protection against reperfusion damage.

ABREVIATURAS

ADP: adenosin-5' difosfato

ATP: adenosin-5' trifosfato

CCCP: carbonilcianuro-m-cloro-fenilhidrazona

CSA: ciclosporina A

DTT: Ditiotreitol

DNP: dinitrofenilhidrazona

DNPH: dinitrofenilhidrazina

BSA: albumina sérica bovina

PBS: solución amortiguadora de fosfatos

EDTA: ácido etilendiamina tetracético

EGTA: ácido etilenglicol tetracético

HEPES: N-[hidroxietil] piperacina-N-[2-etanosulfónico]

M: mitocondrias

PC: post-acondicionamiento

PTm: transición de la permeabilidad

PTPm: poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial

SDS: dodecil sulfato de sodio

ERO: especies reactivas de oxígeno

TRIS: tris (hidroximetil) aminometano

ÍNDICE

I.	Introducción.....	9
II.	Marco teórico.....	12
	1. Fisiopatología del daño al miocardio por reperfusión.....	12
	1.1. Especies reactivas de oxígeno.....	15
	1.2. Re-entrada de calcio al citosol.....	15
	1.3. Intercambiador de sodio por ión hidrógeno.....	17
	1.4. Desacoplamiento entre la excitación y la contracción..	19
	1.5. Proceso inflamatorio.....	20
	1.6. Plaquetas.....	20
	1.7. Óxido nítrico.....	20
	1.8. Alteraciones metabólicas durante la reperfusión.....	21
	1.9. Disfunción endotelial y mecanismos relacionados con el fenómeno de «no reflujo».....	22
	1.10. Daño celular letal por reperfusión.....	23
	1.11. El retículo sarcoplásmico y las mitocondrias en la génesis de la hipercontractura y la muerte celular.....	25
	2. El post-acondicionamiento como estrategia cardioprotectora..	28
	2.1. Mecanismos de protección activados por el post-acondicionamiento.....	31
	2.2. Efecto del pH.....	31
	2.3. Inhibición de la activación de los neutrófilos, disfunción endotelial y la respuesta inflamatoria.....	32
	2.4. Proteína G acoplada a receptores.....	33
	2.4.1. Receptores de adenosina.....	33
	2.4.2. Receptores de bradiquinina.....	34
	2.4.3. Receptores de opioides.....	34
	2.5. Otras vías de señalización en el post-acondicionamiento.....	35
	2.5.1. PI3 y MEK-EKR 1/2	35
	2.5.2. Proteína cinasa C (PKC).....	36
	2.6. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.....	37
	2.7. Sobrecarga de calcio.....	40
	2.8. Transición de la permeabilidad mitocondrial.....	40
	2.9. El papel del post-acondicionamiento en la apoptosis...	41
III.	Antecedentes.....	44
IV.	Hipótesis y objetivos.....	47
V.	Materiales y métodos.....	48
	1. Protocolos de reperfusión y post-acondicionamiento.....	48
	2. Obtención de fracciones celulares.....	50

3.	Medición de la integridad mitocondrial.....	50
4.	Determinación del contenido de ATP y de la fosfocreatina.....	51
5.	Activación de la vía glucolítica.....	52
6.	Oxidación de proteínas y actividad de la aconitasa en corazones con post-acondicionamiento.....	53
7.	Liberación del citocromo c de preparaciones mitocondriales...	53
8.	Consumo de glucosa.....	54
9.	Contenido de lactato.....	56
10.	Actividad de la hexocinasa.....	56
11.	Inhibición de la vía glucolítica.....	56
12.	Análisis de datos.....	57
VI.	Resultados.....	58
1.	Función cardíaca.....	58
2.	Integridad mitocondrial y apertura del PTPm: su relación con el estrés oxidativo y la apoptosis.....	60
3.	Translocación del transportador de glucosa 4 (glut4) a membranas de sarcolema.....	69
4.	Consumo de glucosa y liberación de lactato en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento.....	71
5.	Efecto de la inhibición de la vía glucolítica sobre el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento.....	72
6.	Actividad de la hexocinasa en corazones con post-acondicionamiento.....	75
VII.	Discusión.....	78
VIII.	Conclusiones.....	88
IX.	Perspectivas.....	89
X.	Bibliografía.....	91
XI.	Publicaciones derivadas de esta tesis.....	100
➤	Post-conditioning preserves glycolytic ATP during early reperfusion: A survival mechanism for the reperfused heart.....	101
➤	Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart.....	110
➤	Mecanismos moleculares involucrados en las estrategias mecánicas para evitar el daño por reperfusión en el miocardio isquémico.....	120

I. INTRODUCCIÓN

Las cardiopatías isquémicas son la principal causa de mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud será la principal causa de muerte en el mundo en el año 2020. Es por ello necesario estudiar y diseñar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y tratar estas patologías, con el objetivo final de preservar la viabilidad del miocardio y la vida del paciente. La reperfusión arterial coronaria es el tratamiento indicado para reducir el tamaño del infarto en la patología isquémica cardíaca. Paradójicamente, el restablecimiento del flujo coronario puede producir daños adicionales sobre el miocardio isquémico, condición a la que se conoce como daño por reperfusión (1-3).

El daño por reperfusión es consecuencia de un sin número de mecanismos que se activan tanto en el interior de la célula como en el exterior de la misma. Fisiológicamente este daño se traduce en disfunciones del endotelio, del sistema vascular, del metabolismo y de la contracción del miocardio, en la descompensación en el flujo de sangre y en fenómenos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis. En este sentido, la sobrecarga de calcio y el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno durante la reperfusión activan la transición de la permeabilidad mitocondrial, fenómeno considerado como un evento clave en la muerte celular del miocardio. La transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza por la apertura de un poro no específico entre las membrana interna y externa mitocondrial, que provoca un colapso total del potencial transmembranal, el desacoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa, además de

hinchamiento mitocondrial, que lleva a la ruptura de la membrana externa, favoreciendo la salida de pequeñas moléculas como el citocromo c y otros factores pro-apoptóticos que promueven el inicio y la ejecución de la necrosis o la apoptosis (4-6).

El grupo de Griffiths y Halestrap (7,8) demostró que el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) permanece cerrado durante la isquemia y se abre durante la reperfusión. Entre las condiciones que favorecen que el PTPm permanezca cerrado durante la isquemia destacan la disminución en el contenido de calcio mitocondrial y la acidificación del pH intracelular (9). Durante la reperfusión, el pH intracelular se recupera rápidamente y puede llevar a un incremento significativo de la concentración de sodio a través del intercambiador Na^+/H^+ , aumento que activa al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que a su vez favorece un incremento en la concentración de calcio citosólico que lleva a la disfunción cardíaca (10).

También se ha descrito que en condiciones de baja concentración de oxígeno las células de mamífero responden estratégicamente favoreciendo la estimulación de vías para la utilización de glucosa exógena; como enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa (GLUT), mediante la activación de genes inducibles por isquemia (11). En este sentido, se ha demostrado que una mayor disponibilidad de sustrato glucolítico favorece la recuperación del corazón cuando este es reperfundido por tiempos cortos (12,13). Más aún, se ha sugerido que el ATP de origen glucolítico puede ser esencial para mantener la homeostasis del calcio durante el aumento de éste durante la reperfusión

(14). Estas evidencias y los datos que sostienen que la apertura del PTPm es un evento decisivo hacia el daño celular irreversible, subrayan la importancia de la regulación de esta entidad molecular para prevenir el daño por reperfusión, pero también sugieren que existen otros mecanismos involucrados y posiblemente relacionados con la cardioprotección.

Entre las muchas estrategias que se han desarrollado para evitar el daño por reperfusión destaca la propuesta por el grupo de Zhao en el año de 2003 (15), quienes demostraron que episodios breves de isquemia-reperfusión llevados a cabo después de una isquemia prolongada y antes del restablecimiento de la reperfusión, reducen el tamaño del infarto. Estas maniobras de isquemia-reperfusión son conocidas como post-acondicionamiento. Los mecanismos o las vías de protección que activa el post-acondicionamiento parecen incidir en las vías de producción de energía, específicamente en la mitocondria, donde la regulación del PTPm es de suma importancia para la viabilidad celular.

Estos datos nos llevan a proponer que los mecanismos de cardioprotección activados durante el post-acondicionamiento mantienen el balance entre la demanda y el aporte de energía. Por tanto, la regulación de la función mitocondrial, la inhibición de la apertura del PTPm y el ATP generado por la glucólisis deben participar en el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento.

MARCO TEORICO

1. Fisiopatología del daño al miocardio por reperfusión.

Es bien conocido que la supervivencia de las células isquémicas depende de diversos factores, y que la duración de la isquemia a la que han estado sometidas en el momento en que se produce la restauración del flujo sanguíneo es un factor determinante del éxito de la terapia por reperfusión. Este conocimiento ha hecho que se invierta un gran esfuerzo en disminuir el tiempo que se tarda desde que un paciente siente un dolor torácico hasta que se le practica la reperfusión terapéutica. Sin embargo, cada vez es más costoso y difícil conseguir una reducción adicional de este intervalo y, a pesar de las mejoras en los procedimientos de reapertura de la arteria coronaria, que permiten una recanalización más efectiva, rápida, completa y permanente de las arterias coronarias ocluidas de forma aguda, la gran mayoría de los pacientes con síndrome coronario agudo con elevación del segmento ST continúan presentando necrosis miocárdicas extensas.

El daño al miocardio por reperfusión se define como el efecto adverso producido al restablecerse la circulación y propiciar la llegada de sangre y nutrientes a las células previamente isquémicas. Bioenergéticamente la restauración del flujo sanguíneo puede acompañarse de liberación de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, acumulación de calcio intracelular y alteración en el metabolismo celular, situaciones que pueden condicionar un daño miocárdico funcional y estructural.

Clínicamente, este daño puede manifestarse después del restablecimiento de la circulación coronaria previamente bloqueada, o después del uso de la bomba

extracorpórea en cirugía cardíaca, manifestándose como miocardio aturdido o “hibernante”, como un fenómeno de “no reflujo” después de restablecer el flujo durante una angioplastia o de las denominadas arritmias por reperfusión que se producen después de la revascularización quirúrgica.

Rosenkraz y Buckberg definieron el concepto de daño por reperfusión para referirse a los mecanismos que disminuyen el éxito e inclusive producen alteraciones funcionales y estructurales durante el restablecimiento del flujo sanguíneo en una arteria coronaria previamente ocluida (16,17). Contrariamente a lo esperado, la reintroducción de calcio y oxígeno, este último ausente durante la isquemia, aceleran el daño durante la reperfusión. En el terreno de la cirugía cardíaca se observan cotidianamente los efectos adversos del restablecimiento de la circulación después del uso de circulación extracorpórea, consistentes en disfunción contráctil y la aparición de arritmias ventriculares. Posteriormente, Braunwald y Kloner hicieron notar la existencia del daño (miocardio aturdido y arritmias por reperfusión) a causa de la reperfusión en los pacientes sometidos a trombólisis (18). El daño a causa de la reperfusión se ha descrito, también después de la recanalización de las arterias coronarias epicárdicas, durante la angioplastia coronaria transluminal percutánea.

Entonces, la disminución de la perfusión tisular por la oclusión de una arteria coronaria produce una serie de eventos que incluyen, entre otros, la disminución de la fosfocreatina y la disminución del metabolismo aeróbico seguida del inicio del metabolismo anaeróbico, lo que condiciona la generación

de diferentes metabolitos tóxicos para la célula (lactato, ERO.) (Fig. 1). Si la oclusión persiste en ausencia de una adecuada circulación coronaria colateral, el déficit de perfusión resultará en un daño estructural irreversible, y finalmente llevará a las células a la muerte. Si la reperfusión ocurre antes de que el daño sea irreversible, la célula podría recuperarse. Sin embargo, en contra de lo esperado, algunas células miocárdicas sufren mayor daño una vez que el flujo coronario se ha restablecido (19-20). Este daño condicionado por la reperfusión se ha relacionado, entre otras causas, con la infiltración de diversas células inflamatorias y la generación de múltiples factores humorales mediadores de la inflamación, así como con diversos productos resultantes de las alteraciones en el metabolismo de la glucosa y de los ácidos grasos (21).

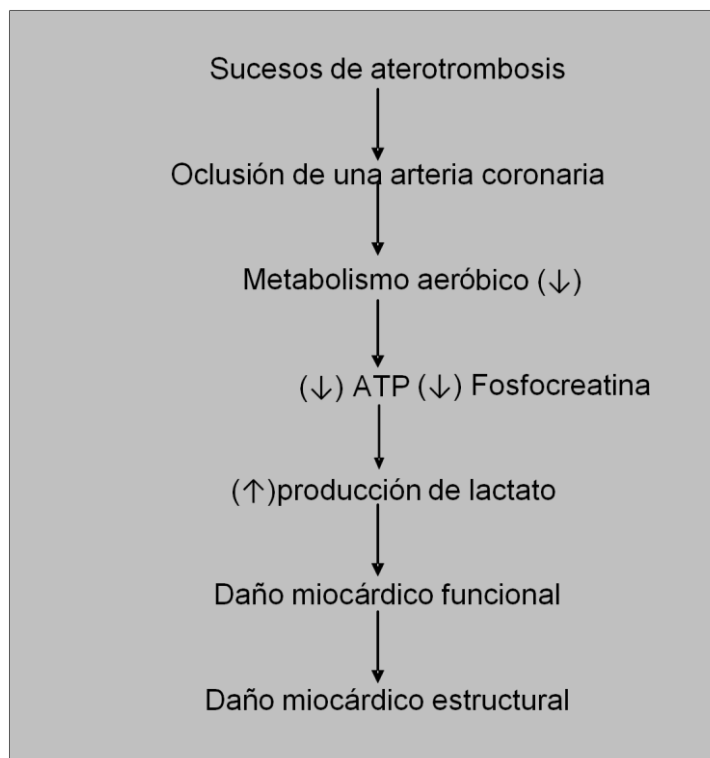


Figura 1. Resumen de la fisiopatología del daño por isquemia tisular.

1.1. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

Al restaurar el flujo sanguíneo en corazones isquémicos se producen especies reactivas de oxígeno tales como el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), los radicales hidroxilos (OH^{\cdot}) y el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), todos con la capacidad de dañar las membranas celulares. La peroxidación lipídica de la membrana plasmática produce daño estructural y funcional, que condiciona un aumento en la permeabilidad de la membrana plasmática al calcio, lo que conlleva a un incremento en la concentración intracelular de este catión (22). Los 3 principales mecanismos de daño por las especies reactivas a oxígeno son: la peroxidación de lípidos, la oxidación de las proteínas y la ruptura del ADN. Una de las vías mediante las cuales los radicales superóxido pueden generar radicales hidroxilo es la reacción del anión superóxido con el óxido nítrico (NO), formando un compuesto denominado peroxinitrito, que es tóxico, inestable y altamente reactivo que causa la peroxidación de lípidos y daño miocárdico. En la práctica clínica se han encontrado marcadores indirectos de la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno en la sangre del seno coronario, en pacientes a los que se les realiza una angioplastia coronaria transluminal percutánea (malondialdehído, ácido úrico y glutatión oxidado) (23).

1.2. Reentrada de calcio al citosol.

La reentrada de calcio al interior de una célula miocárdica, previamente privada de este elemento en la isquemia, produce un daño celular severo caracterizado por una marcada elevación de las enzimas cardíacas y la formación de las denominadas bandas de contracción (Fig. 2). Además de la reentrada de calcio extracelular, también hay sistemas dentro de la célula que elevan el

calcio en el interior de la célula y conducen a ésta a la necrosis. En el interior de la célula hay sistemas bien caracterizados que liberan calcio: el retículo sarcoplásmico y la mitocondria. Durante los primeros minutos de la reperfusión, el retículo sarcoplásmico se encuentra en un entorno de gran sobrecarga de calcio, favoreciendo la activación de la ATPasa de calcio del retículo sarcoplásmico (SERCA). En estas condiciones se produce una gran acumulación de calcio en el interior del retículo, excediendo su capacidad acumulativa, por lo que finalmente el calcio es liberado al citosol (24). Durante la isquemia y la reperfusión, se encuentra una acumulación importante de calcio en las mitocondrias. Se ha demostrado que durante la isquemia, al privarse a las mitocondrias de oxígeno, se produce una disminución de los valores celulares de ATP y un incremento del fosfato, lo que limita la salida del calcio de la célula, y provoca su acumulación en el interior (25). De esta manera, se pierde la capacidad para restablecer la homeostasis del calcio desde la isquemia. Durante la reoxigenación, la mitocondria es sometida a una entrada masiva de calcio, produciéndose un aumento en la permeabilidad de sus membranas (PTPm) y la inhibición de la síntesis de ATP, lo que favorece las alteraciones en el acoplamiento excitación-contracción y condiciona el daño celular y la disfunción ventricular (26).

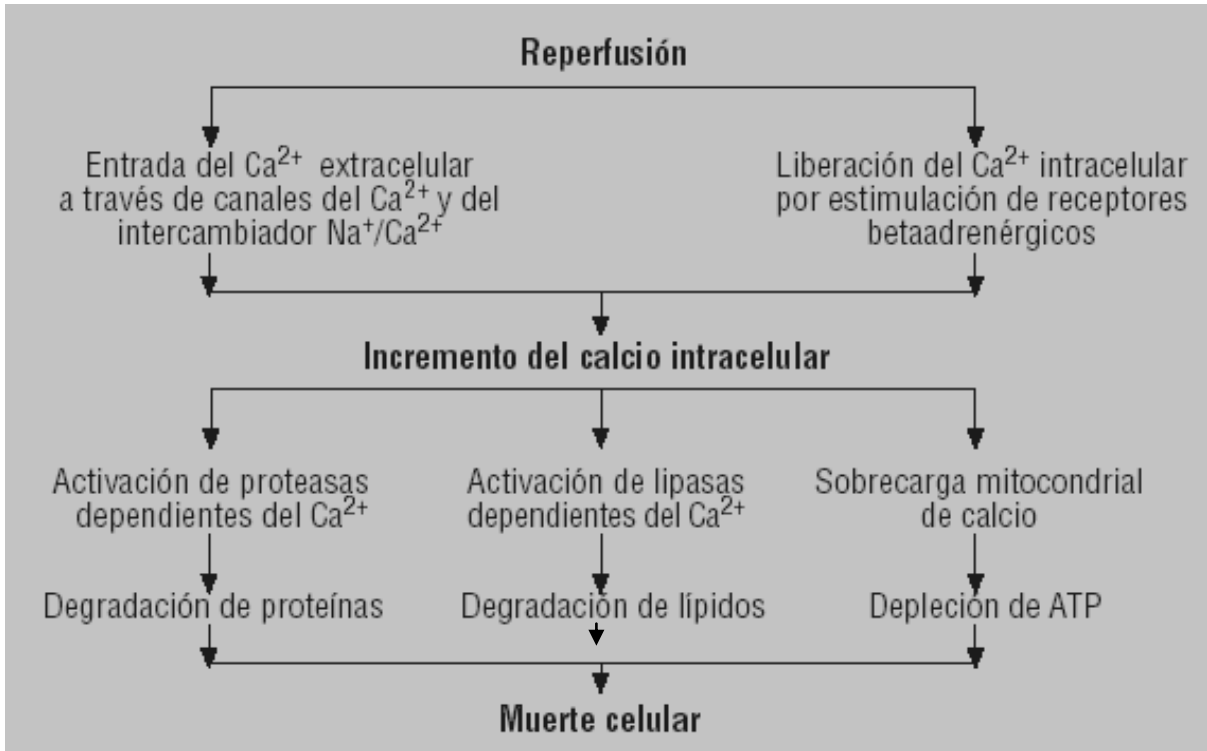


Fig. 2. Fisiopatología del daño celular inducido por el calcio durante la reperfusión.

1.3. Intercambiador de sodio por ión hidrógeno (Na⁺/H⁺).

La disminución del metabolismo aeróbico provoca que se inicie un metabolismo anaeróbico que genera, entre otros productos, ácido láctico y la subsecuente producción de iones hidrógeno que llevan al desarrollo de acidosis intracelular. Esta acidosis tiene un importante efecto inotrópico negativo, por lo que la célula miocárdica tiene que recurrir a varios mecanismos para mantener su pH intracelular. En los cardiomiocitos el intercambiador de Na⁺/H⁺ tipo 1 (NHE-1) es el más importante (27). Uno de los primeros desequilibrios iónicos que se instala durante la isquemia es el aumento sostenido de la concentración intracelular de Na⁺ debido a la inhibición de la bomba de Na⁺/K⁺ del sarcolema y la acidificación progresiva del citosol por la activación de la glucólisis anaeróbica. La célula trata de corregir la sobrecarga de Na⁺ a través del

intercambiador de membrana $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo reverso, que no requiere energía para funcionar y que saca el Na^+ intracelular, con la desventaja de introducir Ca^{2+} al interior de la células y, de esta forma, se inicia un proceso de pérdida progresiva del control de Ca^{2+} , uno de los cationes que en condiciones fisiológicas se encuentra más estrictamente regulado en el medio intracelular.

Las células que se encuentran en esta situación de riesgo ponen en marcha mecanismos dirigidos a corregir la acidosis intracelular, pero estas pueden empeorar aún más la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} y Na^+ . La llegada de flujo sanguíneo produce un lavado rápido de los catabolitos (fundamentalmente H^+) del medio extracelular, lo que da lugar a un gradiente de pH entre las células y su entorno, por lo que se activan los mecanismos de corrección de la acidosis intracelular, principalmente a través del intercambiador Na^+/H^+ de la membrana plasmática y del co-transportador $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$. Esta respuesta de corrección de la acidosis intracelular empeora aún más la sobrecarga citosólica de Na^+ que, de nuevo, es manejada por la célula activando el modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$, lo que produce una entrada adicional de Ca^{2+} (28). La entrada de Ca^{2+} a través del modo inverso del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ es poco relevante en condiciones fisiológicas en los miocitos humanos, pero puede ser deletérea cuando la célula se encuentra sobrecargada de Na^+ . Como resultado de todos estos mecanismos de corrección en cadena, la célula reoxigenada acumula una gran cantidad de Ca^{2+} en su interior, comprometiendo seriamente su propia supervivencia. De hecho, la inhibición farmacológica del intercambio $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ con KB-R7943 reduce la sobrecarga citosólica de Ca^{2+} en

cardiomiocitos aislados, así como el tamaño del infarto en un modelo de oclusión coronaria transitoria *in situ* (28).

1.4. Desacoplamiento entre la excitación y la contracción.

La expresión “desacoplamiento excitación-contracción” se refiere al mecanismo por el cual el potencial de acción hace que se contraigan las miofibrillas del músculo. Cuando el potencial de acción pasa por la membrana plasmática del músculo cardíaco, se propaga al interior de la fibra muscular a través de los túbulos transversos T. A su vez, los potenciales de acción de los túbulos T actúan sobre las membranas de los túbulos sarcoplásmicos longitudinales para producir la liberación instantánea de iones calcio del retículo sarcoplásmico al sarcoplasma muscular. En pocas milésimas de segundos más, estos iones de calcio difunden a las miofibrillas e inician las reacciones químicas que promueven el deslizamiento de los filamentos de miosina sobre los de actina, que producen la contracción muscular.

Se ha demostrado que durante el daño por reperfusión existe una alteración en el acoplamiento excitación-contracción. Así, incluso con valores normales de calcio intracelular, las contracciones son de menor magnitud que lo normal. ¿Cuál es la explicación de este fenómeno? Se ha propuesto que aún cuando la actividad eléctrica del miocardio es normal, los miofilamentos se vuelven insensibles al calcio (29). De esta manera, el desacoplamiento excitación-contracción del miocardio puede verse como una “enfermedad de los miofilamentos”, de carácter adquirido y reversible.

1.5. Proceso inflamatorio

Uno de los procesos inducidos por la reperfusión es la acumulación de leucocitos en el área isquémica. Los neutrófilos se unen a las células miocárdicas a través de moléculas especializadas denominadas moléculas de adhesión intercelular, como la ICAM-1, que aparece en la superficie de los miocitos como resultado de la estimulación de éstos por la interleucina-6 (30). Los neutrófilos y monocitos activados y llevados hacia el miocardio durante la reperfusión liberan diversas sustancias tóxicas para las células endoteliales y miocárdicas, incluidos radicales libres, proteasas, elastasas y colagenasas (31). El deterioro de las células endoteliales produce alteraciones en la vasodilatación, en los mecanismos antitrombóticos del endotelio y el daño de las células endoteliales es capaz de inducir una respuesta inflamatoria que condiciona el incremento de la permeabilidad capilar, favoreciendo la adhesión plaquetaria y la infiltración de más leucocitos hacia el miocardio.

1.6. Plaquetas

Durante la reperfusión se produce una activación plaquetaria mediada en parte por la acción de los ERO. Esta activación plaquetaria puede condicionar daño tisular, además de que puede inducir trombosis con el subsiguiente riesgo de reoclusión arterial. Se ha demostrado experimentalmente en animales que la eliminación de las plaquetas es capaz de evitar el daño por reperfusión (32).

1.7. Óxido nítrico.

El óxido nítrico (NO) se sintetiza a partir del aminoácido L-arginina en las células endoteliales y desempeña un papel importante en la regulación del tono

vascular, con un efecto vasodilatador (33). Otras de sus funciones son la inhibición de la función plaquetaria, así como la inhabilitación de la proliferación y migración de las células de músculo liso. El NO tiene una acción controvertida en la producción del daño por reperfusión. Su ausencia se ha relacionado con una mayor adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular y con un incremento en el tono vascular coronario. Por otro lado, las sustancias donadoras de NO han mostrado un efecto cardioprotector durante la reperfusión. Sin embargo, también existe evidencia de que el NO es capaz de condicionar daño miocárdico durante la reperfusión por varios mecanismos, incluida la formación de radicales libres. Por ello, los inhibidores de la formación de NO pueden también ser cardioprotectores. El papel exacto del NO en la producción del daño por reperfusión y el efecto de su manipulación farmacológica están aún por definirse (34).

1.8. Utilización de sustratos durante la reperfusión.

Durante la isquemia, la ausencia de oxígeno y de sustratos oxidables (glucosa, ácidos grasos) provoca la disminución de la fosforilación oxidativa y, por ende, de la producción de ATP. En condiciones normales, las células miocárdicas oxidan preferentemente ácidos grasos. Cuando el corazón se somete a isquemia, se observan cambios en la utilización de los sustratos respecto a un miocardio normal, y en condiciones de isquemia se sabe que el corazón consume preferentemente a la glucosa. Sin embargo, cuando el miocardio es reperfundido, se producen ajustes rápidos en la utilización de los sustratos y se observa un uso preferencial de ácidos los grasos de cadena larga para el metabolismo energético durante el tiempo de reperfusión (34). Así, si se

reperfundes el corazón con una mezcla de los sustratos oxidables, los ácidos grasos son los que aportan la mayor parte de la energía (el 57-63%). En el miocardio, la isquemia promueve la translocación de los transportadores de glucosa GLUT-1 y GLUT-4 aumentando el aporte de glucosa y favoreciendo la formación de lactato y, en consecuencia, la producción de ATP. De esta forma el miocardio isquémico puede cambiar el metabolismo basado en los ácidos grasos a uno basado en la glucosa (35). En animales de experimentación se ha demostrado que cuando se estimula la oxidación de la glucosa por parte del miocardio isquémico, la recuperación contráctil es más rápida y completa que cuando se hace sólo con ácidos grasos (36).

1.9. Disfunción endotelial y mecanismos relacionados con el fenómeno de “no reflujo”.

El daño al endotelio vascular coronario comienza en los primeros minutos de la reperfusión y progresa con el tiempo. La importancia de la disfunción endotelial consiste en que es el punto de partida del denominado fenómeno de “no reflujo”. Se han propuesto 4 mecanismos para explicar la disminución del flujo coronario después de la reperfusión: *a)* edema intracelular e intersticial que produce compresión extravascular de las arterias y arteriolas; *b)* daño a las células del músculo liso coronario con un aumento del tono vascular y falta de relajación frente al estímulo con acetilcolina; *c)* liberación alterada (disminuída) de NO que se acompaña de un aumento del tono vascular, y *d)* bloqueo capilar por material tromboembólico.

Debido a que hay evidencia de que la permeabilidad de la arteria causante del infarto no necesariamente garantiza la perfusión tisular, los estudios están dirigidos a un mayor conocimiento de los acontecimientos fisiopatológicos de la microcirculación relacionados con fenómenos isquémicos (37). Entonces, el fenómeno de “no reflujo” es sólo una manifestación más del daño por reperfusión y éste corresponde a la etapa tardía de mala perfusión en la microcirculación.

1.10. Daño celular letal por reperfusión.

Cuando la reperfusión se realiza a tiempo, las células que son capaces de recuperar el control de la homeostasis iónica sobreviven; sin embargo, en una proporción variable de cardiomiocitos, el desequilibrio iónico no sólo no se corrige, sino que empeora, y acaba por desencadenar la muerte celular inmediata en forma de necrosis. Este tipo de muerte se caracteriza porque se produce durante los primeros minutos de la restauración del oxígeno y del flujo sanguíneo y se acompaña de destrucción de las membranas celulares y liberación al medio extracelular del contenido de las células (principalmente enzimas citosólicas), lo que da lugar a una apariencia histológica característica de necrosis en bandas de contracción, en la que los cardiomiocitos individuales se encuentran masivamente acortados y con una desorganización completa de su estructura sarcomérica. Las imágenes ultraestructurales de estas células obtenidas mediante microscopio electrónico muestran ruptura sarcolemal, edema mitocondrial y depósitos masivos de Ca^{2+} en la matriz mitocondrial, además de acortamiento y desorganización de las miofibrillas sarcoméricas (38).

Las características de esta necrosis se pueden reproducir en un experimento clásico de laboratorio, que consiste en someter a un corazón aislado de rata y perfundido retrógradamente a través de un sistema de Langendorff a una isquemia entre 40 o 60 min y posteriormente hacer una reperfusión prolongada. Esta maniobra experimental produce una gran liberación de enzimas intracelulares (creatina cinasa, lactato deshidrogenasa) en los primeros minutos de reperfusión, cuya magnitud se correlaciona con la extensión de las áreas de necrosis en bandas de contracción visualizadas a partir de los cortes histológicos. Este tipo de respuesta es la demostración experimental de que la muerte celular miocárdica ocurre de forma precoz en el momento de la restauración del flujo (39). Como veremos, esta muerte celular puede prevenirse por intervenciones aplicadas en el momento de la reperfusión.

Los estudios llevados a cabo en modelos celulares de cardiomiocitos aislados han demostrado que la reoxigenación después de un periodo de isquemia produce un acortamiento abrupto de la longitud celular en los primeros minutos de la re-energización, acompañado por una desorganización de la citoarquitectura, cuyas características ultraestructurales son coincidentes con las de la necrosis en bandas de contracción de los cortes histológicos (40). Este tipo de respuesta a escala celular se ha denominado hipercontractura y la probabilidad de que ocurra depende del tiempo transcurrido entre el agotamiento de las reservas intracelulares de ATP durante la isquemia y el momento en el que se establece la reoxigenación (41). El análisis de la longitud de los segmentos miocárdicos ha permitido determinar el grado de

acortamiento miocárdico que se produce durante la reperfusión, detectado como una reducción de la longitud telediastólica por debajo del nivel basal, y cuya magnitud se correlaciona con la extensión del área de necrosis en bandas de contracción. Esta variable es una de las muchas determinaciones experimentales que indican que la necrosis en bandas de contracción de los infartos reperfundidos equivale a la hipercontractura observada en los cardiomiocitos aislados.

1.11. El retículo sarcoplásmico y las mitocondrias en la génesis de la hipercontractura y la muerte celular.

En condiciones fisiológicas los cardiomiocitos consumen una gran cantidad de energía química para producir el trabajo mecánico. La contracción miofibrilar es un fenómeno altamente regulado y sincrónico, que está mediado por aumentos transitorios del Ca^{2+} citosólico procedentes, en su mayor parte, del retículo sarcoplásmico. La participación del retículo sarcoplásmico en algunas enfermedades y, en particular, en la génesis de ciertos tipos de arritmias, en la progresión de la insuficiencia cardíaca y en la miocardiopatía diabética, se conoce desde hace tiempo. Mucho menos conocida, sin embargo, es la contribución del retículo sarcoplásmico en el desarrollo del daño letal por reperfusión, a pesar de que hay sólidas evidencias experimentales que demuestran que puede desempeñar un papel decisivo en la muerte necrótica de los cardiomiocitos. Durante los primeros minutos de la reperfusión miocárdica, el retículo sarcoplásmico se encuentra en un entorno de gran sobrecarga de Ca^{2+} y la reactivación mitocondrial de la síntesis de ATP pone en marcha el funcionamiento de la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico

(SERCA), encargada de la captación del Ca^{2+} citosólico, incluso a pesar de la persistencia de un flujo de Ca^{2+} aumentado desde el medio extracelular. Como resultado de ello, se produce una gran acumulación de Ca^{2+} en el interior del retículo sarcoplásmico que excede su capacidad de almacenamiento, por lo que finalmente el Ca^{2+} es liberado a través de los receptores de rianodina (RyR) y luego vuelve a ser captado, lo que da lugar a un patrón de oscilaciones rápidas de Ca^{2+} que se propagan a lo largo de la célula e imponen una fuerza mecánica que puede sobrepasar la capacidad elástica de los sarcómeros (42). Diversos estudios experimentales han demostrado que el bloqueo farmacológico de las oscilaciones del Ca^{2+} por parte del retículo sarcoplásmico reduce la incidencia de hipercontractura en miocitos reoxigenados (43) y que la activación de vías de señalización intracelulares que interfieren con los movimientos del Ca^{2+} dependientes del retículo sarcoplásmico —por ejemplo, con agonistas del péptido anatriurético— confieren protección durante la reperfusión miocárdica, tanto en animales como en humanos (44, 45).

Aunque la hipercontractura por sí sola puede ser un factor determinante en la ruptura del sarcolema, existen otros mecanismos propuestos recientemente que también pueden contribuir al daño por reperfusión y a la muerte celular. Uno de los que están siendo actualmente objeto de intensa investigación es la pérdida de la integridad de las mitocondrias cuando concurren ciertas condiciones patológicas (sobrecarga de Ca^{2+} , déficit energético, daño oxidativo), debido a un cambio brusco en la permeabilidad de sus membranas, fenómeno conocido como transición de la permeabilidad mitocondrial (46). Este cambio brusco en la permeabilidad mitocondrial produce un desacoplamiento

de la respiración celular y un colapso energético incompatible con la supervivencia celular (47). La transición de la permeabilidad mitocondrial se ha documentado durante la reperfusión miocárdica, como consecuencia principalmente del daño oxidativo y la sobrecarga de Ca^{2+} y por la rápida corrección de la acidosis intracelular (pH), uno de los inhibidores más efectivos de este cambio de permeabilidad mitocondrial (48). Aunque parece claro que la transición de la permeabilidad mitocondrial produce liberación del citocromo *c* y pone en marcha la cadena de señalización que conduce a la apoptosis celular, el mecanismo por el que causa necrosis en el miocardio reperfundido no se conoce bien. De hecho, el colapso energético secundario a la permeabilización mitocondrial es difícil de reconciliar con el desarrollo de hipercontractura, ya que tanto los primeros estudios sobre daño letal por reperfusión como los datos recientes obtenidos con espectroscopía por resonancia magnética demuestran que la hipercontractura es un fenómeno dependiente de energía (49). Tampoco está claro el mecanismo por el que la disminución energética inducida por el cambio de permeabilidad mitocondrial puede causar ruptura del sarcolema en los primeros minutos de la reperfusión. Estudios recientes en cardiomiocitos aislados, en los que se induce la transición de la permeabilidad mitocondrial mediante estimulación con pulsos de láser, indican que la transición de permeabilidad en unas pocas mitocondrias dentro de la célula puede empeorar el manejo del Ca^{2+} celular, ya que se acompaña de una liberación del Ca^{2+} mitocondrial hacia el espacio citosólico, lo que favorece el desarrollo de hipercontractura siempre que la célula conserve un número suficiente de mitocondrias intactas capaces de mantener la demanda energética (50).

1. El post-acondicionamiento como estrategia cardioprotectora.

Como ya se había mencionado, la supervivencia de las células isquémicas depende de la duración de la isquemia a la que han estado sometidas y el momento en el que se produce la restauración del flujo, estos factores son determinantes del éxito de la terapia por reperfusión. Este conocimiento ha hecho que se invierta un gran esfuerzo en disminuir el tiempo que se tarda desde que un paciente siente un dolor torácico hasta que se le practica la reperfusión terapéutica. Sin embargo, cada vez es más costoso y difícil conseguir una reducción adicional de este intervalo, a pesar de las mejoras en los procedimientos de reapertura de la arteria coronaria que permiten una recanalización más efectiva.

La terapia de reperfusión, ya sea con trombólisis o por procedimientos invasivos, no garantiza que las células isquémicas sobrevivan. Numerosos estudios de investigación llevados a cabo en las últimas dos décadas han establecido de forma inequívoca que, aunque la revascularización es la única alternativa posible para rescatar las células isquémicas de una muerte segura, una parte de la muerte celular se precipita, paradójicamente, por la propia restauración del flujo (41). Este fenómeno, conocido como daño por reperfusión, ha sido exhaustivamente explorado en diversos modelos experimentales, pero sólo recientemente se ha reconocido su relevancia en el contexto de la reperfusión clínica. Por ello, la posibilidad de mejorar la eficacia de la trombólisis y de las intervenciones coronarias percutáneas mediante tratamientos cardioprotectores coadyuvantes empleados en el momento de la revascularización, abre una nueva ventana terapéutica con potencial de

mejorar el resultado clínico cuando ya no es posible modificar el tiempo de isquemia.

El desarrollo de estrategias de cardioprotección se basa en el conocimiento de los mecanismos fisiopatológicos de la muerte celular aguda durante la reperfusión miocárdica. Aunque algunos de estos mecanismos han sido clásicamente conocidos por los cirujanos cardiovasculares (y prevenidos mediante estrategias de cardioprotección utilizadas en el contexto de la cirugía cardiaca), muchos otros se encuentran en fase de investigación. En los últimos años se ha producido un gran avance científico en el conocimiento y la identificación de diversos factores implicados en la muerte celular por reperfusión, gracias a esta investigación se han identificado nuevos blancos terapéuticos potencialmente útiles para prevenirla.

En el estudio del miocardio isquémico-reperfundido, son tan variados los mecanismos de daño como la estrategias descritas para su protección. Destacan los tratamientos con sustancias antioxidantes, la utilización de drogas que actúan sobre el calcio intracelular y de compuestos que previenen la disfunción mitocondrial (51-53). Sin embargo hay alternativas mecánicas que han demostrado ser efectivas. La idea nace desde los años 80's. Entonces se observó que la reperfusión de bajo flujo, en comparación con la reperfusión de flujo normal, mejoraba la actividad contráctil del corazón, reduciendo parcialmente el daño por reperfusión (54). Hay dos estrategias mecánicas descritas actualmente, la primera de ellas consiste en la adaptación del corazón a la hipoxia crónica, mediante una serie de oclusiones breves antes de

un periodo de isquemia prolongado y del restablecimiento del flujo coronario. Este tratamiento, conocido como pre-acondicionamiento, aumenta la recuperación de la función cardíaca y reduce el tamaño del infarto (55). La segunda estrategia fue reportada en el año 2003 por el grupo de Zhao, quienes demostraron que episodios breves de isquemia-reperfusión llevados a cabo de forma cíclica después de un periodo prolongado de isquemia, pero antes de establecer la perfusión, también reducía el tamaño del infarto (15). El post-acondicionamiento tiene una clara ventaja sobre el pre-acondicionamiento al ponerlo en un escenario clínico, pues se podría aplicar a sujetos con infarto (56).

El término post-acondicionamiento fue utilizado por primera vez por Zhao et al en el año 2003 (15), tras demostrar que breves episodios de perfusión interrumpidos por breves episodios de isquemia de forma cíclica, aplicados después de una isquemia prolongada, protegen al corazón del daño letal inducido por perfusión. Este grupo aplicó 3 ciclos de 30 segundos de perfusión/isquemia después de una isquemia regional de 60 minutos en corazones caninos. Los resultados más evidentes fueron la disminución del tamaño de infarto en un 40% y la atenuación de la disfunción endotelial. Este hallazgo atrajo la atención de muchos grupos a nivel mundial. La mayoría ha reportado que la maniobra de post-acondicionamiento disminuye el tamaño del infarto, con protocolos muy particulares y en diferentes modelos animales. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el post-acondicionamiento protege no son del todo claros. El post-acondicionamiento se presenta como un “nuevo” mecanismo de protección endógena con mayores posibilidades de ser

extrapolado al ámbito clínico, a diferencia del pre-acondicionamiento, particularmente en aquellos pacientes sometidos a angioplastia primaria.

2.1. Mecanismos propuestos activados por el post-acondicionamiento.

Dependiendo de la especie, el modelo o los factores que active, la maniobra del post-condicionamiento (PC) logra reducir el tamaño del infarto desde un 40% hasta un 70% respecto a un corazón con la misma área de riesgo (corazón control). Estos hallazgos han sido comprobados por un gran número de grupos de investigación. Además, se ha demostrado que muchos de los eventos que ocurren durante los primeros minutos de la reperfusión son revertidos por el PC.

2.2. Efecto del pH.

El grupo de Cohen et al (2007) reportó que una lenta reintroducción de oxígeno y una acidosis prolongada del tejido durante la reperfusión mejora la condición del corazón frente a la reperfusión; esta protección se redujo en presencia de agentes alcaloides, así como con atrapadores de radicales libres, como el N-2-mercaptopropilil-glicina (57). Estos datos sugieren que la preservación del tejido cardíaco tras el PC podría estar relacionado con un ambiente ácido o un pH menor a 7.23 en el tejido. En este sentido, se sabe que un pH ácido evita la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). En esta condición, la reintroducción gradual de oxígeno podría reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el tejido, evitando el estrés oxidativo por efecto de la reperfusión. Sin embargo, a la fecha no se ha medido el pH ni los productos ácidos generados durante la maniobra de PC,

por lo que en este escenario no se sabe cuál podría ser la relación entre el pH del tejido y el PTPm.

2.3. Inhibición de la activación de los neutrófilos, disfunción endotelial y la respuesta inflamatoria.

La evidencia experimental sugiere que en los primeros minutos de la reperfusión se mimetiza lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria. En ambos casos hay activación de los neutrófilos, así como activación de las células endoteliales; conforme avanza el periodo de reperfusión hay reclutamiento de neutrófilos que de inicio se adhieren al endotelio y finalmente migran al parénquima. Tanto los neutrófilos como las células endoteliales sintetizan mediadores pro-inflamatorios ($\text{TNF}\alpha$, IL-6, IL-8) así como especies reactivas de oxígeno, que en pocos minutos causan daño tisular irreversible.

Se ha demostrado que la maniobra de PC disminuye la disfunción endotelial, reduce la adherencia de los neutrófilos al endotelio así como su acumulación en el miocardio reperfundido y evita la acumulación de $\text{TNF}\alpha$ (58). Por otro lado, se ha observado cardioprotección al eliminar la población de neutrófilos en modelos de oclusión coronaria en rata utilizando antisueros. De manera separada, tanto la eliminación de neutrófilos como el PC redujeron el tamaño del infarto. Sin embargo, la eliminación de neutrófilos y la maniobra de PC no tuvieron un efecto sinérgico, ya que los neutrófilos, al igual que los oxidantes y las moléculas pro-inflamatorias, contribuyen de manera significativa a la patogénesis del daño por reperfusión, por lo que es concebible que los mecanismos que los regulan pueden estar mediados por el PC.

2.4. Proteína G acoplada a receptores.

La proteína G acoplada a receptores (GRP) ha sido implicada en la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento. La estimulación de esta proteína por adenosina u opiodes al inicio de la reperfusión está asociada con una disminución en el tamaño del infarto (59). Basta la estimulación de uno de los receptores para producir un efecto protector. Es muy interesante el hecho de que el bloqueo de los receptores inhibe el efecto protector del PC frente a la reperfusión. A continuación se revisará con detalle la implicación de la proteína G y de sus tres principales receptores en el post-acondicionamiento:

2.4.1. Receptores de adenosina.

De los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), los receptores A_{2A} y A_3 tienen un efecto cardioprotector cuando se activan durante la reperfusión (60). Se ha demostrado que la administración del agonista del receptor A_{2A} (ATL146e) reduce el tamaño del infarto en un modelo de ratón normal, pero no tiene efecto al administrarlo en un modelo de ratón knock-out para el receptor A_{2A} . Estos resultados sugieren que la adenosina actúa atenuando el daño por reperfusión a través de un mecanismo anti-inflamatorio. Otras observaciones indican que el efecto anti-inflamatorio del receptor de adenosina A_{2A} se estimula durante el PC. Se ha demostrado que: **1)** los niveles de adenosina se elevan durante la isquemia y el PC evita que esos niveles regresen a su basal; **2)** la inhibición no selectiva de los receptores de adenosina y la específica del receptor A_{2A} limitan de manera muy notoria el efecto cardioprotector de PC, y **3)** la reducción en la acumulación y la adherencia de los neutrófilos junto con la preservación del endotelio vascular

son consistentes con el efecto fisiológico de la adenosina en modelos de isquemia y reperfusión. Recientemente, el grupo de Philipp et al (2006) ha sugerido que el PC activa al receptor A_{2B} y a la proteína cinasa C, más que al receptor A_{2A} (61). Se sabe que el agonista del receptor A_{2B} (MRS 1754) bloquea el efecto de PC, ya que bajo estas condiciones no hay reducción en el tamaño del infarto; sin embargo a la fecha no hay un modelo de knock-out que pueda afianzar este hallazgo.

2.4.2. Receptores de Bradiquinina.

El grupo de Yang et al (2004) reportó que la administración de bradiquinina durante la reperfusión reduce el tamaño del infarto a través un mecanismo relacionado con la inducción de cinasas de sobrevivencia y la vía de producción de óxido nítrico (62). El grupo de Bell reportó resultados similares en un modelo de isquemia y reperfusión (63). Lamentablemente, a la fecha no hay ningún reporte que relacione la administración de la bradiquinina y el PC.

2.4.3. Receptores opioides.

Se conocen tres subtipos de receptores a opioides μ , δ y el κ . Los receptores δ y κ se expresan en cardiomiocitos. En el corazón se sintetizan tres péptidos opioides: endorfinas, enkefalinas y dinorfinas. La liberación de los péptidos opioides y la subsiguiente estimulación de los receptores δ y κ en el corazón ofrecen cardioprotección. Así pues, se ha demostrado que la administración de opioides de manera exógena al inicio de la reperfusión disminuye el tamaño del infarto (64). Sin embargo, la estimulación del receptor κ durante el periodo de reperfusión no ofrece ninguna cardioprotección, lo cual sugiere que el

mecanismo de acción de la activación de estos receptores obedece a la activación de cinasas de salvamento (RISK). En este sentido se ha identificado la participación de la GSK3 (glucocinasa), al ser fosforilada y por tanto inactivada se obtiene un efecto cardioprotector a través de la modulación de la apertura del PTPm. En este escenario de síntesis y liberación de péptidos opioides por el corazón, en modelos de isquemia/reperfusión, se ha sugerido que estos péptidos pueden jugar un papel parcial en la cardioprotección derivada del PC. El grupo de Kin et al (2005) ha descrito la participación de los péptidos opioides en un modelo de PC; este grupo observó que el efecto del PC se pierde al administrar naloxona, este agonista bloquea en particular a los receptores δ y κ , cuando se administra 5 minutos antes de la reperfusión (65).

2.5. Otras Vías de señalización en el Post-acondicionamiento.

2.5.1. PI3 y MEK- ERK 1/2:

Después de la maniobra de post-acondicionamiento se activan al menos dos cinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión (RISK por sus siglas en inglés: reperfusión injury survival kinase), la PI3 cinasa y la MEK-ERK1/2. La vía de activación de la cinasa PI3/AKT está ligada a la síntesis de óxido nítrico, el cual es un importante regulador de la cardioprotección mediada por PC. La participación de esta cinasa y su relación con la síntesis de óxido nítrico ha llevado a sugerir que los canales de potasio mitocondriales activados por ATP y el poro de la transición de la permeabilidad (PTPm) son mecanismos blancos de la cardioprotección derivada del PC (Figura 2). La regulación de este PTPm es crucial, ya que es un punto clave en la supervivencia o en la muerte celular.

Por otro lado, la inhibición de la actividad de la cinasa PI3 limita la reducción del tamaño del infarto en corazones que se sometieron a la maniobra de PC. De igual manera, la activación de la cinasa MEK-ERK1/2 es un punto clave en la protección de un corazón con la maniobra de PC. Se sabe que la estimulación de la MEK-ERK1/2 durante los primeros minutos de la reperfusión abate los efectos de la reperfusión. Por otro lado la inhibición farmacológica de la MEK-ERK1/2 inhibe el efecto del PC en un modelo de corazón aislado de conejo. La participación de ambas cinasas es consistente con la estimulación de la GPCR (proteína G acoplada a receptores) por ligandos endógenos (66).

2.5.2. Proteína cinasa C (PKC).

La proteína cinasa C ha sido un elemento clave en la cardioprotección derivada tanto del pre- como del post-acondicionamiento. Se sabe que los ligandos de la GPCR estimulan a la fosfolipasa C y que el inositol trifosfato y el diacilglicerol estimulan la actividad de la PKC. En modelos murinos, las isoformas de la PKC que predominan son la δ y la ϵ , ambas involucradas en la patogénesis del daño por isquemia/reperfusión. La isoforma δ se transloca a la mitocondria en los primeros minutos de la reperfusión e induce una mayor producción de radicales libres; se le ha relacionado con una mayor producción del anión súperóxido, con disfunción mitocondrial y con la liberación del citocromo *c* (67). Por otro lado, la isoforma ϵ de la PKC tiene la particularidad de inhibir la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. El grupo de Zatta en 2006 reportó que en un modelo de PC en rata, el uso de un antagonista no selectivo de la PKC (queleritina) inhibe el efecto cardioprotector del PC. El grupo de Penna (2006), obtuvo resultados similares al usar un inhibidor de la

PKC ϵ (KIE-1). Observaron que el tamaño del infarto no disminuyó en presencia del inhibidor en corazones post-acondicionados (68). La maniobra del PC incrementa los niveles de la PKC ϵ respecto a un miocardio sin la maniobra, lo cual sugiere que además de ser translocada a la mitocondria, la PKC ϵ también se transloca a otros sitios. Por el contrario, la translocación de la isoforma PKC δ se reduce en corazones post-acondicionados. Los resultados hasta el momento sugieren que la cardioprotección del PC depende de la actividad de la PKC y que la maniobra mecánica incrementa los niveles de la PKC ϵ , que a su vez reprime los efectos no protectores de la PKC δ (61).

2.6. Especies reactivas de oxígeno y nitrógeno.

La generación de radicales libres durante la reperfusión ha sido implicada como responsable en la patogénesis del daño por reperfusión. Particularmente, el anión superóxido es el principal responsable de la peroxidación de las membranas celulares y de la estimulación de la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina e ICAM- 1 en el endotelio vascular, lo cual favorece la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular.

Las especies reactivas de oxígeno incluyendo al anión superóxido y sus productos (H_2O_2 , $\bullet OH$), al óxido nítrico y sus productos (especialmente el ONOO \bullet), se incrementan durante la reperfusión de un miocardio isquémico y representan uno de los mayores detonantes del daño por reperfusión. Bajo condiciones de estado estacionario, las ERO se producen en la mitocondria cuando se reduce el oxígeno a agua. Las ERO son parte importante de la homeostasis celular, intervienen en procesos de señalización, diferenciación,

mitosis y en la respuesta inmune. Con base en su concentración, las ERO se consideran como los principales responsables del daño por reperfusión. Es interesante, por ejemplo, que la administración de ERO en concentraciones similares a las producidas durante la reperfusión provoca en un corazón los daños característicos de la reperfusión sin haber cursado por ella (69). En el corazón, las ERO se producen en los cardiomiocitos, el endotelio vascular coronario y en las células inflamatorias como los neutrófilos. Las ERO provocan la oxidación de lípidos de membrana y de proteínas, provocan además la ruptura del ADN. Las ERO juegan un papel dual, que las convierte ya sea en moléculas de señalización ó en activadores de mecanismos de daño. El desempeño de una u otra función está basado en diversos factores que se relacionan con: **1)** la concentración sitio-específica de las ERO, **2)** la transformación de las ERO en especies mucho más reactivas (peroxinitrito), **3)** los mecanismos que favorecen la liberación del hierro, que alimenta la reacción de Fenton, y **4)** la activación o el cambio de función de las enzimas generadoras de ERO. Por ejemplo, la actividad basal de la xantina deshidrogenasa cambia a actividad de oxidasa bajo condiciones de isquemia, además, las citocinas y trombinas que se liberan en la reperfusión pueden activar a la NADPH oxidasa del endotelio favoreciendo la producción de ERO.

En la maniobra de post-acondicionamiento se propone que hay una reducción en la producción de ERO y éste podría ser un mecanismo de cardioprotección de la maniobra mecánica frente a la reperfusión. Se ha demostrado en cultivos celulares que la exposición parcial (reducida) a oxígeno disminuye la formación de ERO, simulando lo que podría ocurrir en el PC. En este modelo se demostró

que la disminución en la generación del anión superóxido está asociada con la reducción de la sobrecarga de calcio en la mitocondria y con la inhibición de la muerte celular (70). En modelos animales se ha asociado la maniobra de PC con una menor señal del dihidroéridio que se utiliza como un detector del estado oxidativo celular en el miocardio. Este reporte concuerda con la reducción en la lipoperoxidación en membrana que reportan muchos grupos de investigación en modelos de oclusión coronaria con maniobra de PC y reperfusión (56). Además, se ha demostrado que la maniobra de PC atenúa la generación de ERO del endotelio vascular coronario en el área reperfundida después de 24 horas de reperfusión. Esta reducción es en parte responsable de la preservación de la función endotelial del epicardio de las arterias coronarias, que se observa en un modelo in vivo de corazones sometidos a la maniobra de PC (71). A pesar de que los datos muestran que el post-acondicionamiento reduce la generación de ERO, hay un grupo de investigación que ha perfundido antioxidantes como la N-acetil-cisteína al inicio de la reperfusión y que ha demostrado que el efecto cardioprotector del PC se pierde por efecto de este antioxidante, dejando claro el efecto dual de los mismos (72). Por otro lado, se sabe que el PC mantiene las reservas antioxidantes del miocardio. Se ha demostrado que el PC mantiene los niveles de glutatión (GSH), el mayor sistema celular antioxidante, de modo que el PC no sólo evita el estallido del estrés oxidativo en el miocardio por ERO, sino que también mantiene los niveles de antioxidantes endógenos (73).

2.7. Sobrecarga de calcio.

En los primeros minutos de la reperfusión hay una acumulación masiva de calcio en el citosol, el cual es responsable de activar fosfolipasas, proteasas y nucleasas. En la mitocondria, el Ca^{2+} entra a través del uniportador de calcio permitiendo la acumulación masiva de este ión en el organelo, promoviendo la apertura de un poro no específico transmembranal (PTPm) y un aumento en la generación de especies reactivas de oxígeno, estos procesos convergen en la muerte celular (74). Se sabe que al evitar la sobrecarga de calcio durante la reperfusión, usando inhibidores específicos del uniportador de calcio (por ejemplo el Ru360), se inhibe el daño por reperfusión en un modelo de corazón aislado (4,75).

En el caso del PC, se ha reportado que la maniobra reduce la acumulación de calcio en la mitocondria en un modelo de cardiomiocitos. En este modelo, el grupo de Sun et al (2005) demostró que la sobrecarga de calcio disminuía tras 1 hora, cuando sometían a los cardiomiocitos a una reoxigenación parcial (maniobra de PC), mientras que si lo hacían de manera directa el efecto de sobrecarga de calcio duraba hasta 6 horas (76).

2.8. Transición de la permeabilidad mitocondrial.

La génesis de la lesión por reperfusión después de un periodo de isquemia está íntimamente ligada a la función mitocondrial. La transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza por la apertura de un poro no específico entre las membrana interna y externa mitocondrial, que se denomina poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). La formación de

este poro provoca un colapso total del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y sirve como vía de salida a pequeñas moléculas < 1500 Da y de factores pro-apoptóticos que promueven el inicio y la ejecución de la apoptosis. Una pieza clave en el daño de la reperfusión es la regulación de la apertura de este poro, pues la sobrecarga de calcio, así como el estallido del estrés oxidativo, son fenómenos que promueven su apertura durante los primeros minutos de la reperfusión. Otros inductores de la apertura de este poro durante la reperfusión son la alcalinización del pH intracelular y la fosforilación de proteínas cinasas entre otros factores. Es por ello que la inhibición farmacológica de este poro con ciclosporina A o con análogos de este inmunosupresor evitan el daño por reperfusión. En cuanto a la regulación de este poro durante la maniobra de post-acondicionamiento, se sabe que las mitocondrias aisladas de corazones sometidos a la maniobra de PC, son igual de resistentes a la inducción de la transición de la permeabilidad, que las de corazones perfundidos con un análogo de la ciclosporina A (66). Experimentos posteriores demostraron que la apertura del PTPm se regula por fosforilación mediada por una proteína cinasa AKT (77).

2.9. El papel del post-acondicionamiento en la apoptosis.

La apoptosis es un evolucionado y conservado mecanismo de muerte celular que juega un papel crucial en muchos eventos biológicos, incluyendo el desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis y la remoción celular. La liberación de citocromo c de la mitocondria es un acontecimiento clave en la vía intrínseca de la apoptosis. El mecanismo por el cual esta proteína es liberada al

citocromo c es aún debatido, ya que al menos se han descrito dos vías diferentes. La primera involucra la formación de un canal conductor de citocromo c, formado por oligómeros de la proteína BAX, la segunda propone que la liberación de citocromo c está relacionada con la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm).

En un modelo de isquemia-reperfusión se sabe que la apoptosis juega un papel muy importante en la muerte celular. Se sabe que la inhibición farmacológica de la cascada de señalización apoptótica durante la fase de perfusión detienen los procesos de muerte celular y mejora la función contráctil del corazón (78).

El conocimiento del papel de la apoptosis en la cardioprotección por post-acondicionamiento es limitado. Se sabe que el PC inhibe a proteínas cinasas como la JNK y la p38MAPK, que son reguladores del factor pro-apoptótico BAX. De este modo se ha sugerido que podría haber una disminución en la señalización apoptótica por BAX (79). Aunque aparentemente la vía apoptótica está apagada en corazones sometidos a PC, no se han realizado hasta la fecha experimentos clave como medir la liberación de citocromo c. Por lo cual, no podemos concluir, como en el pre-acondicionamiento, que en la maniobra del PC hay una inhibición de las señales apoptóticas, y aún queda menos clara la contribución de la vía mitocondrial bajo estas condiciones. La relación entre los mecanismos descritos se esquematiza en la Figura 3.

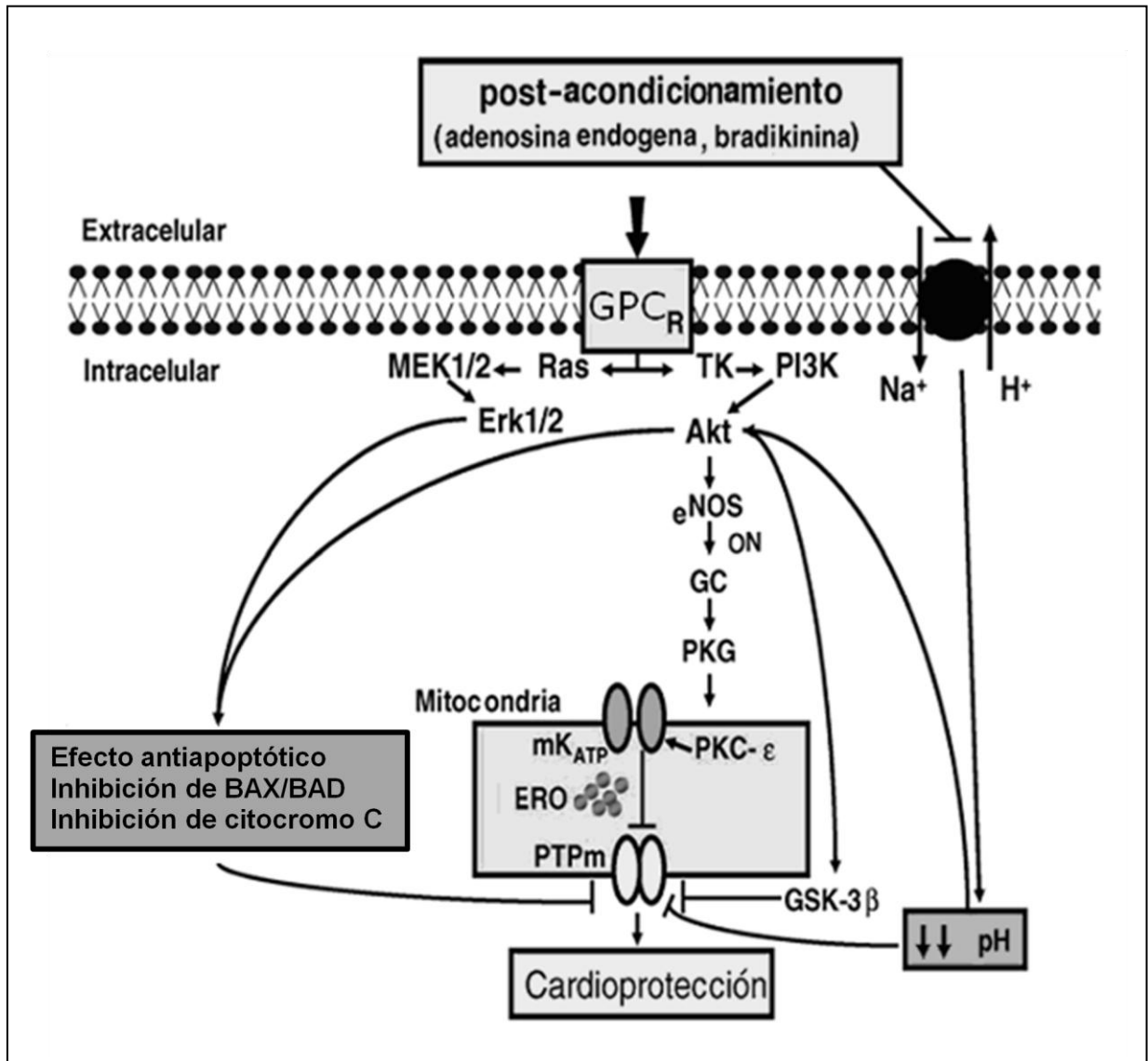


Figura 3. Relación entre diversos mecanismos de cardioprotección activados por el post-acondicionamiento. Muchas de las vías de la señalización convergen en la mitocondria y en específico en el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), la formación de este poro es un evento clave en el mecanismo de cardioprotección por post-acondicionamiento. (GPC_R) proteína G acoplada a su receptor, (ERO) especies reactivas de oxígeno, (PTPm) poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial y (PKC_ε) proteína cinasa C.

III. Antecedentes

A pesar de los cientos de trabajos que han propuesto aplicar estrategias cardioprotectoras al inicio de la reperfusión, sólo unas pocas han sido puestas en práctica. En este sentido, el mejor entendimiento de los mecanismos que ocasionan el daño por reperfusión nos permitirá acercarnos hacia nuevas opciones terapéuticas.

Puesto que las enfermedades isquémicas seguirán ocupando los primeros lugares en los índices de mortandad, la reperfusión sigue siendo el único mecanismo para salvar al corazón de un daño isquémico. Sin embargo la reperfusión tiene también la capacidad de producir daños adicionales en el tejido, lo que reduce el éxito de la reperfusión en sí. Por lo tanto las estrategias protectoras que veían a la reperfusión como una etapa oportuna de cardioprotección han quedado de lado, en el sentido de ver al periodo de reperfusión como una oportunidad de aplicar cualquier tipo de terapias que indujera cardioprotección. Por eso se han desarrollado novedosas estrategias mecánicas buscando favorecer la supervivencia de los pacientes. En el año de 2003 el grupo de Vinten-Johansen reportó una maniobra de naturaleza mecánica que denominó post-acondicionamiento, la cual reducía significativamente el tamaño del infarto en corazones sujetos a un protocolo de isquemia y reperfusión (15). Esta maniobra fue precedida por el pre-acondicionamiento; lamentablemente, esta última tiene una desventaja frente al post-acondicionamiento, ya que su aplicación en la clínica resulta limitada. La maniobra de pre-acondicionamiento consiste en la aplicación cíclica de periodos breves de isquemia y reperfusión que se aplican antes del

establecimiento de una isquemia prolongada y la reperfusión, por lo que resulta difícil su aplicación clínica debido a que el cardiólogo no puede determinar el momento en el que el paciente sufrirá un evento isquémico.

Hasta la fecha, los mecanismos que están involucrados en la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento no son del todo claros. Reportes recientes sugieren que las mitocondrias podrían estar involucradas en la cardioprotección, particularmente el poro de transición de la permeabilidad mitocondrial parece ser un punto fino de regulación. En este sentido se ha demostrado que la administración de un inhibidor del poro de la transición mitocondrial, el compuesto NIM811, produce un efecto similar al del post-acondicionamiento. En mitocondrias aisladas de corazones con NIM811 se determinó que éstas eran igual de insensibles a la inducción de la transición de la permeabilidad que aquellas mitocondrias aisladas de corazones con la maniobra. Otros estudios indican que la cardioprotección depende de la activación de algunas proteínas cinasa como PKC, de los canales de potasio dependientes de ATP en la mitocondria y de la acidosis del tejido cardiaco (10, 57, 60, 61,66). El grupo de Penna, en 2007, sugirió que durante los breves episodios de isquemia y reperfusión aplicados después de la isquemia, hay liberación y acumulación de mediadores que ofrecen cardioprotección. Esto nos llevó a pensar que la maniobra de post-acondicionamiento, podría favorecer que el poro de la transición de la permeabilidad se inhibiera antes del comienzo de la reperfusión prolongada.

Por otro lado, ya que en condiciones de baja concentración de oxígeno las células de mamífero responden estratégicamente favoreciendo la estimulación de vías para la utilización de la glucosa exógena: enzimas glucolíticas y transportadores de glucosa, y a que durante la transición de la fase anaerobia a la fase aerobia, es decir, del metabolismo reductor al oxidativo, la vía glucolítica es de vital importancia para mantener la homeostasis iónica en el tejido isquémico (80,81), propusimos que entre los mecanismos de cardioprotección activados durante el post-acondicionamiento, la glucólisis debería jugar un papel importante.

IV. Hipótesis y Objetivos.

Hipótesis:

Si durante el daño por la reperfusión, la cantidad de ATP proveniente de la fosforilación oxidativa o de vías alternas como la glicólisis está comprometida, entonces la maniobra de post-acondicionamiento garantizará el aporte de ATP y mantendrá la función contráctil del corazón.

Objetivos generales:

- Determinar la relación entre el PTPm y la protección miocárdica derivada del post-acondicionamiento en un modelo de corazón aislado.
- Dilucidar el papel que juega la vía glucolítica en la cardioprotección favorecida por el post-acondicionamiento en un modelo de corazón aislado.

V. Materiales y Métodos.

1. Protocolos de reperfusión y post-acondicionamiento.

Se utilizaron ratas wistar machos de entre 400-450 g, que se anestesiaron con pentobarbital sódico (60 mg/Kg) en presencia de heparina sódica (1000 U/kg). Cinco minutos después se hizo una toracotomía y el corazón fue extraído y montado en el aparato de perfusión de corazón de Langendorff. Los corazones fueron perfundidos vía aorta, en modo retrógrado, con un flujo constante de 12 ml/min con medio Krebs-Henseleit. La solución Krebs-Henseleit contiene 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.18 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.25 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , con 5 mM de glucosa como sustrato; este medio se mantuvo en una atmósfera de 95% de O_2 y 5% de CO_2 a 37 °C. El trabajo cardíaco se midió introduciendo un balón de látex en el ventrículo izquierdo, que se conectó a un transductor de presión. Los corazones fueron estabilizados durante 20 minutos con medio Krebs-Henseleit antes de someterlos a una isquemia total de 30 minutos. El tiempo de estabilización se utilizó alternativamente para inhibir la glucólisis, perfundiendo al corazón con 100 μM de ácido yodoacético. La maniobra de post-acondicionamiento consistió en la aplicación de 5 ciclos de isquemia-reperfusión de 30 segundos de duración cada uno. Después de la aplicación de los ciclos el corazón se reperfundió por 60 minutos ($\text{I/R}_{60}+\text{PC}$). Los corazones sin post-acondicionamiento fueron reperfundidos durante 60 minutos (I/R_{60}). Se tomaron registros de presión ventricular y frecuencia cardíaca cada 10 minutos. Los protocolos se representan en la Figura 4.

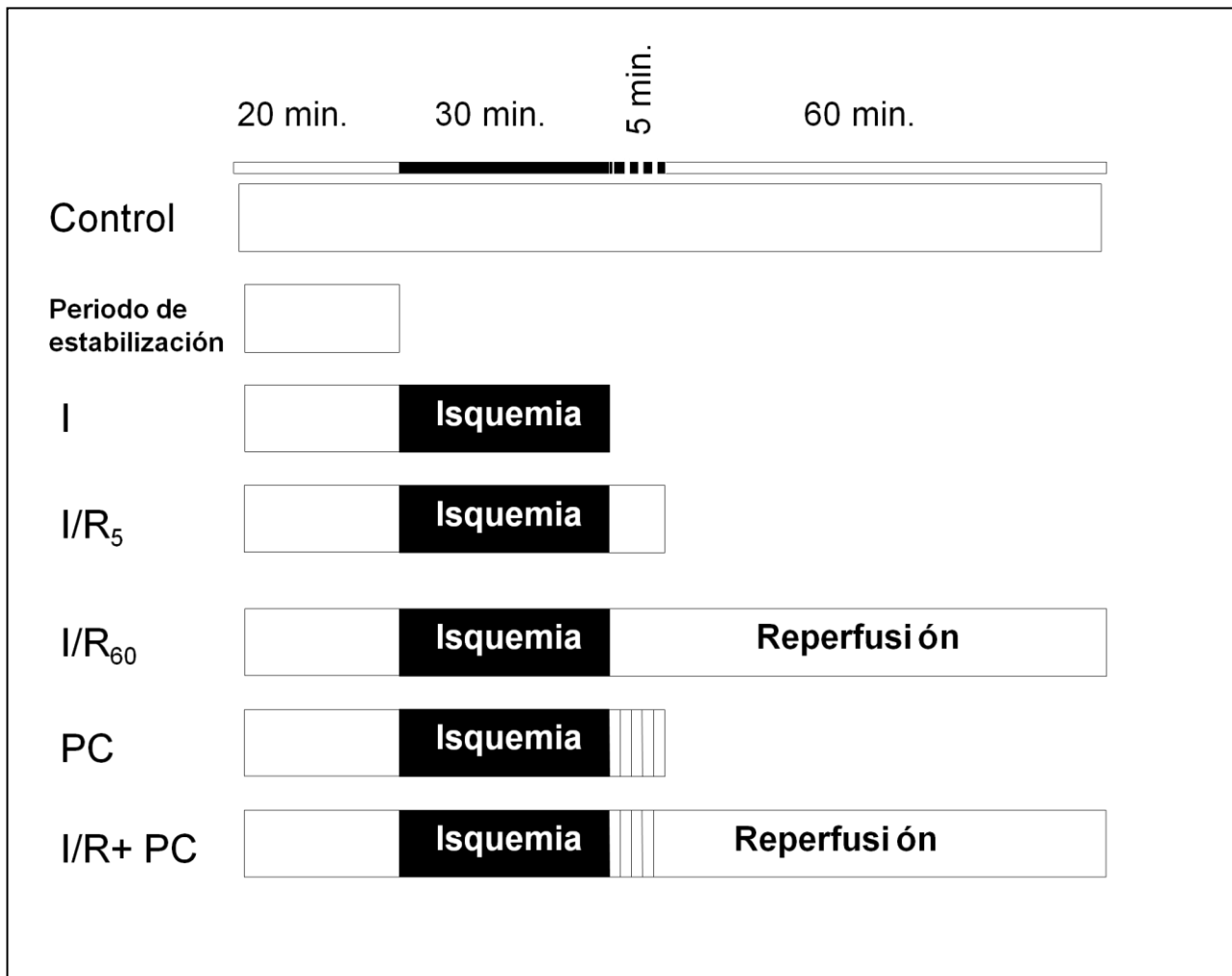


Figura 4. Representación esquemática de los tiempos de ischemia y reperfusión en los corazones sometidos a los diferentes protocolos de investigación. Los corazones **controles** representan aquellos corazones perfundidos por 110 minutos. El periodo de estabilización representa el tiempo del protocolo donde se fijan los corazones en frecuencia cardiaca y presión ventricular, además este tiempo se utilizó también para perfundir inhibidores, por ejemplo de la glucólisis, como se discutirá adelante. **I**, representa a corazones que sólo sufrieron ischemia sin reperfusión. **I/R 5 y 60**, representan corazones con ischemia de 30 minutos y reperfusión de 5 y 60 minutos respectivamente. **PC**, representa un corazón con ischemia y solo con la maniobra de post-acondicionamiento sin reperfusión, finalmente **I/R +PC**, representa aquellos corazones con la maniobra y reperfundidos por 60 minutos.

2. Obtención de fracciones celulares.

Al término del periodo de isquemia-reperfusión, los corazones fueron desmontados y se obtuvieron mitocondrias, además de las fracciones correspondientes a citosol y membrana plasmática (apartado 5). Para la obtención de mitocondrias, el proceso se llevó a cabo a 4°C. Los corazones se desmontaron del aparato de perfusión y se pusieron en una solución de 250 mM sacarosa, 10 mM TRIS, 1 mM EDTA, pH 7.4 en presencia de 1mg/ml de subtilina A. Después de la incubación el tejido se lavó con el medio antes descrito y se homogenizó; este homogenado se centrifugó a 700 g por 10 minutos, se recuperó el sobrenadante, que fue nuevamente centrifugado a 11,200 g por 10 minutos; como resultado de esta centrifugación se separaron los botones (mitocondrias) y el sobrenadante (citosol). Los botones se resuspendieron en el medio antes descrito y se centrifugaron a 11,200 g por 10 minutos. La proteína de las diferentes fracciones se cuantificó por el método de Lowry (82).

3. Medición de la integridad mitocondrial.

La integridad se midió a través del consumo de oxígeno, hinchamiento mitocondrial, entrada y acumulación de calcio y contenido de NAD⁺. El hinchamiento mitocondrial se siguió midiendo los cambios en la absorbencia a 540 nm en un medio que contenía 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM Pi , 10 mM succinato, 160 μM ADP, 5 μg/ml de rotenona, 0.5 μM CCCP y 50 μM CaCl₂. Los movimientos de calcio se midieron espectrofotométricamente usando el indicador metalocrómico Arsenazo III a una longitud dual de 675-685 nm en el medio antes descrito. El contenido de NAD⁺ se midió a partir de

extractos mitocondriales ácidos. El precipitado de los extractos se neutralizó con TRIS-KOH y se cuantificó fluorométricamente midiendo la actividad de la lactato deshidrogenasa ($\lambda_{ex}=360$ nm y $\lambda_{em}= 460$ nm). Se cuantificaron los valores de NADH mediante una curva patrón.

4. Determinación del contenido de ATP y de la fosfocreatina.

Se obtuvieron extractos ácidos neutralizados a partir del tejido cardíaco. El contenido de ATP se determinó fluorométricamente siguiendo la reducción de NAD^+ ($\lambda_{ex}=340$ nm y $\lambda_{em}= 460$ nm) en el siguiente medio de reacción: 50 mM TRIS, 10 mM $MgCl_2$, 5 mM EDTA, 50 U/ml hexocinasa (HK), 50U/ml glucosa 6-fosfatasa(G6P), pH 7.4 y 0.5 ml de extractos ácidos neutralizados. Para cuantificar los valores de fosfocreatina (PCr), se utilizó este mismo sistema, solo se agregó 20U/ml de creatina cinasa (CK) (Figura 5). Los valores de NADH se calcularon de acuerdo a una curva patrón.

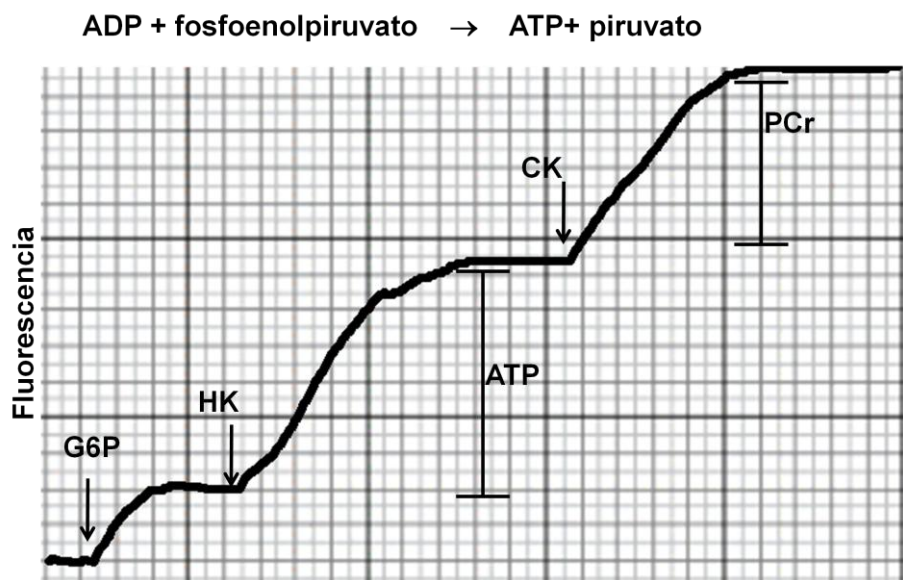


Figura 5. Trazo representativo de la determinación fluorométricamente de ATP y fosfocreatina.

5. Activación de la vía glucolítica.

La inserción de GLUT4 se midió en las fracciones de membrana plasmática aisladas a partir de homogenados de corazón. Los corazones se congelaron de inmediato en nitrógeno líquido una vez que concluyó el tiempo de reperfusión. Los corazones se molieron en un mortero manteniendo la temperatura con nitrógeno. Los homogenados de corazones se resuspendieron en un medio con 0.2 M TRIS -HCL, 10 mM EDTA, 0.25 M de sacarosa, 0.2 mg/ml de benzilamida, 10 mg/ml de aprotinina, 1mM PMSF, 100 mM de fluoruro de sodio, 10 mM de fosfato de sodio y 1 mM de ortovanadato, pH 7.4. Los homogenados se centrifugaron a 8700 g por 20 minutos. Los pellets en los que se encuentra el sarcolema fueron resuspendidos en el medio antes mencionado y centrifugados a 750 g por 10 minutos. Los sobrenadantes fueron entonces centrifugados a 10 000 g por 30 minutos, finalmente el sobrenadante de este último paso, se centrifugó a 48000 g por 60 minutos. Las proteínas de la membrana plasmática obtenidas por este protocolo de centrifugaciones diferenciales se separaron por electroforesis desnaturizante en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y las proteínas se transfirieron a membranas de nylon. Las inmunotransferencias se incubaron con anticuerpos anti-GLUT4 (1:2000). Como control interno de carga de proteína, las inmunotransferencias se incubaron con anticuerpos contra la isoforma 1 α .de la ATPasa de Na⁺/K⁺.

6. Oxidación de proteínas y actividad de la aconitasa en corazones con post-acondicionamiento.

Para evaluar el papel del estrés oxidativo en los corazones con post-acondicionamiento, se midió la oxidación de proteínas en homogenados de corazón con el kit OxyBlot™ (Chemicon® International, Inc). Se homogenizaron corazones en PBS pH 7.0 con 1 mM de PMSF y 50 mM de DTT. Dos alícuotas de cada muestra (20 µg) se desnaturalizaron con SDS al 6%, una de las alícuotas fue derivatizada a 2,4 DNP con 2,4 DNPH, la otra sirvió como control. Las muestras se neutralizaron y se separaron en SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de PVDF y las membranas se incubaron con anti-DNP (1:150), se utilizó como segundo anticuerpo anti-conejo IgG (1:300). La respuesta de los anticuerpos se determinó con un agente quimioluminiscente.

La actividad de la aconitasa se evaluó en muestras mitocondriales de corazones de los diferentes protocolos, midiendo la formación de cis-aconitato a 240 nm. Se incubó una alícuota de 100 µg de proteína mitocondrial en un medio de fosfatos 25 mM con 0.05% de Tween 20 pH 7.4, suplementado con 1 mM de citrato. La reacción se inició con 0.6 mM de cloruro de manganeso, se calculó la velocidad inicial utilizando el coeficiente de extinción molar ($\epsilon=3.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ cis- aconitato).

7. Liberación del citocromo c de preparaciones mitocondriales.

El contenido de citocromo c se cuantificó en inmunotransferencias a partir de proteínas mitocondriales de los corazones de los diferentes protocolos de perfusión. Las proteínas se separaron en geles desnaturalizantes (SDS-PAGE) y se transfirieron a membranas de PVDF, en donde se detectó la presencia del

citocromo. Se uso un anticuerpo primario monoclonal contra citocromo c (1:1000). Se utilizó un segundo anticuerpo conjugado con fosfatasa alcalina. La respuesta de los anticuerpos se midió con un sistema quimioluminiscente.

8. Consumo de glucosa.

La utilización de glucosa se midió en los eluados de corazón usando [5-³H] glucosa, de acuerdo al método de Liang et al. (83). Este método se basa en la liberación del ³H de la [5-³H]glucosa en forma de agua tritiada durante la reacción catalizada por la triosa fosfato isomerasa; en caso de que la reacción no estuviera en equilibrio, existe una oportunidad posterior de liberar el ³H de esa posición en forma de agua tritiada en la reacción catalizada por la enolasa. Una vez estabilizados los corazones en medio Krebs-Henseleit, se perfundieron 5 mM de glucosa (1 μ Ci/ml) durante 20 minutos más. Se colectaron 0.5 ml del eluado en un tubo eppendorf sin tapa cada diez minutos antes de la isquemia global y en los primeros minutos de la reperfusión, hasta completar 60 minutos del periodo de reperfusión. No se modificaron las concentraciones iónicas del medio Krebs-Henseleit. Las alícuotas del eluado se equilibraron con agua en un vial herméticamente sellado a 37 °C por 72 horas. A cada vial se le agregaron 25 μ l de 0.6 N de HCL para evitar el crecimiento bacteriano. Al término de la incubación se adicionó una alícuota de la muestra incubada a un vial con líquido de centello y se leyeron las cuentas por minuto para cada muestra. Los resultados se expresaron como pmoles de equivalentes de glucosa utilizada según la fórmula insertada en la figura 5.

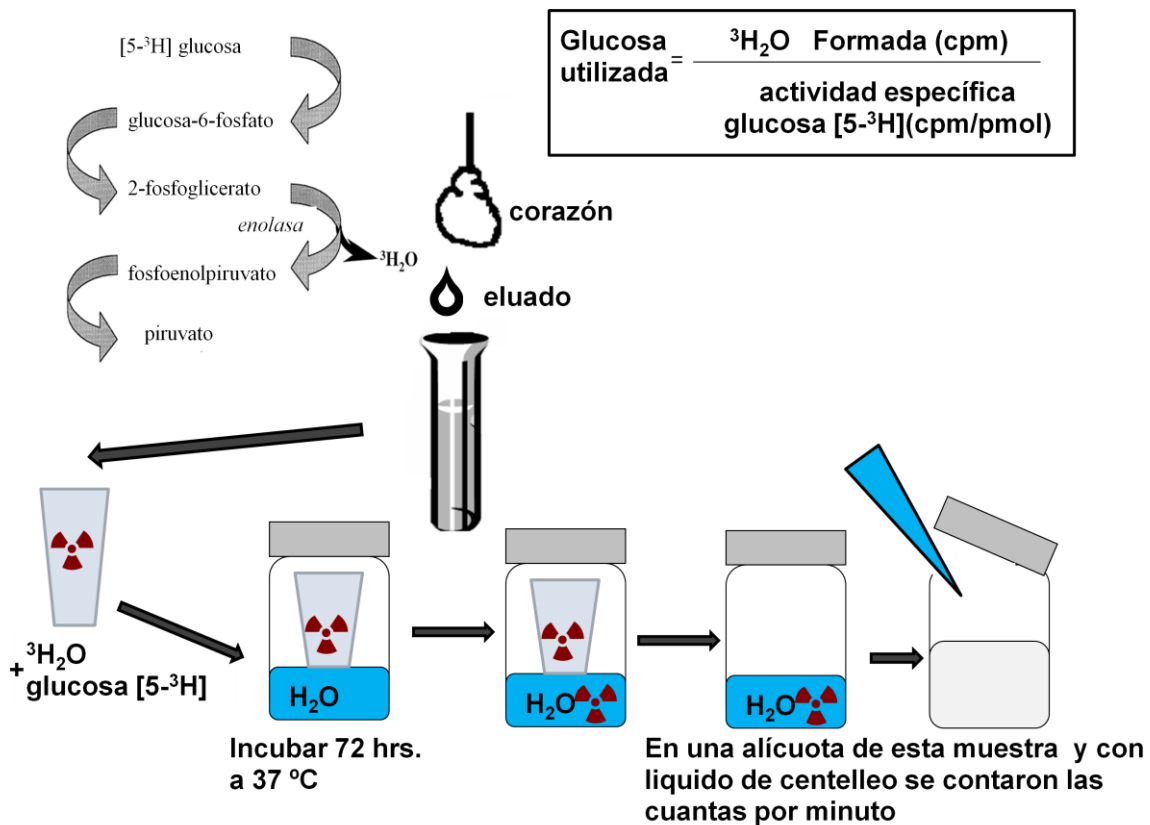


Figura 6. Representación del protocolo para medir el consumo de glucosa marcada radioactivamente en el eluado de corazones con los diferentes protocolos de perfusión, el inserto corresponde a la fórmula para calcular las pmoles de glucosa utilizada.

9. Contenido de lactato.

Se midió el contenido de lactato como un indicador de la activación de la glucólisis en eluados de corazón a los diferentes tiempos del protocolo de perfusión. Se obtuvieron extractos ácidos del eluado de cada corazón, los cuales fueron neutralizados con KOH. Entonces, 0.2 ml del extracto neutralizado se incubaron en un medio que contenía 0.4 M de hidracina, 0.5 M

de glicina y 10 mM NAD⁺. Se midió la actividad de la lactato deshidrogenasa, evaluando la producción de NADH espectrofotométricamente a 340 nm. El contenido de NADH fue extrapolado a una curva de concentraciones conocidas de NADH.

10. Actividad de la hexocinasa.

Se midió la actividad de esta enzima acoplada a la reacción de la hexocinasa/glucosa-6-fosfato deshidrogenasa en extractos de corazones de los diferentes protocolos. Se determinó la aparición de NADPH espectrofotométricamente ($\epsilon=6.22 \text{ mM}^{-1}$) en un medio de reacción compuesto de 100 mM de KCl, 50 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, 2 U G6PDH, 1mM NADP, 15 mM MgCl₂, 3 mM de glucosa y 0.1 mg de citoplasma de corazón. Por otro lado, 0.02 mg de proteínas citosólicas se separaron en geles desnaturizantes (SDS-PAGE), los geles se transfirieron a membranas de PVDF en donde se detectó la presencia de la enzima hexocinasa con anticuerpos a una dilución 1:1000, usando como control de carga anti α -tubulina (1:2000). La señal fue detectada por quimioluminiscencia.

11. Inhibición de la vía glucolítica.

Para evaluar el efecto de la inhibición de la vía glucolítica en la cardioprotección por post-acondicionamiento, se adicionó al medio de perfusión 0.1 mM de ácido yodoacético y se perfundió por 20 minutos, previo al periodo isquémico. Otro grupo de corazones fue perfundido con 5 mM de piruvato y 5 mM de 2-desoxi-D-glucosa por 20 minutos antes de la isquemia. Después los

corazones fueron sometidos a la maniobra de post-acondicionamiento y a la reperfusión prolongada.

12. Análisis de datos.

Los datos son presentados como la media \pm SD de cada grupo de experimentos, la significancia en la mayoría de los casos fue de $P \leq 0.005$ y se determinó utilizando análisis de varianza (ANOVA). Los gráficos se realizaron utilizando el programa Microcal Origin™ INC 1999.

VI. Resultados.

1. Función Cardíaca.

Se probaron varios protocolos (ciclos) de isquemia reperfusión para reproducir el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento. El protocolo con el que se obtuvo una recuperación de casi el 100 % respecto al control fue aplicando 5 ciclos de isquemia- reperfusión de 30 segundos cada uno, después de una isquemia de global de 30 minutos.

Se midió el trabajo cardíaco durante todo el protocolo de perfusión, es decir, se tomaron registros de la frecuencia cardíaca (latidos por minuto) y de la presión ventricular (mmHg) cada 10 minutos. Los corazones sometidos a 30 minutos de isquemia y 60 minutos de reperfusión (I/R₆₀) mostraron un abatimiento del trabajo cardíaco a partir del minuto 20 de la reperfusión y hasta el final de la misma; por el contrario, los corazones sometidos a las maniobras de post-acondicionamiento recuperaron su función contráctil desde los primeros minutos de la reperfusión y hasta el final del protocolo (I/R₆₀+PC). No hubo diferencia significativa en el trabajo cardíaco de los corazones post-acondicionados con respecto a los corazones controles del minuto 20 hasta el minuto 60 de la reperfusión (Figura 7).

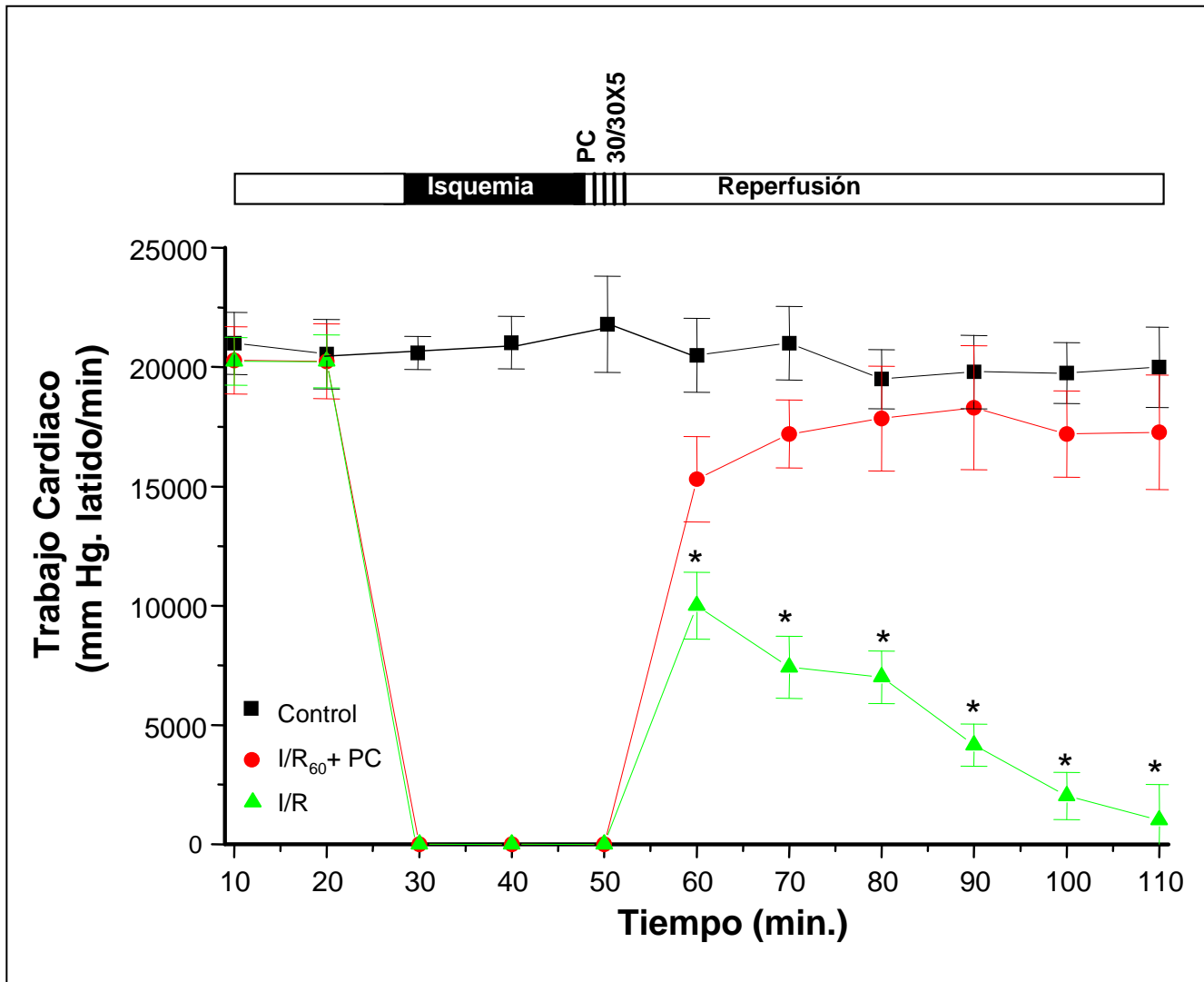


Figura 7. La maniobra de post-acondicionamiento protege al corazón del daño por reperfusion. Después de 20 minutos de estabilización los corazones fueron sometidos a una isquemia total de 30 minutos. Se restableció el flujo (encendido del sistema peristáltico) y comenzó el tiempo de reperfusion (I/R, I/R₆₀+PC). En el caso de los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento, después del periodo de isquemia los corazones cursaron por 5 ciclos de isquemia y reperfusion de 30 segundos, al término de los ciclos los corazones fueron reperfundidos por 60 minutos. * $P \leq 0.05$ vs control, $n=14$.

2. Integridad mitocondrial y apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial: su relación con el estrés oxidativo y la apoptosis.

Una vez que concluyó el tiempo de reperfusión, los corazones fueron desmontados del sistema de perfusión y el tejido se utilizó para aislar mitocondrias y otras fracciones celulares (descrito en material y métodos). Se evaluó el consumo de oxígeno y el control respiratorio en mitocondrias aisladas de corazones de los diferentes protocolos de isquemia-reperfusión (Tabla 1). Las mitocondrias aisladas de corazones con post-acondicionamiento, utilizando glutamato-malato como sustrato, mostraron valores comparables de consumo de oxígeno y control respiratorio a los de mitocondrias aisladas de corazones control, lo que indica que se mantiene la capacidad de acoplar la oxidación de sustratos por la cadena respiratoria a la síntesis de ATP.

En el caso de los corazones sometidos a isquemia y reperfusión no se observó el estímulo del estado 3 de la respiración (dependiente de ADP), lo que indica que no hay síntesis de ATP. El resultado fue el mismo cuando se usó succinato como sustrato.

Tabla 1. Consumo de oxígeno en mitocondrias aisladas de corazones con la maniobra de post-acondicionamiento.

	Estado 4 Glu+Mal	Estado 3 Glu+Mal	Control respiratorio	Estado 4 succinato	Estado 3 succinato	Control respiratorio
Control	53.0	169.5	3.2	15.2	81.3	5.3
I/R ₆₀	39.6	39.6	1	41.6	41.6	1
I/R+PC	56.5	224.7	3.9	30.3	88.9	4.3

Los experimentos se hicieron a temperatura ambiente en 1.7 ml de medio básico con 125 mM de KCl, 10 mM HEPES y 3 mM de fosfato, pH 7.3. Al medio básico se le agregó 2 mg de proteína mitocondrial, usando como sustrato 5 mM de glutamato- 5 mM de malato o bien, 10 mM de succinato con 1 µg/ml de rotenona. La estimulación del estado 3 se hizo adicionando 200 µM de ADP. Las velocidades de consumo de oxígeno están dadas en ngAtO/min/mg, los datos representan el promedio de 2 experimentos diferentes, con 3 repeticiones en cada uno de ellos.

Para evaluar la apertura del PTPm se midieron parámetros como el hinchamiento mitocondrial, el transporte de calcio y el contenido de NAD⁺ en preparaciones mitocondriales obtenidas de corazones sometidos a los diferentes protocolos. Se ha propuesto al incremento en la permeabilidad de las membranas como un mecanismo que explica el daño irreversible resultado de la isquemia y la reperfusión. En este sentido, era importante demostrar que las mitocondrias de corazones con la maniobra de post-acondicionamiento son resistentes a la inducción de la transición de la permeabilidad mitocondrial.

En la figura 8 A se muestran trazos representativos de hinchamiento mitocondrial y cambios en la concentración de calcio en el medio de

incubación. Sólo las mitocondrias de corazones con isquemia-reperfusión (I/R₆₀) mostraron hinchamiento espontáneo. En contraste, las mitocondrias de los corazones control y de corazones con I/R₆₀+PC no mostraron hinchamiento, sino hasta que se agregó el desacoplante CCCP. Este compuesto, al inducir la disipación del gradiente electroquímico de protones, promueve la apertura del PTPm y por tanto el hinchamiento mitocondrial.

En la figura 8 B, se muestran también los movimientos de calcio en mitocondrias de corazones controles, I/R₆₀ y I/R₆₀ + PC. Las mitocondrias de los corazones I/R₆₀ fueron incapaces de retener el calcio en su interior, señal inequívoca de la apertura del PTPm. Por otro lado, las mitocondrias de corazones controles y de I/R₆₀ + PC mantuvieron la capacidad de captar y mantener calcio. El efecto protector del post-acondicionamiento contra el daño por reperfusión fue comparable a la protección que confiere la perfusión de corazones con el inhibidor clásico del PTPm: la ciclosporina A (no se muestra el trazo).

Se ha demostrado que el contenido de adenín nucleótidos en la mitocondria disminuye dramáticamente como consecuencia de la apertura del poro de la transición inducido por el daño por reperfusión y que la pérdida de NAD⁺ se revierte en corazones reperfundidos con CSA. Por tanto, la medición de NAD⁺ se ha utilizado como un parámetro para determinar el estado en que se encuentra el PTPm *in situ*.

Para dilucidar el estado de apertura del poro en condiciones de post-acondicionamiento, cuantificamos el contenido de NAD⁺ en los diferentes

protocolos de reperfusión. Encontramos que éste disminuye desde los primeros minutos de reperfusión en las mitocondrias de los corazones I/R₅ (Figura 9) y su disminución es proporcional al tiempo de reperfusión. En los corazones con post-acondicionamiento que se mantuvieron en reperfusión durante 60 minutos, no hubo decremento en el contenido de NAD⁺ y los valores son comparables a los de las mitocondrias de corazones control.

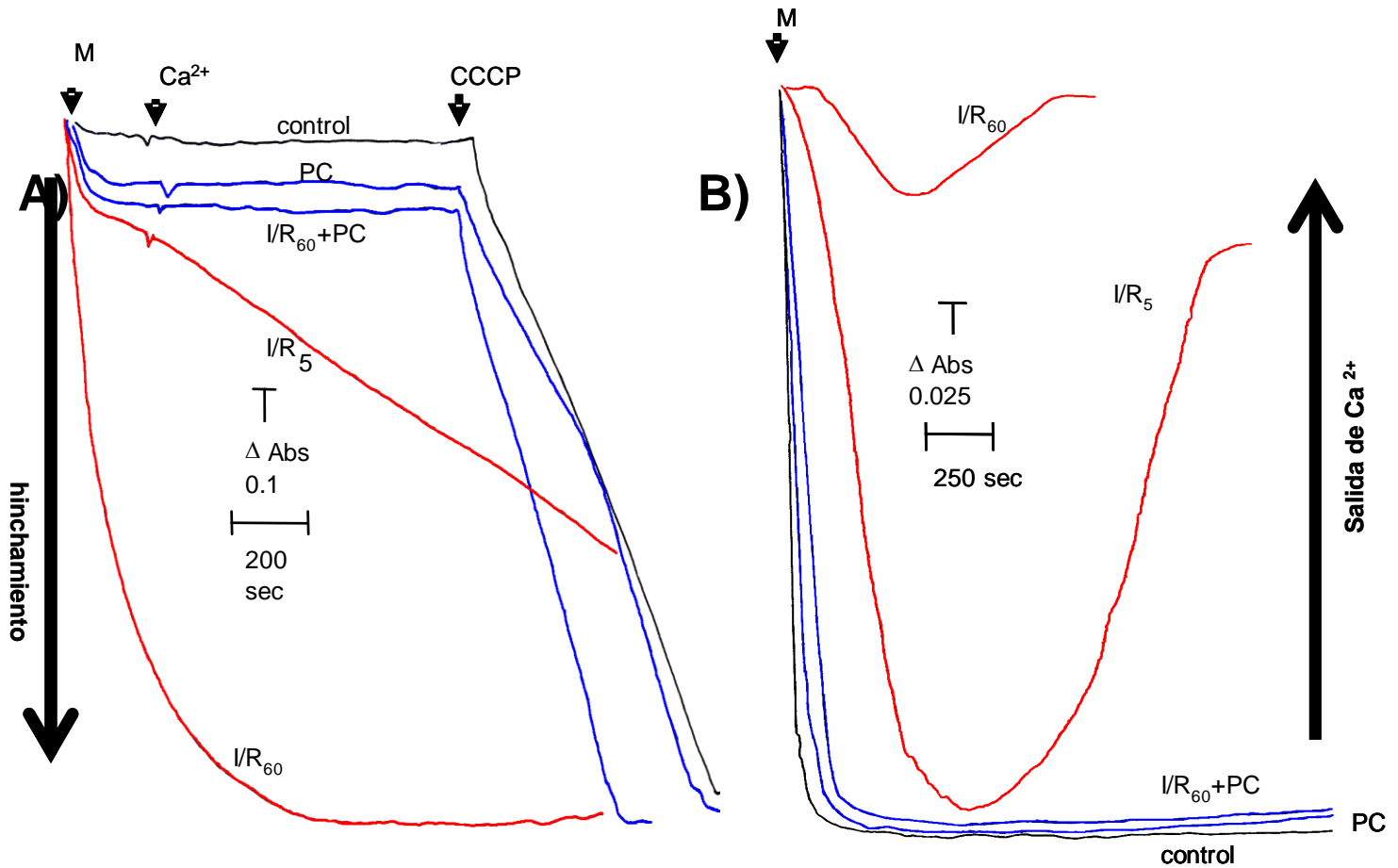


Figura 8. Transición de la permeabilidad en mitocondrias aisladas de corazones con post-acondicionamiento y sujetos a isquemia-reperfusión. Se incubaron 2 mg de proteína mitocondrial (M) en 3 ml del medio básico descrito en material y métodos. A) El hincharamiento mitocondrial se monitoreó continuamente a 540 nm. El hincharamiento total se indujo con 0.5 μM de CCCP. B) El transporte de calcio mitocondrial se midió a 675-685 nm en presencia de 50 μM de Arsenazo III.

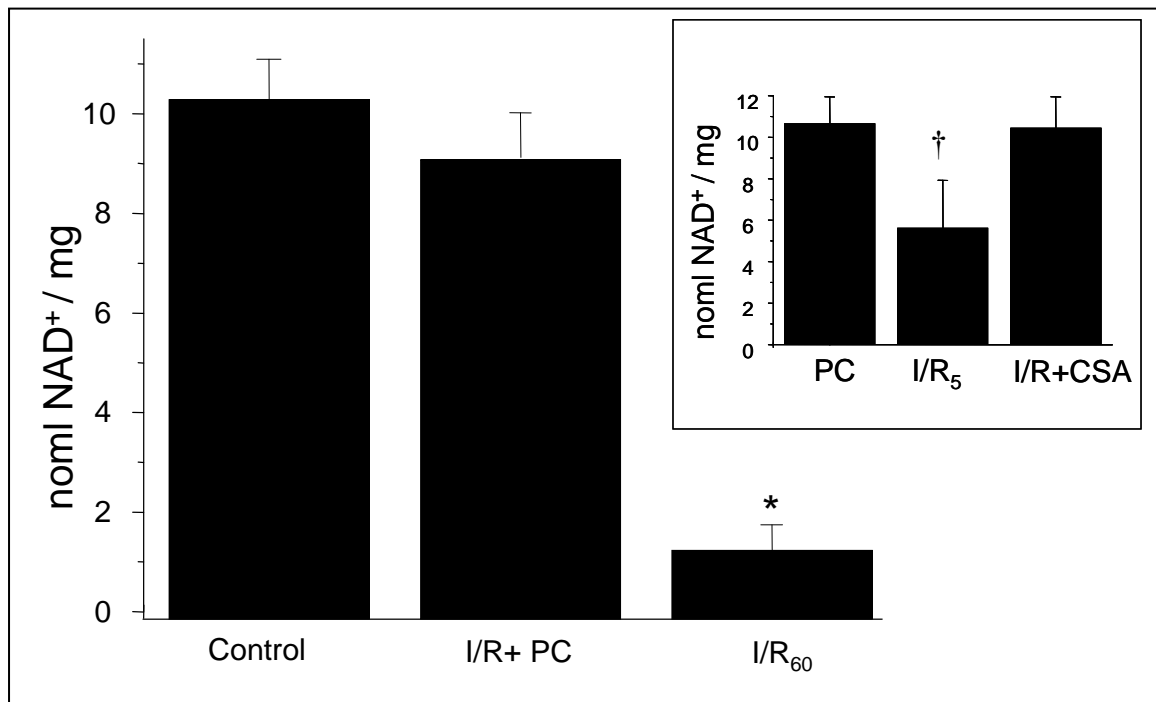


Figura 9. Contenido de NAD^+ en mitocondrias aisladas de corazones sometidos a reperfusion. El inserto muestra el contenido de NAD^+ justo antes del inicio de la reperfusion, bajo estas condiciones se tom6 como control un coraz6n con una reperfusion de 5 minutos. En los corazones I/R + CSA, se perfundi6 con $0.2 \mu\text{M}$ de CSA antes de la isquemia y de la reperfusion. Los datos representan la media de tres experimentos independientes \pm D .S. * $P \leq 0.05$ vs control y † $P \leq 0.05$ vs I/R +PC.

La relación entre la función contráctil del miocardio y la bioenergética del cardiomiocito está centrada en la producción de ATP, por lo que se determinó el contenido de ATP en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. Se encontró que el contenido de ATP y fosfocreatina en estos corazones fue equivalente al de los corazones controles. Por el contrario, el contenido de ATP disminuyó dramáticamente durante el periodo de la reperfusión (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de ATP en corazones con post-acondicionamiento.

nmol/mg protein	Control	Ischemia	I/R	I/R+PC	I/R+PC+IAA
ATP	19.6±2.2	10.6 ±1.4*	5.4 ±1.6*	17.6 ±2.4	9.21±1.6
PCr	27.3 ±2.5	8.3 ±2.8*	2.3 ±0.3*	22.1 ±4.7	n.e

Tabla 2. Efecto del post- acondicionamiento en el contenido de ATP en el citosol de corazones sometidos a reperfusión. Los datos representan la media de seis diferentes experimentos ± S. D * P ≤0.05 vs. Control y vs I/R + PC. n.e:valor no estimado

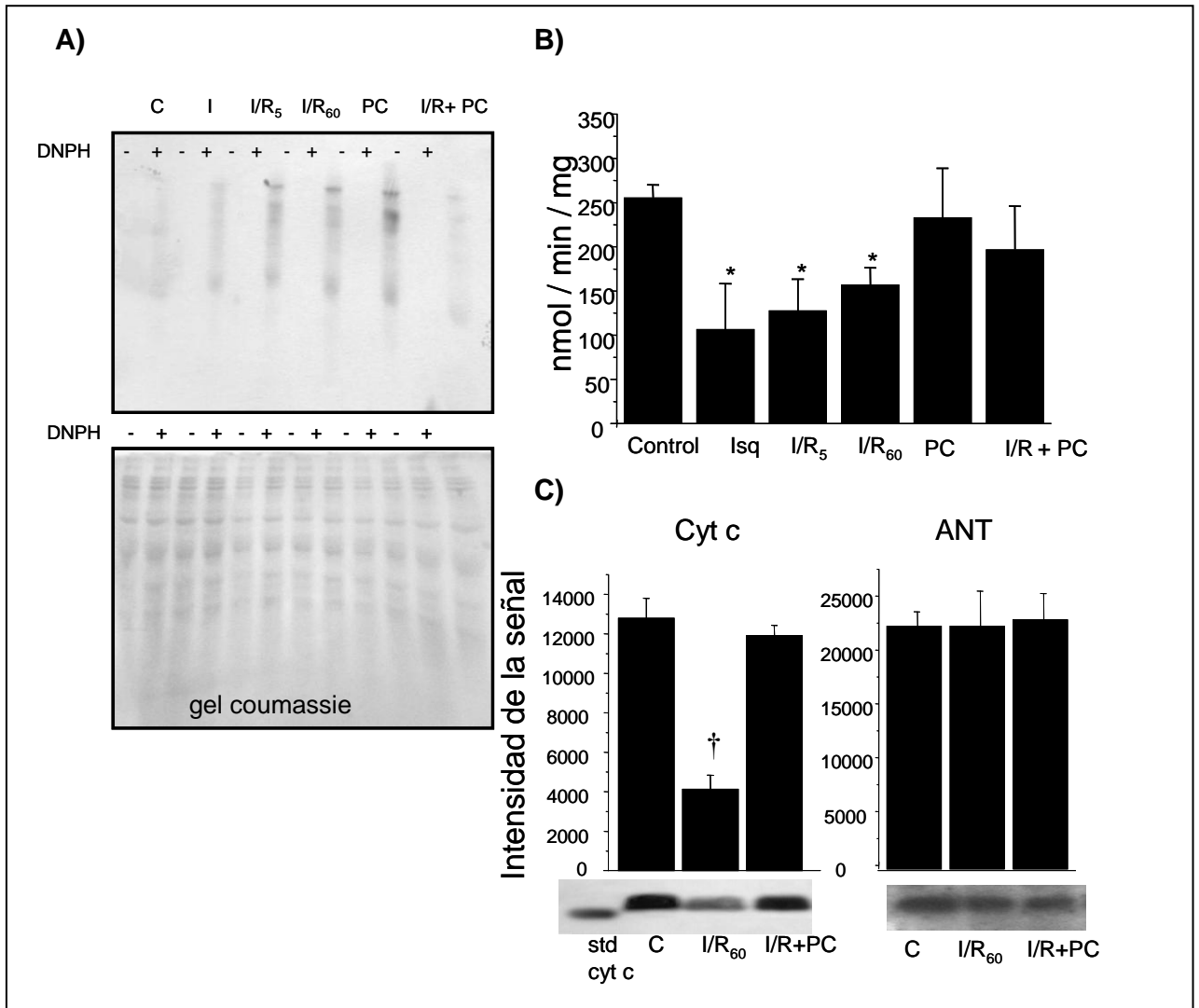


Figura 10. Relación de la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial con el estrés oxidativo y el inicio de la apoptosis intrínseca. **A)** Autoradiografía de las modificaciones que sufren las proteínas por efecto del estrés oxidativo. En las proteínas oxidadas hay introducción de grupos carbonilo en las cadenas polipeptídicas, los grupos carbonilo son derivatizados a DNP y detectados con Anticuerpos anti-DNP. **B)** Actividad de la aconitasa mitocondrial, expresada como desviación estándar \pm SD. * $P \leq 0.05$ vs control. **C)** Contenido de citocromo c en mitocondrias de corazones con post-acondicionamiento, detectado con anticuerpos específicos para el citocromo c. Se usó como control de carga la adenín nucleótido translocasa (ANT). El contenido de citocromo c se expresa como intensidad de la señal. Se muestra una inmunotransferencia representativa, donde el primer carril corresponde al estándar de citocromo c de equino. † $P \leq 0.05$ vs contro.

Estos datos demuestran que las maniobras de post-acondicionamiento inducen el cierre del PTPm durante la reperfusión y más aún, la maniobra promueve el cierre de este poro antes de la reperfusión prolongada (PC) y permanece así hasta el final de la misma. Además, la maniobra de post-acondicionamiento mantiene los niveles de ATP. En este sentido nos preguntamos qué tan importante es el aporte de ATP de origen glucolítico para la cardioprotección tras los ciclos de isquemia reperfusión. Dado que la fosforilación oxidativa no es la única vía para la obtención de ATP en condiciones de isquemia prolongada.

La oxidación de proteínas por efecto del estrés oxidativo se traduce en la adición de grupos carbonilo en las cadenas polipeptídicas, que se pueden derivatizar a dinitrofenil hidrazona (DNP) y detectar con anticuerpos primarios que reconocen específicamente los grupos DNP en las proteínas. La modificación de las proteínas por el estrés oxidativo fue muy evidente desde los primeros 5 minutos de reperfusión en los homogenados de corazones sometidos a isquemia y reperfusión de 5 minutos, y esta señal se intensificó cuando se prolonga el tiempo de reperfusión. Aunque se observó carbonilación de proteínas en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento, esta señal disminuyó claramente al término de la reperfusión (Figura 10 A).

Siguiendo con el efecto del estrés oxidativo en la mitocondria, se midió la actividad de la aconitasa, una enzima que cuenta con un centro Fe-S esencial para su actividad, que se inactiva por la presencia del anión superóxido o el peroxinitrito, por lo que resulta ser una enzima marcadora de estrés oxidativo

en las mitocondrias. La actividad en las mitocondrias de corazones isquémicos con reperfusión de 5 y 60 minutos fue significativamente menor a la encontrada en corazones controles; en cambio, en los corazones exclusivamente con la maniobra o bien con la maniobra y reperfundidos por 60 minutos, dicha actividad no se modificó. (Figura 10 B).

Para determinar si el disparo de la apoptosis intrínseca es inhibida por el efecto del post-acondicionamiento, se midió el contenido de citocromo c en mitocondrias sometidas a isquemia y reperfusión con la maniobra de post-acondicionamiento. El contenido de esta proteína pro-apoptótica se midió mediante inmunotransferencia. Hubo una clara disminución del contenido de citocromo c en las mitocondrias de corazones con isquemia y reperfusión de 60 minutos, en comparación con el contenido de citocromo c de corazones sujetos a la maniobra de post- acondicionamiento (Figura 10 C).

3. Translocación del transportador de glucosa 4 a membranas de sarcolema.

Los datos del contenido de ATP en corazones isquémicos nos llevaron a analizar el papel de la glucólisis en el corazón post-acondicionado, ya que en este procedimiento se aplican periodos breves de hipoxia. Para correlacionar los niveles de ATP con un aumento en el consumo de glucosa, medimos como una primera aproximación, la inserción del transportador de glucosa (GLUT4) en fracciones de membrana plasmática de corazones sometidos a los diferentes protocolos de reperfusión (Figura 11).

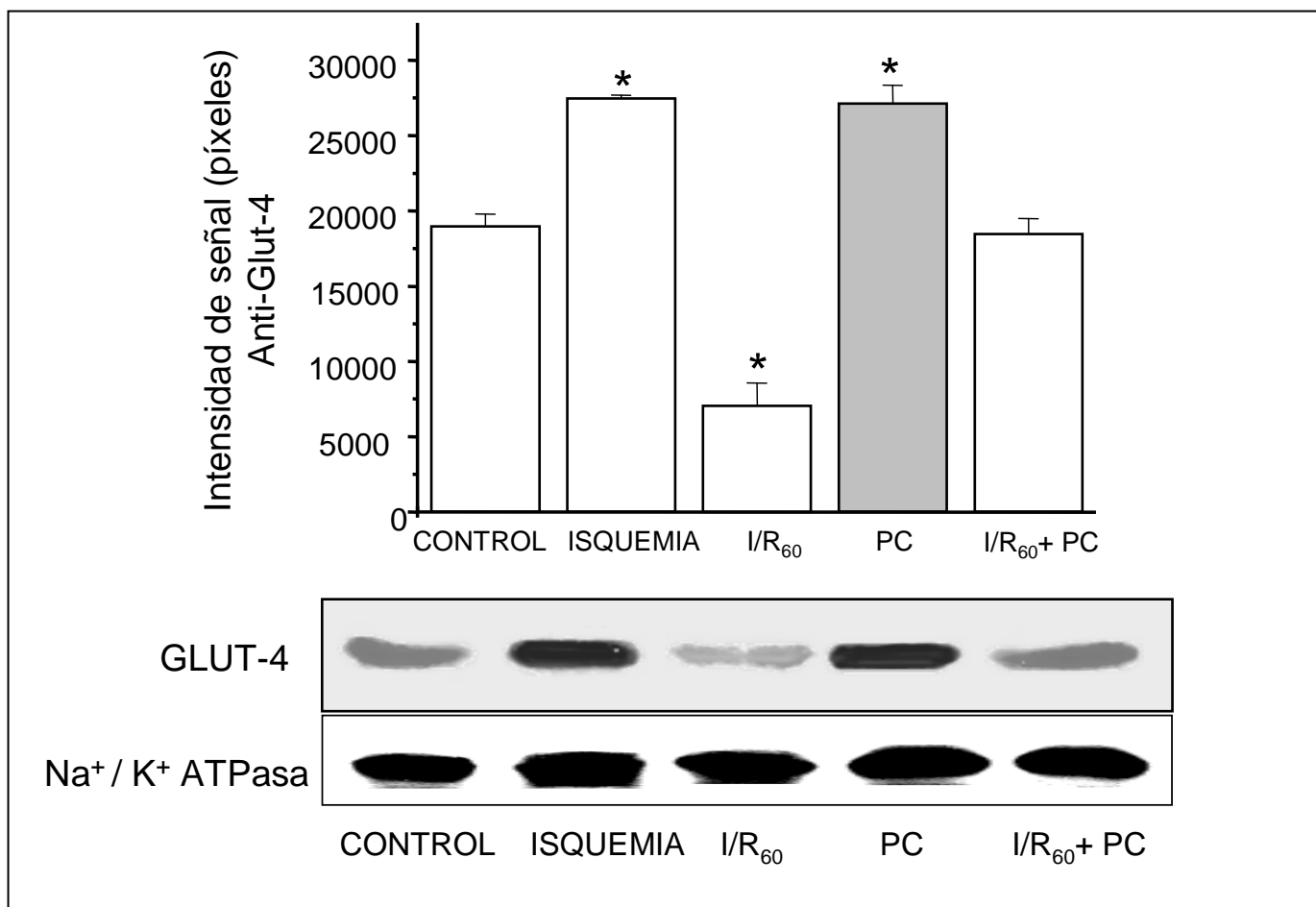


Figura 11. Asociación de GLUT4 a fracciones de membrana plasmática en corazones sometidos a isquemia y reperfusión. El contenido de GLUT4 se evaluó por medio de inmunotransferencia. Las membranas fueron incubadas con un anticuerpo policlonal anti-GLUT4 (1:2000). Como control de carga, se incubaron las membranas con anticuerpos Anti ATPasa de Na⁺/K⁺. Los datos mostrados son la media de cuatro diferentes experimentos \pm D.S. *P \leq 0.05 vs. Control.

La intensidad de la señal para GLUT4 en las inmunotransferencias se incrementó en la condición de isquemia y este incremento se mantuvo en las preparaciones obtenidas de corazones que sufrieron las maniobras de post-acondicionamiento sin reperfusión (PC). En los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento y reperfusión de 60 minutos, el contenido de GLUT4 regresó a niveles basales encontrados en un corazón control. En el caso de los corazones con I/R₆₀, la intensidad de la señal para la GLUT4 fue significativamente menor que para las otras condiciones.

El hecho de encontrar una mayor inserción del GLUT4 sugiere que hay una mayor disponibilidad de sustrato y que probablemente la glucólisis juega un papel muy importante en la recuperación cardíaca. En este sentido medimos el consumo de glucosa, así como el flujo glucolítico a través de la liberación de lactato (Figura 12).

4. Consumo de glucosa y liberación de lactato en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento.

La figura 12A muestra que al inicio de la reperfusión, después de la isquemia, existe un mayor consumo de glucosa en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento en comparación con corazones sin la maniobra; este incremento se mantiene muy alto en los primeros minutos de la reperfusión, después desciende y se mantiene durante los 60 minutos de reperfusión. En los corazones sin la maniobra y en los controles hay un menor consumo de sustrato glucolítico. También medimos el contenido de lactato en los eluidos de los corazones, como una estimación de la actividad del flujo glucolítico (figura 12B). Encontramos que al inicio de la reperfusión, en los corazones IR

hay un pico de liberación de lactato mayor que en los corazones post-acondicionados. En los corazones post-acondicionados este comportamiento también se observó, pero la liberación de lactato se distribuyó durante los ciclos de reperfusión de la maniobra. Después de los primeros minutos de reperfusión, el lactato liberado disminuyó en los corazones IR, manteniéndose por debajo del lactato liberado por los corazones post-acondicionados. Al respecto se sabe que la reducción de la actividad de la piruvato deshidrogenasa durante la reperfusión temprana induce una elevada producción de lactato.

El aumento en el transporte y oxidación de la glucosa sugiere que la activación de la vía glucolítica es importante en la recuperación del corazón frente a la reperfusión. Para dilucidar la importancia de esta vía durante la reperfusión en el modelo de post-acondicionamiento, se utilizó un inhibidor de la glucólisis, el ácido yodoacético, a una concentración que inhibe específicamente a la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa. Bajo estas condiciones se valoró el trabajo cardiaco de corazones sometidos a los diferentes protocolos de perfusión, utilizando piruvato como sustrato.

5. Efecto de la inhibición de la vía glucolítica sobre el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento.

En la figura 13A, se muestra que al inhibir la glucólisis durante la isquemia, el efecto del post-acondicionamiento se abate por completo, por lo que este resultado confirma que el ATP generado durante la glucólisis anaerobia es de vital importancia para que la maniobra de post-acondicionamiento funcione. Cuando se administró el inhibidor de la glucólisis durante el periodo de reperfusión, en presencia de piruvato, la maniobra de post-acondicionamiento

sólo protegió en un 65% (Figura 13B), lo que sugiere que la vía glucolítica aporta el 25% de la energía para que el corazón se recupere al nivel de los controles. Utilizando sustratos análogos a la glucosa, como la 2-desoxi-glucosa, se observó el mismo fenómeno. La idea de usar este análogo fue descartar la posibilidad de que el ácido yodoacético estuviera inhibiendo, por ejemplo, a las deshidrogenasas del ciclo de Krebs. Este experimento sustenta que la participación de la vía glucolítica en la protección miocárdica durante la maniobra de post-acondicionamiento es de suma importancia para la cardioprotección.

Para asociar la cardioprotección con el aporte de energía en los corazones post-acondicionados, al término del periodo de reperfusión los corazones se desmontaron y se cuantificó el contenido de ATP y de fosfocreatina.

Los resultados mostraron que los niveles de ATP en corazones controles perfundidos con ácido yodoacético y en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento se mantienen (Tabla I). Sin embargo, los niveles de ATP se abatieron por completo en un corazón perfundido con ácido yodoacético, aún con la maniobra de PC. La perfusión de yodoacético a las concentraciones aquí mostradas no modificó el trabajo cardíaco ni la fosforilación oxidativa en corazones controles (figura 13 A inserto).

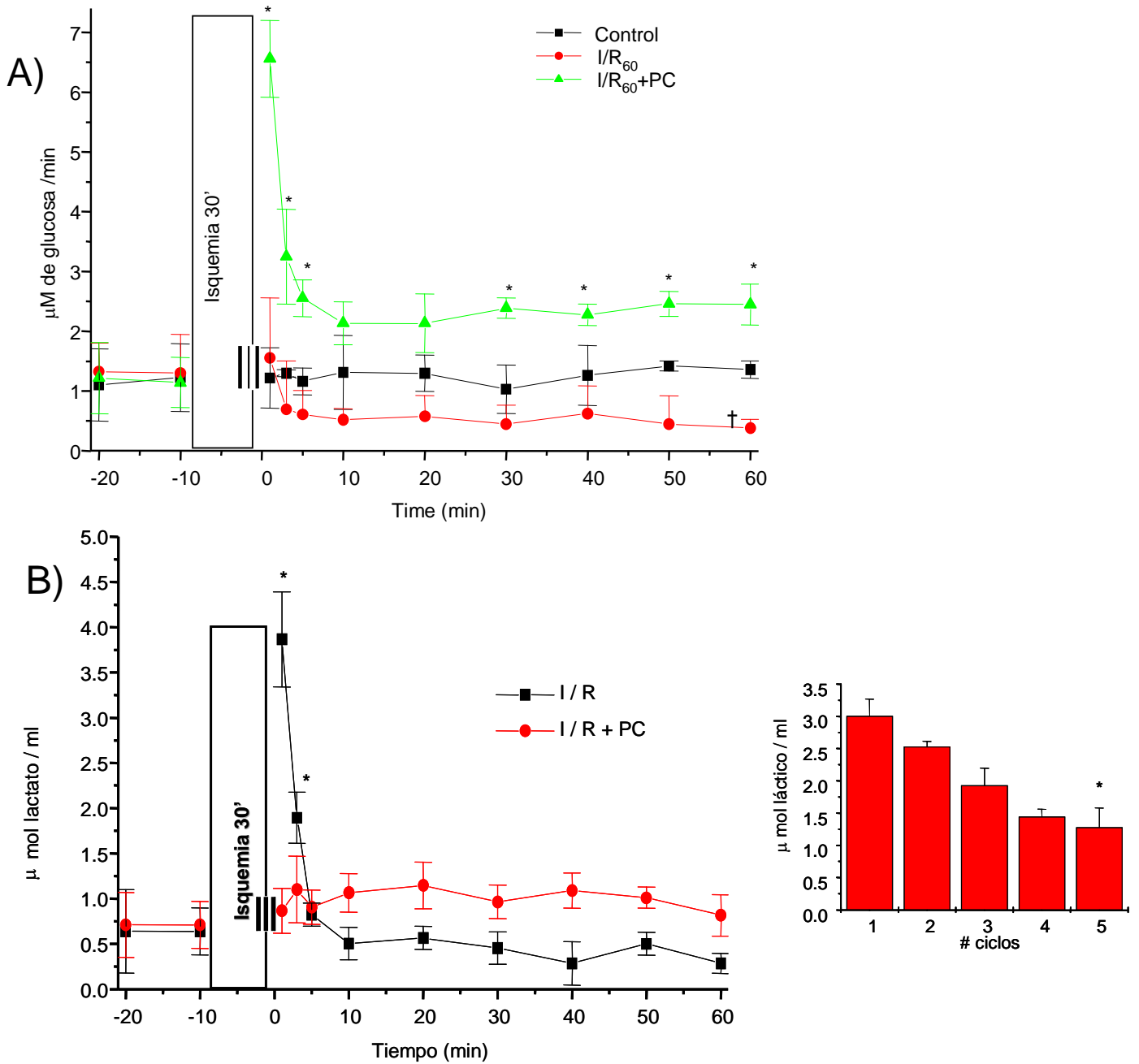


Figura 12. Utilización de glucosa y liberación de lactato en eluados de corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. **A)** Consumo de glucosa en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. El consumo de glucosa se midió de acuerdo a material y métodos. $n=3$ $*P \leq 0.05$. **B)** Flujo glucolítico medido a través de la liberación de lactato en corazones sometidos al protocolo de perfusión y corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. El inserto corresponde a la liberación de lactato durante la maniobra de post-acondicionamiento. $n= 3$ $*P \leq 0.05$.

6. Actividad de la hexocinasa en corazones con post-acondicionamiento.

Al ser la hexocinasa un punto de control en el flujo glucolítico en el corazón, se midió la actividad de esta enzima. Sólo se encontró una actividad mayor en los corazones sometidos a isquemia y no en las otras condiciones. En las condiciones de reperfusión y reperfusión con post-acondicionamiento, no hubo aumento o disminución de la actividad de la enzima (Figura 14 A). En cuanto a la cantidad de enzima, tampoco se observaron cambios en los diferentes protocolos, salvo en la condición de isquemia (Figura 14 B).

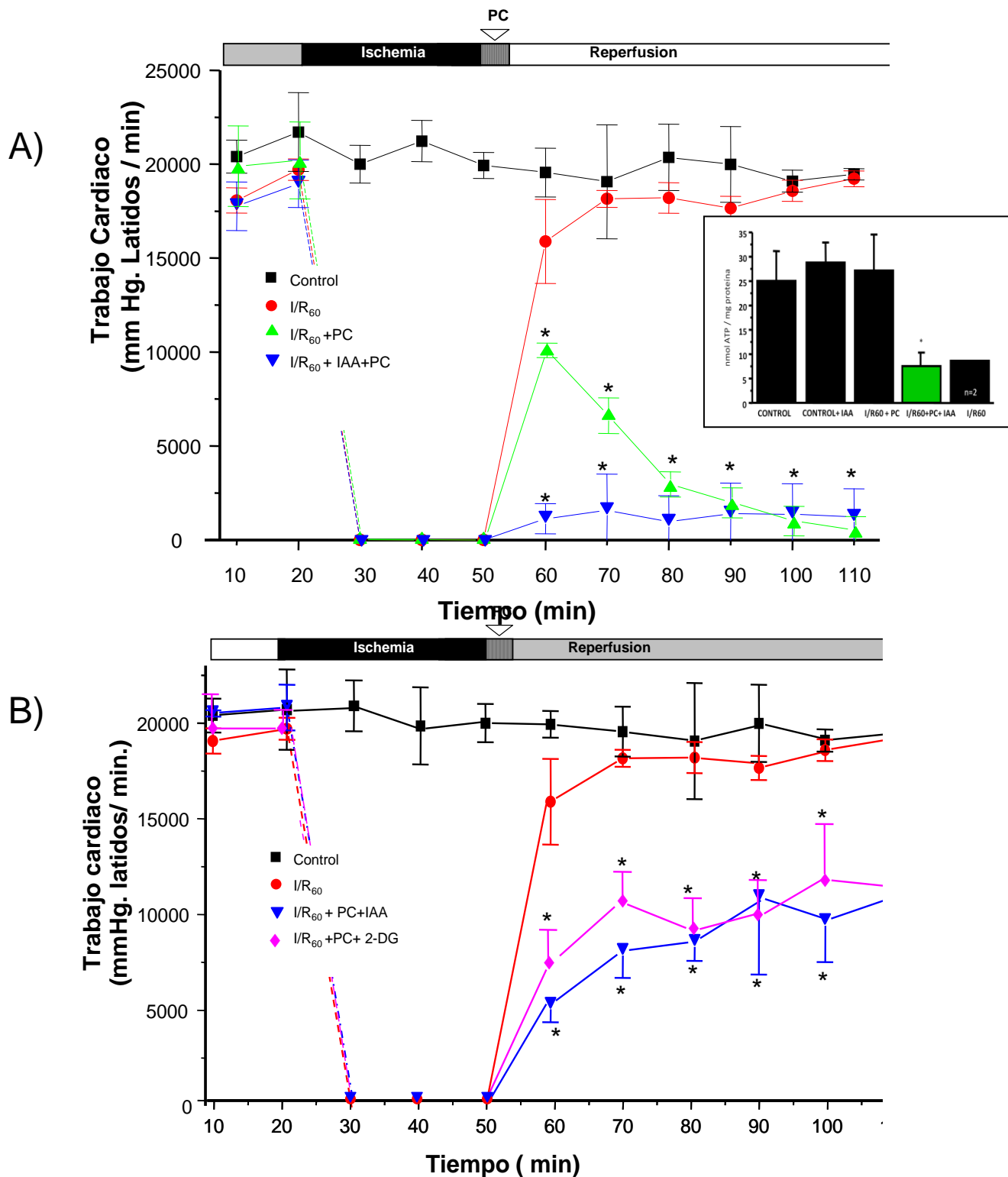


Figura 13. Trabajo cardiaco en corazones con post-acondicionamiento en presencia de yodoacetato o 2-deoxi-glucosa. **A)** Los corazones fueron perfundidos con 100 μ M de acido yodoacético durante 20 minutos antes del periodo de isquemia. El inserto corresponde al contenido de ATP en las condiciones descritas en el histograma. **B)** Los corazones fueron reperfundidos durante los 60 minutos siguientes a la isquemia, con 100 μ M de acido yodoacético o 5 mM de 2-deoxi-glucosa. En corazones controles tratados con yodoacetato encontramos que no se modificó el trabajo cardiaco. n=4 *P \leq 0.05.

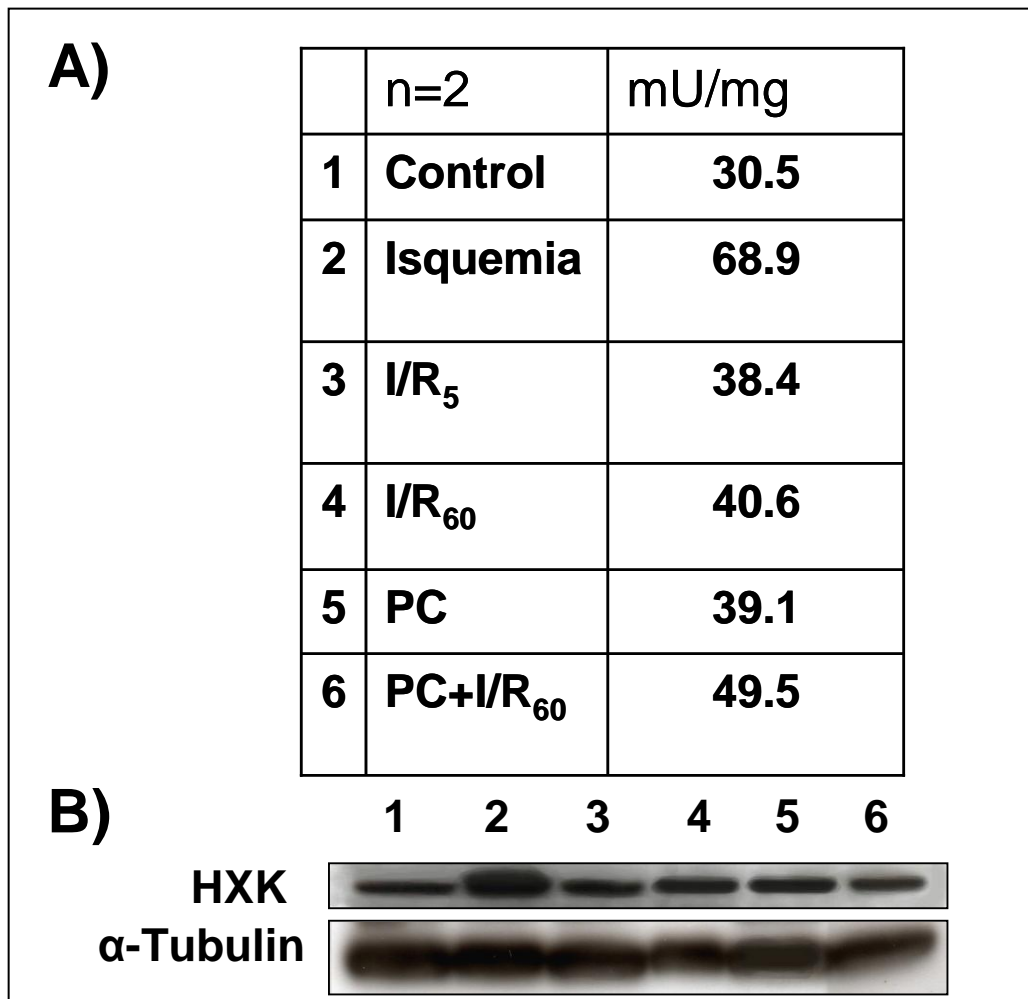


Figura 14. Actividad de la hexocinasa en corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. **A)** La actividad de la enzima fue determinada en fracciones de citoplasma acoplando la actividad a la reacción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa. **B)** El contenido de la hexocinasa fue determinado en las mismas fracciones por inmunotransferencia y comparado con el contenido de tubulina.

VII. Discusión.

Se sabe que episodios breves de isquemia y reperfusión de manera cíclica (post-acondicionamiento) reducen significativamente el tamaño del infarto después de una isquemia prolongada (15). Bajo nuestras condiciones experimentales, logramos reproducir un modelo de post-acondicionamiento, aplicando 5 ciclos de isquemia y reperfusión de 30 segundos. Utilizando este protocolo de post-acondicionamiento en corazones reperfundidos se evitó el daño por reperfusión. Este hecho fue evidente al evaluar el trabajo cardiaco, el cual se mantuvo desde los primeros minutos de la reperfusión hasta el final de la misma. Nuestros resultados indican que la integridad mitocondrial (TPm), evaluada por la resistencia al hinchamiento y la capacidad para acumular calcio, se mantiene intacta por efecto del post-acondicionamiento (Figura 8). En estudios recientes se sugiere que la regulación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) juega un papel crucial en la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento. Por ejemplo, en preparaciones mitocondriales de corazones con la maniobra de post-acondicionamiento se ha demostrado que se requiere una cantidad alta de calcio para inducir la apertura de PTPm en comparación con mitocondrias aisladas de corazones sin la maniobra (66). Otra propuesta que relaciona el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento con el PTPm es la del grupo de Penna C. y colaboradores, el cual demostró que la inhibición farmacológica de los canales de potasio dependientes de ATP en la mitocondria disminuye el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento. Bajo esas condiciones, no observaron una reducción del tamaño del infarto (72). Al respecto, se sabe que la activación de dichos canales promueve una despolarización transitoria de la

membrana mitocondrial, lo que reduce la acumulación de calcio intramitocondrial y por tanto se evita la apertura del PTPm y el daño por reperfusión (84). En un reporte reciente, el grupo de Lim S. demuestra que los corazones de ratón deficientes en ciclofilina D (un componente fundamental del PTPm), no hay cardioprotección mediada por post-acondicionamiento (85). Resulta fácil de entender el mecanismo, ya que la falta de uno de los componentes del poro, en este caso la ciclofilina D, evita la formación de este, por tal motivo, bajo estas condiciones no hay formación de poro y las mitocondrias no sufren transición de la permeabilidad.

Por otro lado, se ha propuesto que la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento se debe a la activación de proteínas cinasas como son AKT, GSK-3 o PKC, que regulan directamente la actividad de los canales mitocondriales de potasio dependientes de ATP, los cuales, a su vez, tienen la capacidad de inhibir la apertura del PTPm, evitando así el daño por reperfusión (86).

Una pregunta muy recurrente en los ensayos donde se mide la transición de la permeabilidad es si el protocolo de aislamiento de mitocondrias “selecciona” a poblaciones de mitocondrias con diferentes susceptibilidades al daño por reperfusión, de manera que el protocolo de aislamiento de mitocondrias induzca *per se* la apertura del PTPm, más que el propio daño por reperfusión. A este respecto, se ha relacionado la disminución en el contenido de NAD^+ de un corazón reperfundido y la apertura del PTPm *in situ* (87). En este estudio se demostró que el NAD^+ se libera de la mitocondria al citosol sólo cuando la

mitocondria cursa por el fenómeno de la transición, y esto se demostró al administrar un inhibidor del PTPm a los corazones reperfundidos, con el cual la salida de NAD⁺ de las mitocondrias de estos corazones fue menor que en mitocondrias de corazones sin tratamiento. Nuestros resultados (Figura 9) no sólo están de acuerdo con este hallazgo, sino que demuestran que tras los ciclos de post-acondicionamiento no hay liberación de NAD⁺ de la mitocondria al citosol. Además, la cantidad que encontramos de este metabolito en corazones tratados con el inhibidor del PTPm (la CSA) y corazones control fue la misma, descartando así que el protocolo de aislamiento de mitocondrias las predisponga a la transición de la permeabilidad. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que la maniobra de post-acondicionamiento inhibe la transición de la permeabilidad antes del inicio de la reperfusión prolongada (Figura 9 inserto).

La transición de la permeabilidad está relacionada con el inicio de la apoptosis intrínseca, mediante la liberación de proteínas y metabolitos de la mitocondria al citosol. En este sentido, la salida del citocromo c de las mitocondrias sigue siendo el marcador por excelencia de la apoptosis intrínseca. Nuestro grupo ha demostrado que en las mitocondrias aisladas de corazones sometidos a isquemia y reperfusión hay liberación del citocromo c desde los primeros minutos de la reperfusión, y después de 30 minutos de reperfusión se activa significativamente la caspasa-3 (4). Otros grupos han reportado que con el uso de inhibidores de la apertura del PTPm como el NIM811, inhiben también el inicio de la apoptosis.

Estos datos, junto con los nuestros, refuerzan la idea de que la apertura del PTPm marca el inicio de la vía intrínseca de la apoptosis (66). Nuestros

resultados muestran además que en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento disminuye la liberación de citocromo c (Figura 10C), lo que sugiere que la maniobra de post-acondicionamiento inhibe la inducción de la apoptosis. En este sentido, también se ha reportado que las vías de señalización de la apoptosis dirigidas por cinasas como Jnk y MAP-38 disminuyen cuando se aplica la maniobra de post-acondicionamiento (88). Sin embargo, no hay más datos en la literatura sobre el efecto del post-acondicionamiento en la fase final de la apoptosis.

Existen otros mecanismos que conducen a la muerte celular, como el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO), lo cual genera un daño irreversible en la mitocondrias al producir lipoperoxidacion de lípidos de membrana y oxidar proteínas (89). Algunos grupos de investigación han propuesto que la cardioprotección del post-acondicionamiento se debe a que la reperfusión intermitente (ciclos de la maniobra) reduce el estallido del estrés oxidativo (90). El grupo de Penna C. demostró que la intermitencia de los ciclos del post-acondicionamiento produce cantidades parciales de ERO y propone que a estas concentraciones se activan los canales de potasio dependientes de ATP en las mitocondrias, de tal manera que el daño por reperfusión se hace reversible, ya que como se mencionó anteriormente, la activación de estos canales regulan la apertura del PTPm promoviendo la cardioprotección. Interesantemente, este grupo encontró que el efecto cardioprotector del post-acondicionamiento se pierde cuando se administran atrapadores de ERO durante la maniobra (72). Nuestros resultados en cuanto al papel de las ERO generadas por la reperfusión muestran que hubo una

reducción en la carbonilación de proteínas cuando se aplicó la maniobra de post-acondicionamiento (Figura 10A). Sin embargo, esta reducción en la carbonilación de proteínas fue evidente hasta después de 60 minutos de reperfusión. A diferencia de lo que ocurrió con el PTPm (Figura 8), donde la maniobra fue suficiente para evitar que las mitocondrias cursaran por la transición, el post-acondicionamiento no fue suficiente para reducir la carbonilación de proteínas. Sin embargo, observamos que la actividad de la aconitasa, una enzima muy sensible al estrés oxidativo, se mantuvo en los corazones en los que se aplicó sólo la maniobra de post-acondicionamiento, así como en aquellos en los que se aplicó la maniobra y que además se reperfundieron durante 60 minutos.

Estos resultados sugieren que la integridad de las mitocondrias de un corazón con la maniobra de post-acondicionamiento se conserva debido a la inhibición de la apertura del PTPm, así como a la disminución de la entrada masiva de calcio y a la reducción en la producción de especies reactivas de oxígeno. Proponemos que durante la reperfusión después de la maniobra de post-acondicionamiento hay un efecto combinado entre la sobrecarga de calcio y las especies reactivas de oxígeno promoviendo la actividad de proteínas que regulan los movimientos de calcio en el retículo sarcoplásmico, lo que provoca la disminución del contenido de calcio intracelular y en consecuencia en la mitocondria. En este sentido, se sabe que la entrada masiva de calcio a la mitocondria junto con una sobreproducción de ERO son los inductores fisiológicos más importantes de la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. En el corazón isquémico reperfundido ambas

condiciones se hacen presentes, provocando la apertura transitoria del poro y en consecuencia la liberación de solutos de bajo peso molecular como el ATP y los adenin nucleótidos, lo que propicia la disfunción cardiaca (18).

En el corazón normal, la mitocondria juega un papel fundamental en el aporte de ATP a través de la fosforilación oxidativa, este ATP es el responsable de mantener la función contráctil en el corazón. Durante la isquemia, la producción de energía está comprometida, por lo que las rutas alternas para su obtención son de vital importancia, como la vía glucolítica, que representa la principal vía de obtención de ATP en estas condiciones. Se sabe que en mamíferos, las células responden a este estímulo con la inducción de genes sensibles regulados por bajas concentraciones de oxígeno, por ejemplo los de la eritropoyetina, los genes de enzimas glucolíticas, así como de transportadores de glucosa (GLUT). De esta forma, la vía glucolítica aporta ATP en ausencia de la vía mitocondrial (fosforilación oxidativa). Se ha demostrado que episodios breves de isquemia, antes de un periodo prolongado de isquemia y reperfusión (pre-acondicionamiento) inducen un aumento en el transporte de glucosa y un aumento en la inserción de GLUT-4. Se propone que este aumento en el transportador está mediado por la MAP-cinasa P38 (91). También se sabe que el pre-acondicionamiento induce un incremento en la producción de lactato y en el transporte de glucosa en corazón (92) y bajo estas condiciones hay una mejor eficiencia en la vía glucolítica (93). Nuestros resultados muestran que hay un incremento en la inserción del transportador GLUT-4 durante la isquemia, el cual se mantuvo en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento. Sin embargo, durante la reperfusión el contenido del

transportador GLUT4 regresó a los niveles encontrados en un corazón control (Figura 11). Esta evidencia experimental nos lleva a proponer que la maniobra de post-acondicionamiento favorece la utilización de glucosa para incrementar el aporte de ATP. Nuestros resultados muestran también que hay un consumo mayor de glucosa en los corazones con post-acondicionamiento durante los primeros minutos de la reperfusión (Figura 12A). Estos datos son comparables con los obtenidos a partir de corazones de ratones transgénicos que sobre-expresan la hexocinasa B, donde se observa un incremento en la glucólisis y en la producción de lactato durante de reperfusión, evidencias que se asocian a la cardioprotección (83).

La importancia del ATP proveniente de la vía glucolítica ha sido ampliamente descrito (94). El grupo de Wang demostró que la perfusión de altas concentraciones de glucosa-insulina promueve la recuperación del corazón frente a la reperfusión (95). Nuestros resultados muestran que al administrar yodoacetato ó 2-desoxi-glucosa durante la reperfusión, se inhibe el efecto protector del post-acondicionamiento (Figura 13). Estos datos concuerdan con lo reportado por Jeremy et al (94), quienes encontraron que la inhibición de la glucólisis durante la reperfusión provoca la disfunción contráctil del corazón además de provocar una disminución en la presión ventricular del corazón. Este hallazgo junto con nuestros resultados demuestran que la glucolisis juega un papel fundamental en la recuperación de la función contráctil y metabólica del corazón después de una isquemia prolongada. Se sabe que la inhibición de la producción ATP en la glucólisis durante la isquemia o durante la reperfusión, afecta la función cardiaca.

Nuestros datos muestran que el ATP producido por la glucólisis anaerobia durante la isquemia contribuye al mantenimiento del 60% del trabajo cardiaco en la reperfusión (Figura 13). Es importante mencionar que aunque el yodoacetato no es un inhibidor específico de la glucólisis, en las concentraciones usadas en este estudio no se encontró inhibición de las deshidrogenasas del ciclo de Krebs, ni tampoco hubo inhibición de la capacidad oxidativa de las mitocondrias. Con base en nuestros resultados proponemos que la glucólisis contribuye a mantener la función contráctil en los primeros minutos de la reperfusión en los corazones con las maniobra de post-acondicionamiento, ya que al inhibir la vía glucolítica con yodoacetato se pierde el efecto cardioprotector de la maniobra, haciendo el daño por reperfusión irreversible.

En la cuantificación del flujo glucolítico al inicio de la reperfusión (Figura 12B), los corazones I/R presentaron un pico de liberación de lactato mayor que los corazones post-acondicionados, ya que en estos últimos la liberación de lactato se distribuyó durante los ciclos de la maniobra (Figura 12 B inserto). Después de los primeros minutos de reperfusión, el lactato liberado disminuyó en los corazones I/R, manteniéndose por debajo del lactato liberado por los corazones post-acondicionados. Al respecto, se sabe que la disminución de la actividad de la piruvato deshidrogenasa durante la reperfusión, induce una producción elevada de lactato, de modo que se ha propuesto que el aumento en la oxidación de piruvato durante la reperfusión es parte importante del mecanismo de cardioprotección (65 y 100).

El hecho de que en los corazones con post-acondicionamiento la liberación de lactato haya ocurrido durante la maniobra (Figura 12 inserto), podría ser importante para evitar los efectos nocivos de la acumulación de ácido láctico en el tejido (acidosis). En un modelo de corazón canino sometido a isquemia se encontró una notable disminución de ATP sin la acumulación de lactato y sin daño estructural evidente, lo que sugiere que bajo condiciones de isquemia, los miocitos son capaces de resistir bajas concentraciones de ATP siempre y cuando el láctico no se haya acumulado (95). Siguiendo esta idea, se sabe que al estimular la oxidación de carbohidratos en corazones se produce una reducción en la contractura asociada a un incremento en la liberación de lactato durante la reperfusión (96). Entonces, con la rápida liberación de lactato del tejido y activando la glucólisis en los corazones con la maniobra de post-acondicionamiento, se propiciarán las condiciones necesarias para hacer el daño por reperfusión reversible.

Para tratar de conectar la cardioprotección conferida por la activación de la glucólisis y el mantenimiento de la integridad mitocondrial, proponemos que el ATP de origen glucolítico podría usarse preferentemente para mantener la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ durante la reperfusión, evitando el daño producido por la entrada masiva de sodio vía el intercambiador Na^+/H^+ . Se ha sugerido que esto ocurre en modelos de daño por reperfusión, demostrando que la inhibición de la actividad de la ATPasa de Na^+/K^+ , incrementa la concentración del sodio intracelular y en consecuencia se produce un daño irreversible durante la reperfusión (98). Al respecto, Dizon et al sugieren que el ATP de origen glucolítico mantiene la homeostasis del sodio en el corazón

perfundido de rata (99). Se ha demostrado también que el ATP glucolítico está ligado a otros procesos de transporte, por ejemplo, el transporte de calcio en las membranas del retículo sarcoplásmico depende de ATP de origen glucolítico (93). En años recientes el grupo de Zima et al, reportó que la glucólisis tenía un papel fundamental en la regulación de la concentración de calcio intracelular, debido a la proximidad de las enzimas glucolíticas y los sistemas de transporte del retículo sarcoplásmico (100).

Este grupo encontró que los esqueletos de azúcar-fosfato, metabolizados durante la glucólisis, modulan localmente la liberación de calcio en el retículo sarcoplásmico de miocitos de corazón de gato. Los esqueletos de azúcar-fosfato tienen efectos sobre la liberación de calcio del retículo, modificando la actividad de los principales sistemas de transporte en este compartimento (la ATPasa de Ca^{2+} y el canal de rianodina). Otros autores han demostrado también que la acumulación de estos metabolitos de la glucólisis provocan una sobre-carga intracelular de calcio (101). Estos hallazgos nos han llevado a sugerir que el mecanismo de cardioprotección por post-acondicionamiento deriva de una compartimentalización del metabolismo energético, de manera que el aporte de ATP glucolítico en los primeros minutos de la reperfusión mantiene la homeostasis de sodio y calcio, además de preservar la integridad mitocondrial durante el tiempo de reperfusión y en consecuencia mantienen la actividad contráctil del órgano.

VIII. Conclusiones.

Los mecanismos activados durante el post-acondicionamiento protegen la integridad mitocondrial, conservándose la homeostasis iónica y energética en el corazón reperfundido.

El aumento del transporte de glucosa se podría relacionar con un aumento de ATP de origen glucolítico, el cual puede ser relevante para preservar la regulación de los movimientos de sodio y calcio en el citoplasma y en la mitocondria.

La inhibición farmacológica de la glucólisis inhibe el efecto protector del post-acondicionamiento, lo que nos lleva a proponer que los mecanismos de cardioprotección activados durante el post-acondicionamiento y que inciden sobre el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial, podrían derivar de la interacción entre el flujo glucolítico y la activación de diferentes transportadores que regulen, por ejemplo, la sobrecarga de calcio mitocondrial.

Es innegable que las maniobras mecánicas del post-acondicionamiento salvan al corazón del efecto letal de la reperfusión; el reto a futuro es poder adaptar estas condiciones a casos clínicos, si bien se requiere de un mayor número de estudios para entender los mecanismos moleculares que éste activa, es claro que su aplicación supera el efecto de cualquier droga aplicada durante la reperfusión.

IX. PERSPECTIVAS

Las perspectivas están dirigidas a investigar qué tan efectiva puede resultar la estrategia de post-acondicionamiento en corazones reperfundidos que se hayan recuperado de un evento isquémico previo y evaluar bajo estas condiciones, por ejemplo, la bioenergética mitocondrial. Nos parece de vital importancia, ya que la posible aplicación de esta maniobra en la clínica debe estar sustentada por el conocimiento de los mecanismos que se activan para producir la cardioprotección. En diferentes modelos animales se ha demostrado que el post-acondicionamiento reduce el tamaño del infarto y que además convierte la fibrilación ventricular persistente en ritmo sinusal; sin embargo, apenas se empiezan a vislumbrar algunos de los mecanismos que esta estrategia enciende a nivel celular. He aquí la relevancia y la originalidad de nuestra propuesta, ya que ante la posible aplicación clínica del post-acondicionamiento, es necesario profundizar en el estudio de dichos mecanismos. Al limitar el daño del miocardio con una manipulación de naturaleza mecanicista, que luce simple en su implementación, podría obtenerse un beneficio clínico terapéutico, sobre todo en los terrenos de la cirugía de revascularización coronaria y en la terapia intervencionista. Además, consideramos importante evaluar la efectividad de esta estrategia en situaciones en las que la integridad del miocardio se encuentra comprometida, para definir en qué tipo de patología isquémica sería recomendable o no, aplicarla. Hasta el momento existen muy pocos reportes en este sentido. Sobra decir que el estudio de la patogenia de enfermedades crónico-degenerativas

de alto impacto en salud cardiovascular es tema actual y relevante, sobre todo cuando es posible relacionar el conocimiento básico con la aplicación clínica.

X. BIBLIOGRAFÍA

1. Becker LC y Ambrosio G. (1987). Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis.* 30:23–44.
2. Forman MB, Virmani R y Puett DW. (1990). Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 81:69–78.
3. Hearse DJ y Bolli R. (1992). Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res.* 26:101–108.
4. Correa F, Soto V y Zazueta C. (2007). Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 39:787-798.
5. Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R y Brown G. (2001). Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischemia. *Biochim Biophys Acta.* 1537:101-109.
6. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermann R, Ullmann C, Lorenzo-Meyer S y Schaper J. (2000). Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Biol Chem.* 32:197-208.
7. Halestrap AP. (2006). Calcium, mitochondria and reperfusion injury: a pore way to die. *Biochem Soc Trans.* 34:232-237.
8. Griffiths EJ, Javadov SA, Clarke S, Das M, Lim KH y Halestrap AP. (2003). Ischaemic preconditioning inhibits opening of mitochondrial permeability transition pores in the reperfused rat heart. *J Physiol.* 549:513-524.
9. Cohen M, Yang X y Downey M, (2007). The pH Hypothesis of Postconditioning Staccato Reperfusion Reintroduces Oxygen and Perpetuates Myocardial Acidosis. *Circulation.* 115:1895-1903.
10. Saris NE y Carafoli E. (2005). A historical review of cellular calcium handling, with emphasis on mitochondria. *Biochemistry.* 70(2):187-194.
11. Lewandowski E y White L. (1995). Pyruvate Dehydrogenase Influences Postischemic Heart Function. *Circulation.* 91:2071-2079.
12. Mallet RT y Sun J. (1999). Mitochondrial metabolism of pyruvate is required for its enhancement of cardiac function and energetics. *Cardiovasc Res.* 42:149-161.
13. Bungler R, Mallet RT y Hartman DA. (1989). Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near-complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem.* 180:221-233.

14. Hattori M, Kai R y Kitasato H. (1994). Effects of lowering external Na⁺ concentration on cytoplasmic pH and Ca²⁺ concentration in mouse pancreatic beta-cells: mechanism of periodicity of spike-bursts. *J Physiol.* 44:283-293.
15. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA y Vinten-Johansen J. (2003) Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol. Heart Circ. Physiol.* 285:H579–H588.
16. Rosenkraz ER y Buckberg GD. (1983). Myocardial protection during surgical coronary reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1:1235-1246.
17. Beyersdorf F, Buckberg GD. (1992). Myocardial protection during surgical intervention for treatment of acute myocardial infarction. *Tex Heart Inst J.* 19(1):26-40.
18. Braunwald E y Kloner RA. (1985). Myocardial reperfusion a double edge sword? *J Clin Invest.* 76:1713-1719.
19. Jennings RB, Murry CE, Steenberg C Jr y Reimer KA. (1990). Development of cell injury in sustained acute ischemia. *Circulation.* 82(3 Suppl):II2-122.
20. Téllez F, Carvajal K, García C, Vásquez C, Chávez E y Moreno-Sánchez R. (1996). Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y perfusión en el miocardio. *Arch Inst Cardiol Mex.* 66:162-181.
21. Basu S, Nozari A, Liu XL, Rubertson S y Wiklund L. (1999). Development of a novel biomarker of free radical damage in reperfusion injury after cardiac arrest. *FEBS Lett.* 470:1-6.
22. Ambrosio G y Tritto T. (1999). Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J.* 138(2Pt2):S69-75.
23. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA y Freeman BA. (1990). Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc Natl Acad Sci.* 87:1620-1624.
24. Chen EP, Bitter HB, Akhter SA, Koch WJ y Davis R. (1998). Myocardial recovery after ischemia and reperfusion injury is significantly impaired in hearts with transgenic overexpression of beta-adrenergic receptor kinase. *Circulation.* 98(19 Suppl):249-253.
25. Harada K, Komuro H, Hayashi T, Sugaya T, Murakama K y Yazaki Y. (1998). Angiotensin II type 1a receptor is involved in the occurrence of reperfusion arrhythmias. *Circulation.* 97:315-317.

26. Muller CA, Opie LH, Pineda CA, McCarthy J y Kraljevic V. (1998). Combination of a calcium antagonist, verapamil, with an angiotensin converting enzyme inhibitor, trandolapril, in experimental myocardial ischemia and reperfusion: antiarrhythmic and hemodynamic effects of chronic oral pretreatment. *Cardiovasc Drugs Ther.* 12:449-455.
27. Karmazyn M. (1999). Mechanism of protection of the ischemic and reperfused myocardium by sodium-hydrogen exchange inhibition. *J Thromb Thrombolysis.* 8:33-38.
28. Inserte J, García-Dorado D, Ruiz-Meana M, Padilla F, Barrabés JA, Pina P, et al. (2002). Effect of inhibition of Na(+)/ Ca(2+) exchanger at the time of myocardial reperfusion on hypercontracture and cell death. *Cardiovasc Res.* 55:739-748.
29. Mubagwa K. (1995). Sarcoplasmic reticulum function during myocardial ischaemia and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 30:166-175.
30. Auchampach JA, Pieper GM, Cavero I y Gross GJ. (1998). Effect of the platelet activating factor antagonist RP 59227 (tulopafant) on myocardial ischemia/reperfusion injury and neutrophil function. *Basic Res. Cardiol.* 93:361-371.
31. Meldrum MR. (1998). Tumor necrosis factor in the heart. *Am J Physiol.* 274:R577-595.
32. Shimada Y, Kutsumi Y, Nishio H, Asazuma K, Tada N, Hayashi T, et al. (1997). Role of platelets in myocardial ischemia-reperfusion injury in dogs. *Jpn.Circ J.* 61:241-248.
33. Moncada S. (1994). The «Sanchez Medal» Award Lecture: Nitric oxide. *Rev Invest Clin. (Suppl I):*15-17.
34. Schulz R y Wamboldt R. (1995). Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res.* 30:432-439.
35. Correa F, García N, Gallardo-Pérez J, Carreno-Fuentes L, Rodríguez-Enríquez S, Marín-Hernández A, Zazueta C. (2008). Post-conditioning preserves glycolytic ATP during early reperfusion: a survival mechanism for the reperfused heart. *Cell Physiol Biochem.* 22(5-6):635-644.
36. Lerch R. (1995). Myocardial stunning: the role of oxidative substrate metabolism. *Basic Res Cardiol.* 90:276-278.
37. Pearson PJ, Lin PJ y Schaff HV. (1992). Global myocardial ischemia and reperfusion impair endothelium-dependent relaxations to aggregating platelets in the canine coronary artery. A possible cause of vasospasm after cardiopulmonary bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 103:1147-1154.

38. García-Dorado D, Théroux P, Duran JM, Solares J, Alonso J, Sanz E, et al. (1992). Selective inhibition of the contractile apparatus. A new approach to modification of infarct size, infarct composition, and infarct geometry during coronary artery occlusion and reperfusion. *Circulation*. 85:1160-1174.
39. Hearse DJ, Humphrey SM y Chain EB. (1973). Abrupt reoxygenation of the anoxic potassium-arrested perfused rat heart: a study of myocardial enzyme release. *J Mol Cell Cardiol*. 5:395-407.
40. Vander Heide RS, Angelo JP, Altschuld RA y Ganote CE. (1986). Energy dependence of contraction band formation in perfused hearts and isolated adult myocytes. *Am J Pathol*. 125:55-68.
41. Piper HM, Abdallah Y y Schäfer C. (2004). The first minutes of reperfusion: a window of opportunity for cardioprotection. *Cardiovasc Res*. 61:365-367.
42. Abdallah Y, Gkatzoflia A, Pieper H, Zoga E, Walther S, Kasseckert S, et al. (2005). Mechanism of cGMP-mediated protection in a cellular model of myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res*. 66:123-131.
43. Siegmund B, Schlack W, Ladilov YV, Balser C y Piper HM. (1997). Halothane protects cardiomyocytes against reoxygenation-induced hypercontracture. *Circulation*. 96:4372-4379.
44. Padilla F, García-Dorado D, Agullo L, Barrabés JA, Inserte J, Escalona N, et al. (2001). Intravenous administration of the natriuretic peptide urodilatin at low doses during coronary reperfusion limits infarct size in anesthetized pigs. *Cardiovasc Res*. 51:592-600.
45. Kitakaze M, Asakura M, Kim J, Shintani Y, Asanuma H, Hamasaki T, et al. (2007). Human atrial natriuretic peptide and nicorandil as adjuncts to reperfusion treatment for acute myocardial infarction (J-WIND): two randomised trials. *Lancet*. 370:1483-1493.
46. Baines CP, Kaiser RA, Purcell NH, Blair NS, Osinska H, Hambleton MA, et al. (2005). Loss of cyclophilin D reveals a critical role for mitochondrial permeability transition in cell death. *Nature*. 434:658-662.
47. Halestrap AP y Brennerb C. (2003). The adenine nucleotide translocase: a central component of the mitochondrial permeability transition pore and key player in cell death. *Curr Med Chem*. 10:1507-1525.
48. Griffiths EJ y Halestrap AP. (1995). Mitochondrial non-specific pores remain closed during cardiac ischaemia, but open upon reperfusion. *Biochem J*. 307:93-98.

49. Jansen MA, Badlou BA, van Echteld CJ, Ruigrok TJ. (2000) Cytosolic Ca²⁺ concentration during Ca²⁺ depletion of isolated rat hearts. *Mol Cell Biochem*:203(1-2):169-175.
50. Ruiz-Meana M, Abellán A, Miró-Casas E y García-Dorado D. (2007). Opening of mitochondrial permeability transition pore induces hypercontracture in Ca²⁺ overloaded cardiac myocytes. *Basic Res Cardiol*. 102:542-552.
51. Haramaki N, Packer L, Assadnazari H y Zimmer G. (1993). Cardiac recovery during post-ischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochem Biophys Res Commun*. 196:1101-1107.
52. Yoon S, McMillin-Wood J, Michael L, Lewis R y Entman M. (1985). Protection of canine cardiac mitochondrial function by verapamil-cardioplegia during ischemic arrest. *Circ Res*. 56:704-708.
53. García-Rivas G de J, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Serna G, Rodríguez-Zavala J y Zazueta C. (2005). Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in the post-ischemic heart. *FEBS J*. 272:3477-3488.
54. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H y Leaf J. (1986). Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac. Cardiovasc. Surg*. 92:613-620.
55. Murry C, Jennings R y Reimer K. (1986). Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 74:1124-1136.
56. Lim SY, Davidson SM, Hausenloy DJ, Yellon DM. (2007). Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res*. 75(3):530-535
57. Cohen MV, Yang XM, Downey JM. (2008). Acidosis, oxygen, and interference with mitochondrial permeability transition pore formation in the early minutes of reperfusion are critical to postconditioning's success. *Basic Res Cardiol*. 103 (5):464-71.
58. Baxter GF. (2002). The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol*. 97:268–275.
59. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC y Virmani R. (1987). Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*. 76:1135–1145.

60. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ, French BA y Linden J. (2005). Infarct-sparing effect of A2A adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation*. 111(17):2190-2197.
61. Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM y Cohen MV. (2006). Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovasc Res*. 70:308–314.
62. Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM y Cohen MV. (2004). NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol*. 36:411–421.
63. Bell RM y Yellon DM. (2003). Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of P18K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*. 35:185–193.
64. Gross GJ. (2003). Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 35:709–718.
65. Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Reeves JG, Mykytenko J, Sorescu G, Zhao Z-Q, Wang N-P, Guyton RA y Vinten-Johansen J. (2005). Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by Postconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 38:827-834.
66. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raissy O, Loufouat J, Robert D y Ovize M. (2005). Post-conditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 111:194–197.
67. Churchill EN y Szweda LI. (2005). Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys*. 439:194–199.
68. Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, Reeves JG, Mykytenko J, Guyton RA, Zhao ZQ y Vinten-Johansen J. (2006). Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res*. 70:315–324.
69. Ytrehus K, Myklebust R y Mjos OD. (1986). Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res*. 20:597–603.
70. Sun H-Y, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, Vinten-Johansen J y Zhao ZQ. (2005). Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol*. 288:H1900–H1908.
71. Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Guyton RA, Vinten-Johansen J y Zhao ZQ. (2007). Long-term inhibition of

- myocardial infarction by postconditioning during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 102:90–100.
72. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, Losano G y Pagliaro P. (2006). Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 101:180–189.
 73. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, Altomare E, Fiore T y Vendemiale G. (2005). Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J.* 19:354–361.
 74. Crompton M y Costi A. (1988). Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca²⁺, inorganic phosphate and oxidative stress A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca²⁺ overload. *Eur J Biochem.* 178: 489–501.
 75. Oka N, Wang L, Mi W, Zhu W, Honjo O, Caldarone CA. (2008) Cyclosporine A prevents apoptosis-related mitochondrial dysfunction after neonatal cardioplegic arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2008 Jan;135(1):123-130.
 76. Sun H Y, Wang N P, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton R A, et al. (2005). Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am. J Physiol Heart Circ Physiol.* 288:H1900–H1908.
 77. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E y Ovize M. (2006). PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovasc. Res.* 69:178–185.
 78. Zhao ZQ ,Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, et al. (2003). Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 59:132–142.
 79. Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. (2006). Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 11:1583–1593.
 80. Xu KY, Zweier JL y Beker LC. (1989). Functional coupling between glycolisisi and sarcoplasmic reticulum calcium transport. *Eur J Biochem.* 180:481-493.

81. Van Emous J, Vlegger-Lankamp C, Nederhoff M, Ruigrok T y Van Echteld C. (2001). Postischemic Na/K ATPase reactivation is delayed in the absence of the glycolytic ATP in isolated rat heart. *Am. J Physiol Heart Circ Physiol.* 280:H2189-H2195.
82. Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL y Randall LJ. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol. Chem.* 193:265-275.
83. Liang Q, Donthi R, Kralik P y Epstein P. (2002). Elevated hexokinase increases cardiac glycolysis in transgenic mice. *Cardiovasc Res.* 53:423-430.
84. Holmuhamedov E, Wang L. y Terzic A. (1999). ATP-sensitive K⁺ channel openers prevent Ca²⁺ overload in rat cardiac mitochondria. *J Physiol.* 519:347-360.
85. Lim S, Davidson S, Hausenloy D y Yellon D. (2007). Preconditioning and postconditioning: the essential role of the mitochondrial permeability transition pore. *Cardiovasc Res.* 75:530-535.
86. Costa A, Jakob R, Costa C, Andrukhiv K, West I y Garlid K. (2006). The mechanism by which the mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel opening and H₂O₂ inhibit the mitochondrial permeability transition. *J Biol. Chem.* 281:20801–20808.
87. Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M y Bernardi P. (2001). Opening of the mitochondrial permeability transition pore causes depletion of mitochondrial and cytosolic NAD⁺ and is a causative event in the death of myocytes in postischemic reperfusion of the heart. *J Biol Chem.* 276:2571-2575.
88. Sun H, Wang N, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton R, Vinten-Johansen J y Zhao Z. (2006). Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis.* 11:1583-1593.
89. Kowaltowski A y Vercesi A. (1999). Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic Biol Med.* 26:463-471.
90. Kin H, Zhao Z, Sun H, Wang N, Corvera J, Halkos M, Kerendi F, Guyton R y Vinten-Johansen J. (2004). Postconditioning attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting events in the early minutes of reperfusion. *Cardiovasc Res.* 62:74-85.
91. Fisher Y, Thomas J, Sevilla Muñoz P, Becker C y Holman G. (1997). Insulin-induced recruitment of glucose transport 4 and 1 in isolated rat heart myocytes. Evidence of the existence of different intracellular glu4 vesicle population. *J Biol Chem.* 272:7085-7092.

92. Janier M, Vanoverschelde J y Bergmann S. (1994). Ischemic preconditioning stimulates anaerobic glycolysis in the isolated rat heart. *Am J Physiol.* 267:H1353-H1360.
93. Yabe K, Nasa Y, Sato M, Iijima R y Takeo S. (1997). Preconditioning preserves mitochondrial function and glycolytic flux during an early period of reperfusion in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res.* 33:677-685.
94. Jeremy R, Ambrosio G, Pike M, Jacobbus W y Becker L. (1993). The functional recovery of post-ischemic myocardium requires glycolysis during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 25:261-276.
95. Jennis RB, Reimer KA, Steenbergen C. (1986). Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 18: 769-780.
96. Webb JL. (1996). Iodoacetate and iodoacetamide. In enzyme and metabolic inhibitors. Webb JL, editor. New York, Academic Press, Inc. pp 1-123.
97. Cesar MC, Wilson JE. (1998). Further studies on the coupling of mitochondrially bound hexokinase to intramitochondrially compartment ATP, generated by oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys.* 350: 109-117.
98. Cross H, Opie L, Radda G, Clarke K. (1996). Is the high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved. *Circ Res.* 78: 482-491.
99. Dizon J, Burkhoff D, Tauskela J, Whang J, Cannon P y Katz J. (1998). Metabolic inhibition in the perfused heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol.* 274:H1082-H1089.
100. Zima AV, Kockskemper J, Blatter LA. (2006). Cytosolic energy reserves determine the effect of glycolytic sugar phosphates on sarcoplasmic reticulum calcium release in cat ventricular myocytes. *J Physiol.* 577. 281-293
101. Kusuoka H, Marban E. (1994). Mechanism of the diastolic dysfunction induced by glycolytic inhibition: does adenosine triphosphate derived from glycolysis play a favored role in cellular calcium homeostasis in ferret myocardium?. *J Invest.* 93. 1216-1223.

XI. Publicaciones derivadas de esta tesis

Relationship between oxidative stress and mitochondrial function in the post-conditioned heart

Francisco Correa · Noemí García · Cinthya Robles ·
Eduardo Martínez-Abundis · Cecilia Zazueta

Received: 27 May 2008 / Accepted: 7 October 2008
© Springer Science + Business Media, LLC 2008

Abstract The pathways activated by post-conditioning may converge on the mitochondria, in particular on the mitochondrial permeability transition pore. We sought to characterize the inhibition status of the mitochondrial permeability transition early after the post-conditioning maneuver and before long reperfusion was established. We observed that post-conditioning maneuvers applied to isolated rat hearts, after a prolonged ischemia and before reperfusion, promoted cardiac mechanical function recovery and maintained mitochondrial integrity. These effects were evaluated by mitochondrial swelling, calcium transport, and NAD⁺ content measurements; the improvements were established before restoring a long lasting reperfusion period. Mitochondrial integrity was associated with a diminution in oxidative stress, since carbonylation of proteins was prevented and aconitase activity was preserved in the post-conditioned hearts, implying that ROS might mediate mitochondrial dysfunction and mPTP opening. In addition, we found that cytochrome release was significantly abolished in the post-conditioned heart, in contrast with conventionally reperfused hearts.

Keywords Post-conditioning · Mitochondria · Permeability transition pore · Ischemic-reperfused heart · CSA, cyclosporin A

Introduction

Paradoxically, although rapid initiation of reperfusion is the most effective treatment to reduce infarct size resulting from myocardial ischemia, it has the potential to introduce an additional lethal injury that is not evident at the end of ischemia; this situation is known as reperfusion injury (Becker et al. 1987; Forman et al. 1990; Hearse and Bolli 1992).

Reperfusion injury is the consequence of numerous mechanisms activated in the intracellular and extracellular environments. Perhaps predicted by its diverse and numerous causes, reperfusion injury is expressed physiologically in equally diverse ways including: endothelial damage, vascular dysfunction, sequels of impaired blood flow, metabolic dysfunction, contractile dysfunction, dysrhythmias, cellular necrosis, and apoptosis. In this respect, calcium overload and reactive oxygen species (ROS) bursting out during reperfusion activate the mitochondrial permeability transition (mPT), a key event in cell death after ischemia-reperfusion. Opening of the non-specific mitochondrial permeability transition pore (mPTP) in the inner mitochondrial membrane results in the collapse of the membrane potential ($\Delta\Psi_m$), uncoupling of the respiratory chain, efflux of cytochrome c and of other pro-apoptotic factors, that may lead to either apoptosis or necrosis (De Moissac et al. 2000; Borutaite et al. 2001; Freude et al. 2000). Relevant to this matter is the demonstration that the mPTP remains closed throughout ischemia but opens at the time of reperfusion (Halestrap 2006; Griffiths et al. 2003). These evidences and data sustaining that mPTP opening is a hallmark event towards irreversible cellular injury, underlie the relevance of mPTP regulation to prevent reperfusion damage.

F. Correa · N. García · C. Robles · E. Martínez-Abundis ·
C. Zazueta (✉)
Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología,
Ignacio Chávez,
Juan Badiano No. 1., Col. Sección XVI,
Mexico, D.F. 14080, Mexico
e-mail: azazueta@yahoo.com

Several strategies have been developed to contend against reperfusion injury. Recently, Zhao et al. (2003) reported that brief periods of ischemia-reperfusion, performed just before prolonged reperfusion, reduce the infarct size. This mechanical maneuver is known as “post-conditioning”. The pathways activated by post-conditioning are the subject of intensive research. Recent reports suggest that they converge on the mitochondria, in particular on the mitochondrial permeability transition pore (Argaud et al. 2005; Bopassa et al. 2006; Gateau-Roesch et al. 2006; Gómez et al. 2008). Particularly, Argaud et al. (2005) have shown that NIM811, an inhibitor of mPTP, produces an effect similar to post-conditioning and that larger calcium loads are required to induce calcium release in mitochondria isolated from post-conditioned hearts subjected to long reperfusion. Recently, Penna et al. (2007) suggested that, during the brief periods of post-conditioning, the heart releases and intermittently accumulates downstream mediators that provide cardioprotection. In this sense, we sought to determine if, after the brief post-conditioning cycles of ischemia and reperfusion, the mitochondrial permeability transition is in its closed state, independently of mechanisms activated during reperfusion. To accomplish this goal we measured indicators of mitochondrial functionality and their relationship to oxidative damage, at the beginning and after long reperfusion.

We present evidence that post-conditioning maneuvers maintain the mPTP in its closed state, very early at reperfusion, and that a close correlation exists between cardioprotection and the redox status of mitochondria.

Material and methods

This investigation was performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the United States National Institutes of Health (US-NIH).

Male Wistar rats (400–450 g) were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and anti-coagulated with sodium heparin (1000 U/kg). Five minutes after the heparin injection, a midsternal thoracotomy was performed and the heart was rapidly excised and placed in ice-cold Krebs-Henseleit buffer solution, consisting of 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.18 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , 5.5 mM glucose, and 100 μM sodium octanoate, pH 7.4. The heart was quickly fixed onto a Langendorff heart perfusion system and perfused retrogradely via the aorta at a constant flux of 12 ml/min with Krebs-Henseleit solution that was continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 , at 37°C. Mechanical work was measured at a left ventricular end-diastolic pressure of 10 mm Hg, using a latex balloon

inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer. All variables were recorded using a computer acquisition data system designed by the Instrumentation and Technical Development Department of the National Institute of Cardiology (Mexico, D.F., México).

Experimental protocols

Krebs-Henseleit buffer was perfused for 20 min to stabilize the hearts. The ischemic and reperfused hearts were subjected to global ischemia for 30 min, by turning off the pumping system, and then to reperfusion for additional 5 (I/R₅) or 60 (I/R₆₀) minutes. The control hearts were continuously perfused as long as the I/R₆₀ hearts. The post-conditioning maneuver consisted of five cycles of 30 s ischemia and 30 s of reperfusion; then, the hearts were subjected to 60 min of reperfusion (I/R + PC). Another group of hearts was only subjected to ischemia and to the post-conditioning cycles, without reperfusion (PC). In addition, some hearts were perfused during 20 min with 0.2 μM Cyclosporin A (CSA), a well known inhibitor of the mPTP, and then subjected to ischemia and reperfusion. A summary of all the protocols used in this work is shown in Fig. 1.

Hearts that developed arrhythmias before the ischemia were discarded and replaced. Thus, all analyses represent hearts that did not show electrical dysfunction before the ischemia.

Preparation of mitochondria

At the end of the ischemia/reperfusion protocol, the hearts were removed from the Langendorff system and placed in cold isolation buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM TRIS-HCl, and 1 mM EDTA, pH 7.3. The hearts were minced

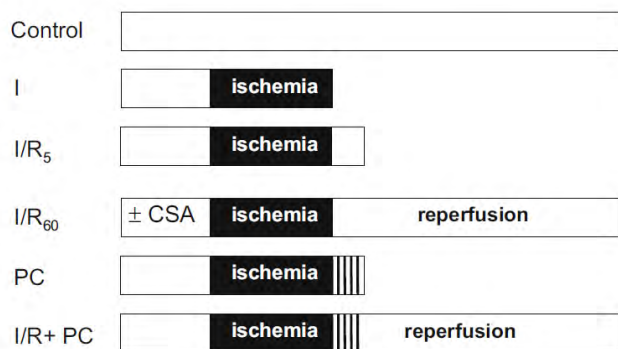


Fig. 1 Schematic representation of the experimental protocols. Control represents hearts perfused during 120 min; I/R₆₀, represents hearts subjected to 30 min of ischemia and 60 min of reperfusion; I/R + PC, represents post-conditioned hearts exposed to 30 min of ischemia and 60 min of reperfusion; PC, represents hearts with only 30 min of ischemia and the post-conditioning cycles; and I/R₅, represents hearts exposed to 30 min of ischemia and only 5 min of reperfusion

and incubated for 10 min in isolation buffer containing 1 mg/ml subtilisin A, centrifuged at 3,000 \times g for 5 min and washed with the same buffer before being homogenized. Mitochondria were obtained by differential centrifugation as previously described (Chávez et al. 1985). Protein was measured by the Lowry method (Lowry et al. 1951).

Opening of the mPTP

Mitochondrial integrity was evaluated by measuring mitochondrial swelling, calcium accumulation, NAD⁺ content and oxygen consumption. Mitochondrial swelling was followed by changes in optical density at 540 nm in a basic medium, containing 125 mM KCl, 10 mM HEPES, 3 mM Pi, 10 mM succinate, 160 μ M ADP and 5 μ g/ml rotenone, pH 7.3. Where indicated 0.5 μ M CCCP and 50 μ M CaCl₂ were added. Mitochondrial calcium movements were evaluated spectrophotometrically in a double beam spectrophotometer at 675–685 nm, by using the metallochromic dye Arsenazo III (Kendrick 1976).

Mitochondrial NAD⁺ was measured after trichloroacetic acid extraction, as described previously by Di Lisa et al. (2001) with minor modifications. Briefly, 0.5 ml of 21% (v/v) HClO₄ were added to 10 mg of mitochondrial protein per milliliter of suspension and incubated during 30 min in an ice cold bath. The suspension was centrifuged at 8,000 \times g and the supernatants neutralized. NAD⁺ was determined fluorometrically at λ_{ex} 340 nm and λ_{em} = 460 nm, by measuring NAD⁺ – dependent lactate dehydrogenase activity in a medium containing 3 μ g of lactate dehydrogenase from rabbit muscle, 400 mM hydrazine, 500 mM glycine and 10 mM L-lactate, pH 9.0, at 25°C.

Mitochondrial oxygen consumption was measured using a Clark-type oxygen electrode (Yellow Springs Instruments, OH, USA). The experiments were carried out in 1.5 ml of basic medium. State 4 respiration was evaluated in the presence of 10 mM succinate plus 1 μ g.ml⁻¹ rotenone, or 10 mM sodium glutamate and 5 mM sodium malate. State 3 respiration was measured after addition of 200 μ M ADP. The respiratory control index (RC) was calculated as the ratio between state 3 and state 4 rates. Uncoupled respiration was measured by adding 1 μ M carbonyl cyanide m-chlorophenylhydrazine.

Protein oxidation and aconitase activity in post-conditioned hearts

In order to evaluate oxidative stress in the post-conditioned hearts, we measured protein oxidation in homogenates with the OxyBlotTM protein oxidation detection kit (Chemicon[®] International, Inc.) and aconitase activity in mitochondria. Briefly, heart tissue was homogenized in phosphate buffered saline (PBS), pH 7.0, containing 1 mM PMSF

and 50 mM DTT, to prevent oxidation of proteins after cell lysis. Then, two aliquots of each sample (20 μ g) were transferred to eppendorf tubes and denatured by adding a final concentration of 6% SDS. One aliquot was derivatized to 2,4 dinitrophenylhydrazone (DNP) with 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH), while the aliquot used as the negative control was incubated with the same volume of derivatization-control solution. Then, samples were neutralized and separated by SDS-PAGE, transferred to PVDF membranes and incubated with rabbit anti-DNP antibodies (1:150) in 1% BSA/PBS-T. HRP-conjugated secondary antibodies (1:300) and a chemiluminescent reagent were used for signal detection.

Aconitase activity was evaluated by measuring cis-aconitate formation at 240 nm, as described by Hausladen and Fridovich (1994).

Cytochrome c release from mitochondria

Cytochrome c content in mitochondria was evaluated by western blot, using a primary monoclonal antibody against cytochrome c (1:1000). Phosphatase alkaline-conjugated secondary antibodies were used, followed by enhanced chemiluminescence system detection. To assess protein loading, the membranes were “stripped” in a buffer containing 62.5 mM Tris/HCl, 100 mM β -mercaptoethanol, 2% SDS, pH 6.7, for 20 min at 50°C; then, the membranes were incubated against anti-ANT polyclonal antibodies (1:500).

Data analysis

Data are presented as means \pm SD for each experimental protocol. Significance ($P \leq 0.005$) was determined for discrete variables by analysis of variance (ANOVA), using the data analysis and technical program MicrocalTM OriginTM from Microcal Software, Inc. (1999).

Statement of responsibility

The authors had full access to the data and take responsibility for their integrity. All authors have read and agreed to the manuscript as written.

Results

Cardiac function

Cardiac mechanical work of hearts subjected to 30 min of ischemia and 60 min of reperfusion decreased dramatically from the first minutes of reperfusion, in remarkable contrast with the hearts subjected to the post-conditioning maneuvers (Fig. 2). There was no significant difference between

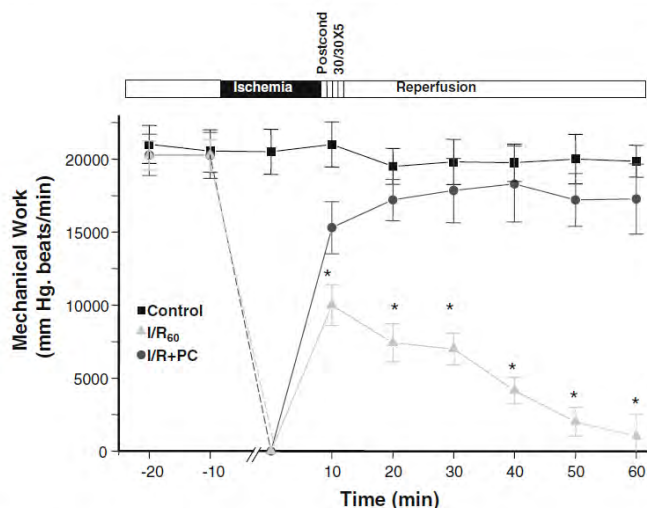


Fig. 2 Post-conditioning protects myocardial performance against reperfusion injury. After a 20-minute equilibration time, the hearts were subjected to global ischemia for 30 min, indicated by the dotted line. Then, the perfusion pump system was restarted and the hearts were reperfused during 60 min. Post-conditioned hearts were subjected to five cycles of 30 s of ischemia and 30 s of reperfusion, before starting prolonged ischemia and reperfusion. (■) Control; (▲) I/R and (●) I/R + PC. Data represent the mean of 14 experiments \pm S.D. * $P < 0.05$ vs. Control

mechanical work of I/R + PC hearts and control hearts after reperfusion from minute 20 to minute 60.

Mitochondrial integrity and mPTP opening

At the end of the reperfusion, the hearts were removed from the perfusion system and mitochondria were obtained as described. The results in Table 1 show that mitochondrial function, evaluated by state 3 respiration, RC and uncoupled respiration, either using succinate or malate/glutamate as substrates, was only depressed in I/R₆₀ hearts, but was maintained in I/R + PC hearts compared with the control values.

We measured mitochondrial swelling, calcium transport and NAD⁺ content; all these parameters were used to

evaluate mitochondrial integrity and are indicative of mPTP opening. An increase in inner membrane permeability has been frequently proposed as a mechanism to explain irreversible cardiac injury in ischemia-reperfusion. In this regard, it was important to demonstrate that mitochondria from post-conditioned hearts were resistant to the opening of this mega-channel. Only I/R₆₀ mitochondria showed extensive and spontaneous swelling; mitochondria from I/R₅ hearts had a delayed swelling response, whereas mitochondria from control, I/R + PC, and PC hearts maintained the same volumes until the uncoupler CCCP was added (Fig. 3A). Extensive swelling in I/R₆₀ mitochondria was fully prevented by treatment with CSA, a classic mPTP inhibitor.

mPTP is also characterized by the non-specific efflux of calcium and other metabolites from the mitochondrial matrix. Calcium was accumulated in control mitochondria, contrasting with mitochondria isolated from I/R₆₀ hearts, which, as a consequence of mPTP opening, were unable to retain calcium; again, mitochondria exposed only to 5 min of reperfusion (I/R₅) showed a partial activation of the mPTP. This condition was also fully prevented by CSA treatment. Conversely, no calcium efflux was observed in either I/R + PC mitochondria or in mitochondria obtained from hearts at the end of the post-conditioning cycles of ischemia and reperfusion (PC), indicating that the pore remained closed (Fig. 3B).

A recent demonstration indicated that mitochondrial NAD⁺ content in the intact heart is severely depressed during reperfusion. This process is largely decreased by CSA, therefore reflecting the transition pore opening *in situ* (Di Lisa et al. 2001). Our results indicate that NAD⁺ content diminished as a function of reperfusion time (Fig. 4). At only 5 min after reperfusion (I/R₅), 6.4 ± 1.8 nmol NAD⁺/mg protein were detected and after 60 min of reperfusion (I/R₆₀) this value diminished to 1.4 ± 0.5 nmol NAD⁺/mg protein. Remarkably, at the end of the post-conditioning maneuver (PC), NAD⁺ content was maintained comparable to control values (9.7 ± 1.3 nmol NAD⁺/

Table 1 Oxygen consumption in mitochondria from post-conditioned hearts

	State 4 malate/ glutamate (ngAO/min/mg)	State 3 malate/ glutamate (ngAO/min/mg)	RC	Uncoupled respiration (ngAO/min/mg)	State 4 succinate + rotenone(ngAO/ min/mg)	State 3 succinate + rotenone(ngAO/ min/mg)	RC
Control	53.0	169.5	3.2	84.3	15.2	81.3	5.3
I/R ₆₀	39.6	39.6 Plus succinate:51.8	1	41.6	41.6	41.6	1
I/R + PC	56.5	224.7	3.9	108.4	20.3	88.9	4.3

The experiments were carried out at 25°C in 1.7 mL of respiration medium containing 125 mM KCl, 10 mM Hepes and 3 mM phosphate, pH 7.3. Incubations were started by adding 1.5 mg of mitochondrial protein. State 4 respiration was evaluated with 10 mM succinate plus 1 μ g/mL rotenone and with 10 mM sodium glutamate and 5 mM sodium malate as substrates. State 3 respiration was stimulated by the addition of 200 μ M ADP. RC was calculated as the ratio between state 3 and state 4 rates. Uncoupled respiration was determined after addition of 1 μ M CCCP. Values are the means of two different preparations in duplicate for each group.

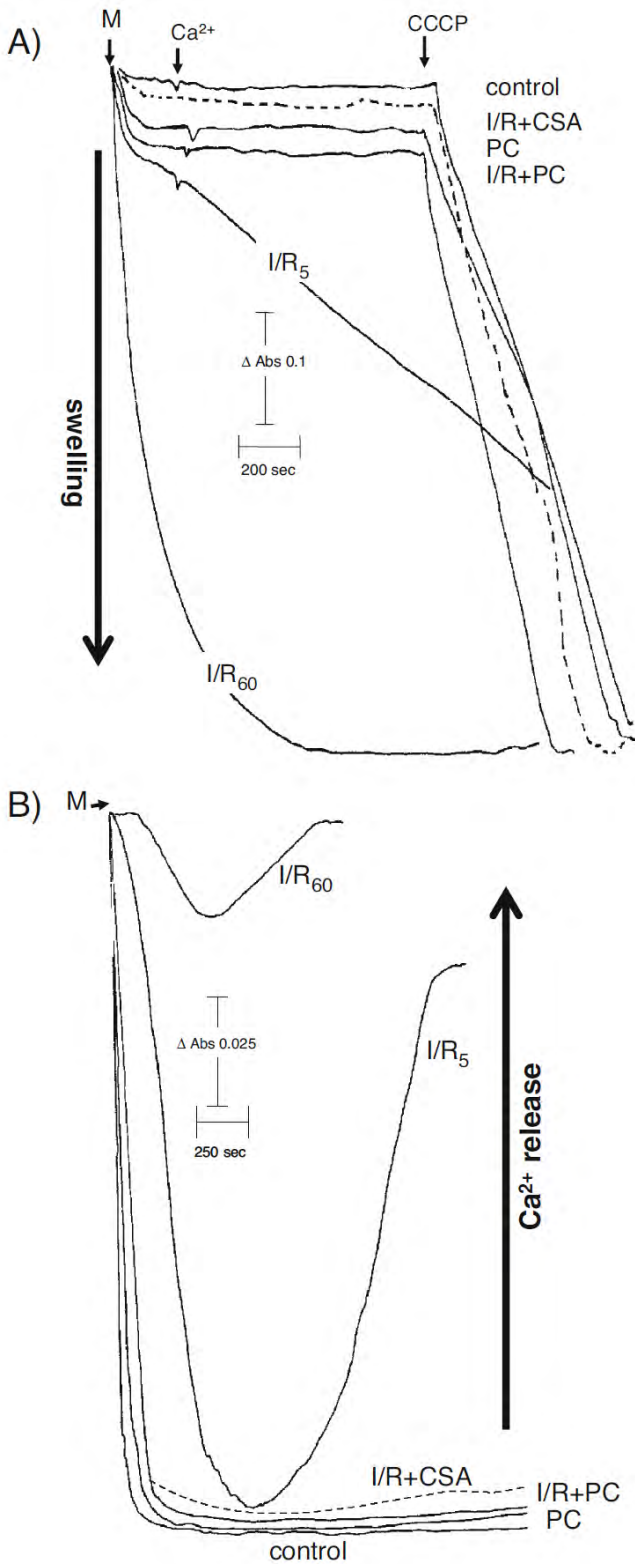


Fig. 3 Mitochondrial permeability transition pore opening in mitochondria isolated from post-conditioned hearts. **A)** Mitochondrial swelling. 2 mg of mitochondrial protein were added to the medium described in Material and Methods. Where indicated 50 μM CaCl_2 and 0.5 μM CCCP were added. **B)** Mitochondrial calcium transport. Calcium uptake and release were determined by Arsenazo III absorbance changes. 50 μM CaCl_2 was present in the medium before mitochondrial addition. Dotted lines indicate mitochondria from hearts perfused with 0.2 μM Cyclosporin A (CSA). Tracings are representative of at least three different experiments

similar to that of control heart value (10.45 ± 1.5 nmol NAD^+ /mg protein). These findings indicate that post-conditioning maneuvers activate mechanisms that maintain conditions that inhibit mPTP opening at early reperfusion.

Protein oxidation in homogenates and aconitase activity in post-conditioned hearts

Oxidative modification of proteins by oxygen free radicals results in the introduction of carbonyl groups into protein side-chains. Carbonyl groups were derivatized to DNP-hydrazone and detected with primary antibodies, specific to the DNP moiety of the proteins. Oxidative modification of proteins was evident at early reperfusion (I/R₅) and it was exacerbated in I/R₆₀. A slight increase in protein oxidation was observed early after the post-conditioning maneuver (PC), but carbonylation was totally abolished at the end of reperfusion (I/R + PC) (Fig. 5A).

Also, mitochondrial aconitase activity, a Fe-S cluster enzyme that is inactivated by superoxide and peroxynitrite was measured, as its inactivation is a reliable marker for mitochondrial superoxide production. The activity in mitochondria from ischemic (106 ± 50.5 nmol/min/mg), I/R₅ (127 ± 34.8 nmol/min/mg) and I/R₆₀ hearts (157 ± 18.7 nmol/min/mg) hearts was significantly lower than in mitochondria obtained from control (255 ± 24.6 nmol/min/mg) and post-conditioned hearts (197 ± 47.9 nmol/min/mg). Interestingly, aconitase activity in hearts only subjected to post-conditioning without reperfusion, was slightly higher than the activity found after long reperfusion in post-conditioned hearts (233 ± 54.4 nmol/min/mg vs 197 ± 47.9 nmol/min/mg) (Fig. 5B).

Cytochrome c release in post-ischemic hearts

To determine if apoptosis triggering was also prevented by post-conditioning, we measured cytochrome c release under the referred conditions. Cytochrome c content of mitochondria obtained from hearts subjected to 30 min of ischemia and to 60 min of reperfusion were analyzed by western blot. Mitochondrial cytochrome c obtained from reperfused hearts (I/R₆₀) showed a clear diminution as compared with mitochondria obtained from control and I/R + PC hearts

mg protein vs. 10.45 ± 1.5 nmol NAD^+ /mg protein) and persisted along the prolonged reperfusion (9.0 ± 0.9) (I/R + PC). Noteworthy was the fact that NAD^+ content in hearts subjected to 60 min of reperfusion, but previously treated with CSA (10.34 ± 0.66 nmol NAD^+ /mg protein), remained

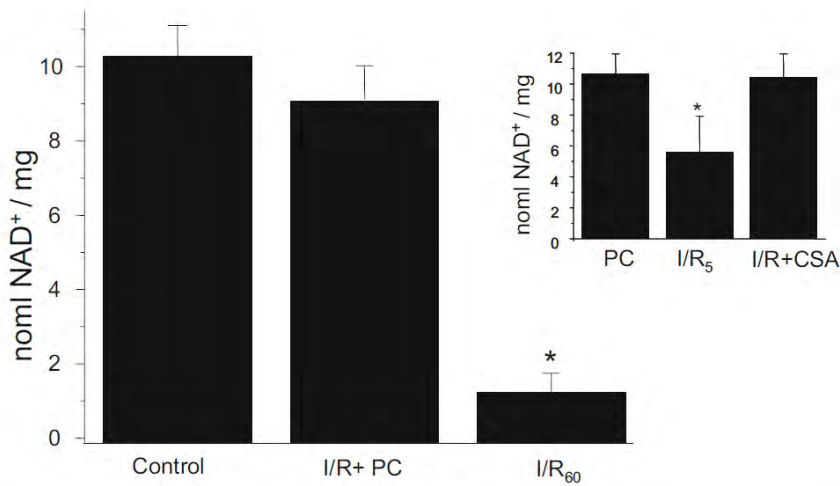


Fig. 4 Mitochondrial NAD⁺ content in post-conditioned hearts at early reperfusion and after prolonged reperfusion. The post-conditioned hearts were removed from the Langendorff system to obtain mitochondrial fractions after early and prolonged reperfusion. The

insert represents NAD⁺ content in PC, IR₅ and IR₆₀ hearts perfused with CSA. Data represent the mean ± S.D of three different experiments. * P≤0.05 vs. Control

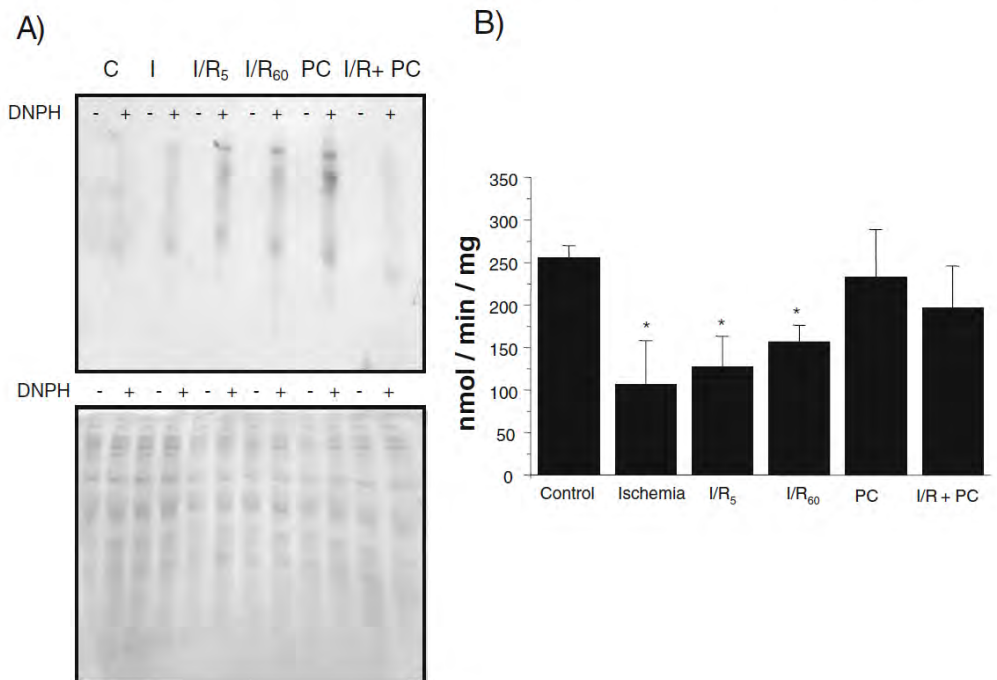
(Fig. 6). It should be noted that in our experiments cytochrome c content in ischemic mitochondria was comparable to cytochrome c levels from control mitochondria, although it has been reported that cytochrome c is released during ischemia by a direct effect of oxygen deprivation in reperfused rat livers (Morin et al. 2004).

Discussion

Recently Zhao et al. (2003) reported that brief cycles of occlusion and reperfusion of the coronary artery, applied

before reperfusion and after a relatively prolonged ischemia, dramatically diminished the infarct size. Emerging studies suggest that suppression of mPTP opening may underlie the cardioprotection elicited by ischemic post-conditioning. For example, in mitochondria isolated from post-conditioned rabbit hearts, the calcium concentration required to induce the opening of the mPTP was higher than in mitochondria isolated from untreated hearts (Argaud et al. 2005). Relevant to the idea that post-conditioning is related to mPTP regulation, is the demonstration that pharmacological inhibition of the mitochondrial K_{ATP} channels inhibits the post-conditioning effect on the infarct

Fig. 5 Oxidative stress in homogenates from post-conditioned hearts and aconitase activity in mitochondria isolated from post-conditioned hearts. **A)** Autoradiography and Coomassie staining of cardiac homogenates derivatized with DPNH (+) and negative controls for each sample (-). **B)** Aconitase activity in mitochondria expressed as the mean ± SD of three different experiments. * P≤0.05 vs. Control



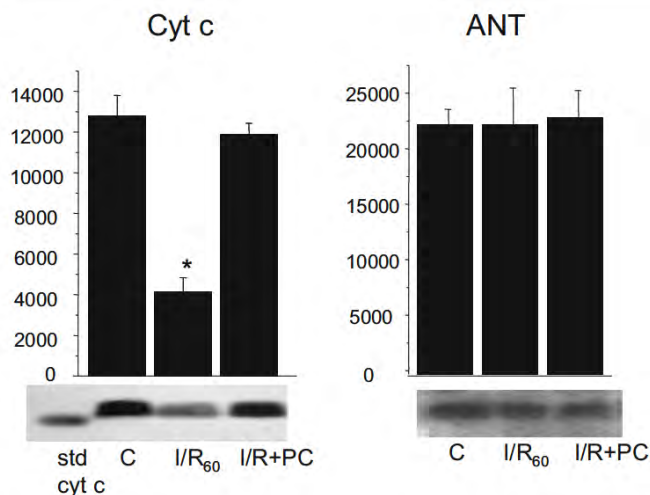


Fig. 6 Cytochrome c content in post-conditioned hearts. Mitochondria obtained from the post-conditioned hearts were evaluated for cytochrome c content by western blot. Total protein (50 μ g) was loaded into each lane of the SDS-PAGE gels and transferred to PVDF membranes. The blots were incubated with a monoclonal anti-cytochrome c antibody (1:1000) in TRIS-buffered saline (TBS), pH 7.0, supplemented with 0.1% Tween 20. The membranes were incubated with an alkaline phosphatase-conjugated secondary antibody before enhanced chemiluminescent detection. ANT content was also determined as the loading marker. The blots are representative of three separate experiments using different hearts for each experimental protocol. * $P \leq 0.05$ vs. Control

size (Penna et al. 2007). In this sense, it has been suggested that the cardioprotective effect of the activation of the mitochondrial K_{ATP} channels promotes transient mitochondrial depolarization and, thereby, a reduction in mitochondrial calcium overload, avoiding mitochondrial irreversible damage (Holmuhamedov et al. 1999).

In addition, a recent report shows that hearts deficient in cyclophilin-D, a key component of the mPTP, are resistant to the cardioprotective action of post-conditioning (Lim et al. 2007). Although the actual mechanism by which post-conditioning inhibits the mPTP has not been described, it has been postulated that mPTP inhibition may occur through the activation of protein kinases, such as Akt, GSK-3 β (Juhászová et al. 2004), or PKC- ϵ (Costa et al. 2006).

An important question in mPTP experiments with isolated mitochondria is if the isolation procedure selected mitochondrial populations with different susceptibility to reperfusion damage, and if so, whether calcium-induced mPTP opening is a consequence and not a cause of myocardial damage. In this respect, NAD^+ diminution in the intact heart during reperfusion has been related to mPTP gating *in situ* (Di Lisa et al. 2001). This research group reported that the NAD^+ stored in the mitochondrial matrix becomes available for cytosolic and nuclear processes only after its release through the permeability transition pore, as the process is largely prevented by CSA. Accordingly, we have showed that mPTP opening and NAD^+ depletion are

abolished in hearts subjected to post-conditioning. It is worthwhile to mention that in our experiments, the NAD^+ content in control mitochondria isolated from perfused hearts, was comparable to NAD^+ values from normoxic hearts perfused with CSA or MeVal-4-CS before mitochondria isolation (Di Lisa 2001), discarding the possibility that NAD^+ depletion occurred as a consequence of the mitochondrial isolation procedure.

In a previous work we found that, in mitochondria obtained from reperfused hearts, cytochrome c release leads to a significant activation of caspase-3 activity after 30 min of reperfusion, in close correlation with mPTP opening (Correa et al. 2007). Similar results using mPTP inhibitors, such as CSA and NIM811 (Argaud et al 2005), reinforced a primary role of the mPTP for triggering the intrinsic apoptotic pathway, during reperfusion damage.

Cytochrome c release remains as a hallmark for the involvement of mitochondria in apoptosis. A suggested mechanism to explain cytochrome c release from mitochondria is that calcium, along with other stimuli, induces the opening of the mitochondrial permeability transition pore (mPTP), promoting extensive swelling, outer membrane rupture and delivery of pro-apoptotic mitochondrial modulators. Several apoptotic pathways could act concertedly in response to reperfusion/reoxygenation-mediated events. For example, some groups have demonstrated the participation of JNK and p38-mitogen-activated protein kinase signaling pathways in the attenuation of cardiomyocyte apoptosis during post-conditioning (Sun et al. 2006).

An increase in ROS generation would lead to irreversible damage to mitochondrial membrane lipids and proteins resulting in mitochondrial dysfunction and ultimately in cell death (Kowalstowski et al. 1999). Some research groups suggest that post-conditioning protection is achieved, at the time when blood supply is restored, by inhibiting oxidant generation or oxidant-mediated injury (Kin et al. 2004). Penna et al (2007) proposed that intermittent targeting of bradykinin B_2 receptors and mitochondrial K_{ATP} channels during early reperfusion, triggers post-conditioning protection via ROS signaling and that the post-conditioning protection is only achieved if ROS production is timely and not reduced by free radical scavengers. In this respect, our experimental data showed that carbonylation of proteins was prevented in post-conditioned heart homogenates (I/R + PC), but such prevention was not evident at the end of the post-conditioning maneuver (PC). However, aconitase activity was early preserved in PC mitochondria, strengthening the notion that the threshold between the signaling and the deleterious effect of ROS is highly regulated. It is known that ROS, NO and peroxynitrite exert beneficial or deleterious effects depending on their amount, compartmentalization and timing of generation (Pagliaro 2003; Becker 2004).

In summary, mitochondrial integrity could be maintained in the post-conditioned heart as a result of a reduction of the intracellular calcium overload and a diminution of ROS-generation and ROS-mediated lipid and protein peroxidation. In fact, it has been reported that ROS and high intramitochondrial Ca^{2+} may act together to trigger MPT opening (Crompton 1999; Doran & Halestrap 2000; Duchen 2000); however, further investigation is needed to gain an insight into whether ROS generation is an integral part of the signaling machinery of mPTP rather than a consequence of mPTP opening.

Acknowledgments This work was partially supported by grant 80791-M to Cecilia Zazueta, from the National Council of Science and Technology (CONACyT), Mexico and was submitted in partial fulfillment of the requirements for the Doctorate in Biomedical Sciences of Francisco Correa Segura at the National Autonomous University of Mexico (UNAM). This author also thanks CONACyT for scholarship support.

References

- Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M (2005) *Circulation* 111:194–197
- Becker L, Ambrosio G (1987) *Prog. Cardiovasc Dis.* 30:3–44
- Becker L (2004) *Cardiovasc. Res.* 61:461–470
- Bopassa J, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M (2006) *Cardiovasc. Res.* 69:178–185
- Borutaite V, Budriunaite A, Morkuniene R, Brown G (2001) *Biochim. Biophys. Acta.* 1537:101–109
- Chávez E, Briones R, Michel B, Bravo C, Jay D (1985) *Arch. Biochem. Biophys.* 242:293–397
- Correa F, Soto V, Zazueta C (2007) *Int. J. Biochem. & Cell Biol.* 39:787–798
- Costa A, Jakob R, Costa C, Andrukhiv K, West I, Garlid K (2006) *J. Biol. Chem.* 281:20801–20808
- Crompton M (1999) *Biochem. J.* 341:233–249
- Doran E, Halestrap AP (2000) *Biochem. J.* 348:343–350
- Duchen MR (2000) *Cell Calcium* 28:339–348
- De Moissac D, Gurevich R, Zheng H, Singal P, Kirshenbau (2000) *J. Mol. Cell. Cardiol.* 32:53–63
- Di Lisa F, Menabò R, Canton M, Barile M, Bernardi P (2001) *J. Chem.* 276:2571–2575
- Forman M, Virmani R, Puett D (1990) *Circulation* 81:69–78
- Freude B, Masters T, Robicsek F, Fokin A, Kostin S, Zimmermar Ullmann C, Lorenzo-Meyer S, Schaper J (2000) *J. Mol. Cardiol.* 32:197–208
- Gateau-Roesch O, Argaud L, Ovize M (2006) *Cardiovasc.* 70:264–273
- Gómez L, Paillard M, Thibault H, Derumeaux G, Ovize M (2) *Circulation* 117:2761–2768
- Griffiths E, Javadov S, Clarke S, Das M, Lim K, Halestrap A (20) *Physiology.* 549:513–524
- Halestrap A (2006) *Biochem. Soc. Trans.* 34:232–237
- Hausladen A, Fridovich I (1994) *J. Biol. Chem.* 269:29405–294
- Hearse D, Bolli R (1992) *Cardiovasc. Res.* 26:101–108
- Holmuhamedov E, Wang L, Terzic A (1999) *J. Physiol.* 519:347
- Juhászova M, Zorov D, Kim S, Pepe S, Fu Q, Fishbein K (20) *Clin. Invest.* 113:1535–1549
- Kendrick N (1976) *Anal. Biochem.* 76:487–501
- Kin H, Zhao Z, Sun H, Wang N, Corvera J, Halkos M, Keren Guyton R, Vinten-Johansen J (2004) *Cardiovasc. Res.* 62:7
- Kowaltowski A, Vercesi A (1999) *Free Radic. Biol. Med.* 26:463
- Lim S, Davidson S, Hausenloy D, Yellon D (2007) *Cardiovasc.* 75:530–535
- Lowry O, Rosenbrough N, Farr A, Randall L (1951) *J. Biol. C* 193:265–275
- Morin D, Pires F, Plin C, Tillement J (2004) *Biochem. Pharm* 68:2065–2073
- Pagliari P (2003) *Life Sci.* 73:2137–2149
- Penna C, Mancardi D, Rastaldo R, Losano G, Pagliaro P (2) *Cardiovasc. Res.* 75:168–177
- Sun H, Wang N, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton Vinten-Johansen J, Zhao Z (2006) *Apoptosis* 11:1583–15
- Zhao Z, Corvera J, Halkos M, Kerendi F, Wang N, Guyton Vinten-Johansen J (2003) *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Phy* 285:579–588

Post-conditioning Preserves Glycolytic ATP During Early Reperfusion: A survival Mechanism for the Reperfused Heart

Francisco Correa, Noemí García, Juan Carlos Gallardo-Pérez, Liliana Carreño-Fuentes, Sara Rodríguez-Enríquez, Alvaro Marín-Hernández and Cecilia Zazueta

Departamento de Bioquímica, Instituto Nacional de Cardiología, I. Ch., Juan Badiano No. 1., Col. Sección XVI, México 14080, D.F.

Key Words

Post-conditioning • Iodoacetate • Glycolysis • Reperfused heart • ATP

Abstract

Background: Glycolytic activity during the transition period from anaerobic to aerobic metabolism has been demonstrated to be critical for heart recovery in isolated reperfused hearts. The purpose of this work was to investigate the relevance of the glycolytic pathway in preserving the cardiac function of post-conditioned hearts. **Methods:** The activation of the glycolytic pathway in post-conditioned hearts was evaluated by measuring GLUT-4 insertion, glucose consumption and lactate production. Iodoacetic acid and 2-deoxy-D-glucose were administered to the working hearts to evaluate the effect of glycolytic inhibition in the post-conditioning protective effect. **Results:** Post-conditioning maneuvers applied to isolated rat hearts, after prolonged ischemia and before reperfusion, promoted recovery of cardiac mechanical function with sustained increase of GLUT-4 translocation and activation of the glycolytic pathway during ischemia and early reperfusion. Iodoacetate

inhibited the protective effect of post-conditioning, without affecting the mitochondrial oxidative capacity. Glycolysis contribution to maintain mechanical function at early reperfusion was observed in post-conditioned hearts perfused with 2-deoxy-D-glucose and in hearts in which iodoacetate was administered only during reperfusion. **Conclusion:** It is concluded that in the post-conditioned heart, a functional compartmentation of anaerobic energy metabolism, at early reperfusion, plays a significant role in cardiac protection against reperfusion damage.

Copyright © 2008 S. Karger AG, Basel

Introduction

Paradoxically, although rapid initiation of reperfusion is the most effective treatment to reduce infarct size resulting from myocardial ischemia, it has the potential to induce additional lethal injury that is not evident at the end of the ischemia. This process is known as reperfusion injury [1-3].

Reperfusion injury is the consequence of numerous mechanisms activated in the intracellular and extracellular

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2008 S. Karger AG, Basel
1015-8987/08/0226-0635\$24.50/0

Accessible online at:
www.karger.com/cpb

Cecilia Zazueta Ph. D.
Instituto Nacional de Cardiología, I. Ch., Departamento de Bioquímica,
Juan Badiano No. 1, Colonia Sección XVI, México 14080, D.F. (Mexico)
Tel. +52-55-5573-2911 (1465), Fax +52-55-5573-0926
E-Mail azazueta@yahoo.com

environment. Owing to its diverse and numerous causes, reperfusion injury is expressed physiologically in equally diverse ways, including endothelial and vascular dysfunction, sequels of impaired blood flow, metabolic dysfunction, contractile dysfunction, dysrhythmia, cellular necrosis, and apoptosis. Several strategies have been developed to contend with reperfusion injury. Zhao et al. 2003 [4] reported that brief periods of ischemia-reperfusion, applied at the onset of the coronary reflow, significantly reduce the infarct size. This mechanical maneuver is known as “post-conditioning” [4]. Elucidation of the molecular mechanisms activated by “post-conditioning” is the subject of intensive research in several laboratories. Some studies indicate that post-conditioning cardioprotection is dependent on protein kinase C (PKC) [5], $\text{mitoK}_{\text{ATP}}$ opening [6] and myocardial acidosis [7].

It has been reported that glycolytic activity during the transition period from anaerobic to aerobic metabolism is critical for myocardial recovery in isolated reperfused hearts after 20 min of global ischemia [8]. There are also evidences indicating that heart recovery after ischemia and short reperfusion has improved in conditions of higher availability of glycolytic substrates [9, 10]. Further, it has been suggested that glycolytic ATP could be relevant in maintaining calcium homeostasis during reperfusion [11, 12]. Thus, the purpose of this work was to investigate the role of glycolysis in the cardioprotection exerted by post-conditioning in isolated reperfused rat hearts.

Materials and Methods

This investigation was performed in accordance with the Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, published by the United States National Institutes of Health (US-NIH).

Male Wistar rats (400-450 g) were anesthetized with sodium pentobarbital (60 mg/kg) and sodium heparine (1000 U/kg). Five minutes after heparin injection, a midsternal thoracotomy was performed and the heart was rapidly excised and placed in ice-cold Krebs-Henseleit buffer solution of pH 7.4, consisting of 118 mM NaCl, 4.75 mM KCl, 1.18 mM KH_2PO_4 , 1.18 mM $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2.5 mM CaCl_2 , 25 mM NaHCO_3 , supplemented with 5 mM glucose, and 100 μM sodium octanoate unless otherwise indicated. The heart was mounted onto a Langendorff heart perfusion system and perfused retrogradely, via the aorta at a constant flux of 12 ml/min with Krebs-Henseleit solution, which was continuously bubbled with 95% O_2 and 5% CO_2 at 37°C. Mechanical work was measured at left ventricular end-diastolic pressure of 10 mm Hg using a latex balloon inserted into the left ventricle and connected to a pressure transducer. All variables were recorded using a computer acquisition data system designed by the Instrumentation and Technical Development Department of the

National Institute of Cardiology (México, D.F., México).

Krebs-Henseleit buffer was perfused for 20 min to stabilize the heart. The ischemic and reperfused hearts were subjected to global ischemia for 30 min by turning off the pumping system. The post-conditioning maneuver consisted of five cycles of ischemia-reperfusion, 30 seconds of ischemia and 30 seconds reperfusion per cycle (PC), followed by 60 min of reperfusion ($\text{I/R}_{60} + \text{PC}$). Hearts without post-conditioning were reperfused for additional 60 min after ischemia (I/R_{60}).

Hearts that developed arrhythmia before ischemia were discarded and replaced. Thus, all analyses represent hearts that did not show electrical dysfunction before ischemia.

GLUT-4 immunoblot analysis

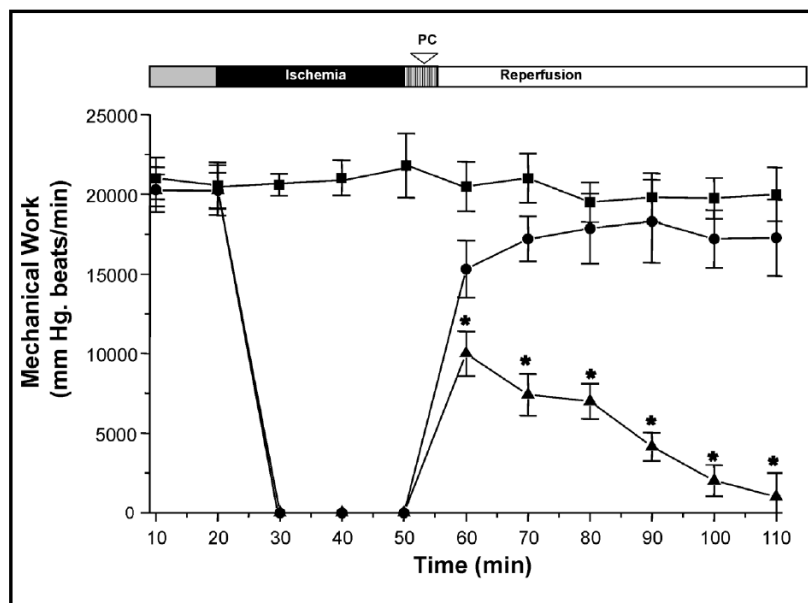
At the end of different treatments (Figure 2A), the rat hearts were quickly frozen and stored in liquid nitrogen. Cardiac tissue was powdered with a pre-chilled pestle in a frozen mortar and dissolved in an ice-cold buffer of pH 7.4 containing 0.2 M Tris-HCl, 10 mM EDTA, 0.25 M sucrose, 0.2 mg/ml benzamidine, 10 mg/ml aprotinin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 100 mM sodium fluoride, 10 mM sodium pyrophosphate, and 1 mM sodium orthovanadate. The homogenates were centrifuged at 8700 x g for 20 min. The pellet containing sarcolemma membranes was resuspended in the buffer, homogenized again, and centrifuged at 750 x g for 10 min and then at 270 x g for 10 min each. The resulting supernatants from the two centrifugations were combined and centrifuged for 30 min at 10 000 x g, and the resulting supernatant was centrifuged again at 48 000 x g for 60 min. GLUT-4 insertion was measured by western blot technique using a primary polyclonal anti-GLUT-4 antibody (1:2,000) (Sigma-Aldrich, MO) and a detection system of enhanced chemiluminescence. Control loading was achieved by incubating the membranes against anti- Na^+/K^+ ATP_{ase} (Santa Cruz, CA) polyclonal antibodies.

Glucose consumption and lactate production

Glucose utilization was measured as the formation of [^3H] water during perfusion using [$5\text{-}^3\text{H}$] glucose as substrate as described by Liang et al [13]. Briefly, the hearts were stabilized for 10 minutes in Krebs-Henseleit buffer of pH 7.4, before 5 mM glucose (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) was perfused for additional 20 minutes. Then the hearts were subjected to global ischemia for 30 min and to the post-conditioning maneuver, followed by 60 min of reperfusion with the [^3H] Krebs-Henseleit Buffer. At 10-min time intervals, 500 μl of perfusate were collected in Eppendorf tubes and mixed with 25 μl of 0.6 N HCl, then they were placed inside 20-ml scintillation capped-vials containing 2 ml of distilled H_2O . The formed [^3H] water was allowed to diffuse for 72 hours at 37°C, then the inside tube was removed and 10 ml of scintillation liquid cocktail was added for counting. Diffusion efficiency was calculated using a known amount of tritiated water.

Lactate content was measured as an indicator of glycolysis activation. Acid extracts obtained from heart eluates were neutralized with KOH, and 0.2 ml of each extract was incubated in a medium of pH 9.0 containing 0.4 M hydrazine, 0.5 M glycine, 10 mM NAD^+ . Lactate dehydrogenase activity was spectrophotometrically evaluated as NADH production at 340

Fig. 1. Post-conditioning protects myocardial performance against reperfusion injury. After a 20-min equilibration time, the hearts were subjected to global ischemia for 30 min. Then the perfusion pump system was restarted and the hearts were reperfused for 60 min. Post-conditioned hearts were subjected to five cycles of ischemia-reperfusion, each of 30 s of ischemia and 30 s of reperfusion, before prolonged ischemia and reperfusion. (■) Control; (▲) I/R_{60} and (●) $I/R_{60} + PC$. Data represent the mean of 14 experiments \pm S.D. * $P \leq 0.05$ vs Control.



nm. NADH content was calculated according to a reference curve. Lactate content is expressed as $\mu\text{mol/ml}$.

Hexokinase activity

A coupled hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) reaction was used to evaluate hexokinase activity in myocardial extracts. NADPH production was detected spectrophotometrically ($\epsilon = 6.22 \text{ mM}^{-1}$), in 1 mL KME buffer (100mM KCl, 50 mM MOPS, 0.5 mM EGTA, pH 7.0) plus 2U G6PDH, 1 mM NADP^+ , 15 mM MgCl_2 , glucose and 0.02-0.1 mg of myocardial cytoplasm. The reaction was started with 3mM glucose and initial velocity was calculated as $\text{mU/mg} = \text{nmol/min} \cdot \text{mg}$. Also, tissue samples were mixed with RIPA Buffer containing the anionic detergent IGEPAL (0.5%) and a mixture of protease inhibitors. Samples containing 20 μg of protein and SDS-PAGE loading buffer with 5% β -mercaptoethanol were boiled during 5 minutes and loaded onto 12.5% polyacrilamide gels. Electrotransfer to PVDF membranes (Millipore, MA) was followed by immunoblotting with anti-HXK (1:1 000) and anti- α Tubulin (1:500) (Santa Cruz, CA) polyclonal antibodies. Respective secondary antibody (1:2 000) conjugated with peroxidase (Santa Cruz, CA) was added and the signal was detected by chemiluminescence using the ECL-Plus Detection System (Amersham Bioscience, NJ).

Glycolytic inhibition

To evaluate the effect of glycolytic inhibition in the post-conditioning protective effect, 100 μM of iodoacetic acid (IAA) was perfused to the hearts for 20 min prior to the ischemic period. Another group of hearts was perfused with pyruvate and 5 mM 2-deoxy-D-glucose for 20 min before the ischemia. The hearts were then subjected to post-conditioning and to prolonged reperfusion without the compound. As inhibition of glycolysis before induction of ischemia may compromise recovery by enhancement of myocardial injury occurring during

ischemia, rather than during reperfusion, a group of hearts was perfused after ischemia and after the post-conditioning cycles with 100 μM IAA or with 5 mM 2-deoxy-D-glucose.

Measurement of ATP and phosphocreatine content

Cardiac tissue was extracted with perchloric acid and was neutralized with 3M TRIS-KOH to pH 7.3. ATP content was measured fluorometrically as NAD^+ reduction in a medium of pH 7.4, containing 50 mM TRIS, 10 mM MgCl_2 , 5 mM EDTA, 50 U/ml hexokinase, 50 U/ml glucose 6-phosphatase, and 0.5 ml of neutralized extracts ($\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ and $\lambda_{\text{em}} = 460 \text{ nm}$). NADH content was calculated according to a reference curve as described by Wanders et al.[14]. Phosphocreatine content was also determined in neutralized acid extracts from cardiac tissue by using 19 U/ml creatine kinase, 10 μM ADP, and 2.4 μM N-acetyl-cysteine, according to Bergmeyer [15].

Data analysis

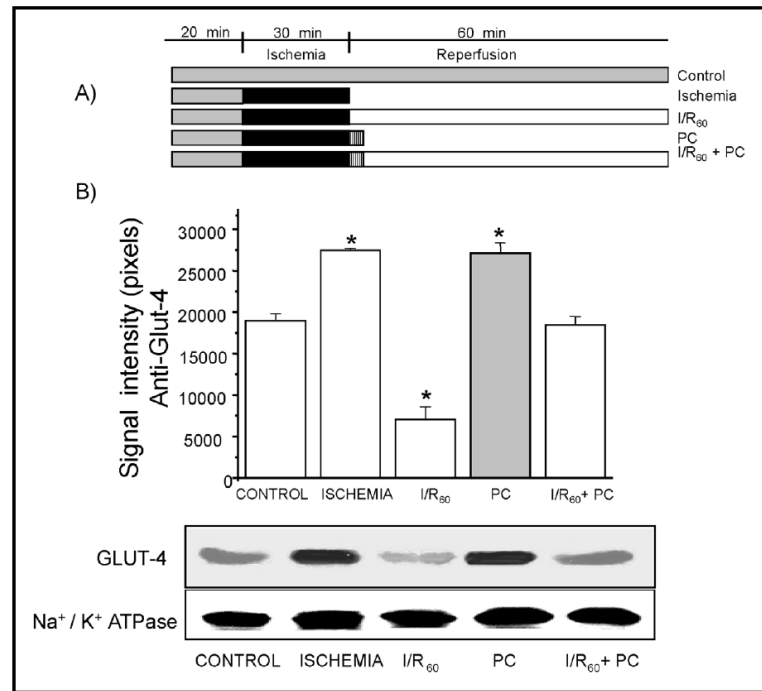
Data are presented as means \pm SD for each experimental protocol. Significance ($P \leq 0.05$) was determined for discrete variables by analysis of variance (ANOVA), using the data analysis and technical program Microcal™ Origin™ from Microcal Software, Inc. (1999).

Results

Cardiac function

Cardiac mechanical work of hearts, subjected to 30 min of ischemia and 60 min of reperfusion (I/R_{60}), decreased dramatically from the first few minutes of reperfusion, compared to the hearts subjected to post-conditioning maneuvers ($I/R_{60} + PC$) (Figure 1). After reperfusion from minute 20 to minute 60, there was no

Fig. 2. Post-conditioning effect on GLUT-4 insertion into the plasmatic membranes of reperfused hearts. The content of GLUT-4 was evaluated by western blot. Approximately 100 μg of protein was loaded into each lane of the SDS-PAGE gels and was transferred to PVDF membranes. The blots were incubated with polyclonal anti-GLUT-4 antibodies (1:2000) in TRIS-buffered saline (TBS) of pH 7.0, supplemented with 0.1% Tween 20. Then, the membranes were incubated with a biotin-conjugated secondary antibody and with streptavidin-peroxidase before detecting enhanced chemiluminescence. The gray bar represents the mean of the intensity of the signal obtained in post-conditioned hearts before reperfusion. Data represent the mean \pm S.D of four different experiments. * $P \leq 0.05$ vs Control.



significant difference between the mechanical works of I/R₆₀ + PC hearts and control hearts.

GLUT-4 translocation to the sarcolemma membranes is maintained during post-conditioning

To determine whether increased flux of glucose could be relevant to the recovery of ischemic myocardium in post-conditioned hearts, GLUT-4 insertion levels in the sarcolemmal fraction of those hearts were measured. As expected, ischemia increased the amount of GLUT-4 in the sarcolemmal fraction. The activation of the glycolytic pathway, in terms of increased glucose uptake, represents the metabolic response of a jeopardized myocardium to meet the energy demand. Interestingly, the hearts that were subjected to post-conditioning before prolonged reperfusion (PC) showed similar GLUT-4 content than those that experienced ischemia and it show a tendency to return to basal levels only after prolonged reperfusion (I/R₆₀ + PC). Conversely, the hearts that were reperfused for 60 min (I/R₆₀) without post-conditioning treatment showed a dramatic decrease of GLUT-4 compared to that observed in control hearts (Figure 2B).

Glucose metabolism is involved in heart myocardial recovery after post-conditioning

To determine the contribution of the activation of the glycolytic pathway in post-conditioning myocardial protection, we perfused hearts with IAA, which at low

doses produces a selective inhibition of GADPH [16]. 5 mM of pyruvate was used as substrate for oxidative metabolism, instead of glucose in glycolysis inhibition experiments, because it was reported that the buildup of glycolytic intermediates (sugar phosphates), following maneuvers that inhibit glycolysis, can negatively affect high-energy phosphate levels and thereby cardiac function [17, 18]. In these experiments, IAA addition would block usage of potential glycogen stores available during ischemia. In this respect it has also been described that pyruvate inhibits glucose utilization [19]. Blockage of glycolysis severely impaired the functional recovery of post-conditioned hearts at early reperfusion - e.g., 100 mm Hg x beat/min (I/R₆₀ + PC + IAA) vs 20 000 mm Hg x beat/min (I/R₆₀ + PC) - and remained so at those values after 1 h. Post-conditioned hearts, using pyruvate as substrate, recovered their post-ischemic function to control levels, after the first 10 min of reperfusion. Control hearts perfused with IAA showed similar function as that shown by control hearts without any treatment, confirming that at the doses used, IAA does not inhibit mitochondrial oxidative capacity (Figure 3). To evaluate if glycolysis remained activated during early reperfusion in the post-conditioned hearts and if it contributed to maintain mechanical function, 100 μM IAA was added to the reperfusion solution along with pyruvate as oxidative substrate after ischemia and after the post-conditioning cycles. IAA perfusion was maintained throughout the reperfusion period. Under such conditions, post-

Fig. 3. Effect of glycolysis inhibition on the mechanical performance of post-conditioned hearts. The hearts were subjected to the protocols described in Figure 1. Additionally, some hearts were perfused, prior to ischemia, with 100 μ M of iodoacetic acid for 20 min, and then subjected to post-conditioning and to prolonged reperfusion without the compound. Control hearts \pm IAA (\blacksquare); I/R₆₀ + PC (\bullet); I/R₆₀ (\blacktriangle); I/R₆₀ + PC + IAA (\blacktriangledown). Data represent the mean \pm SD of three different experiments. *P \leq 0.05 vs Control.

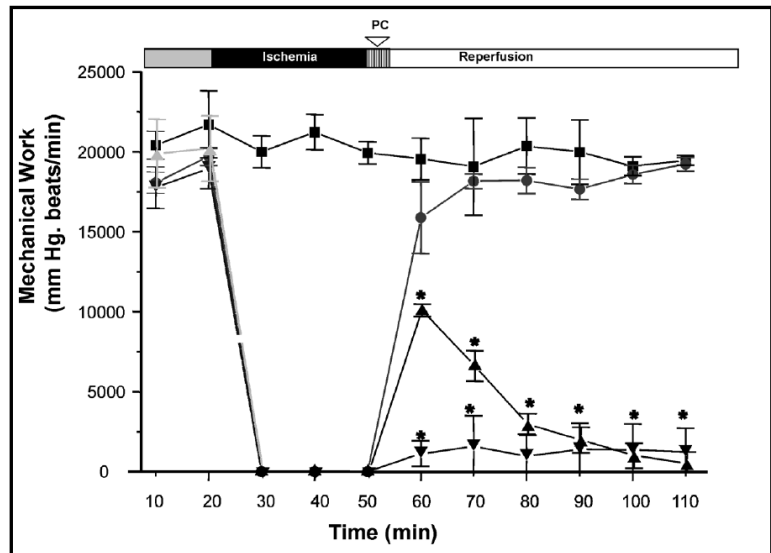
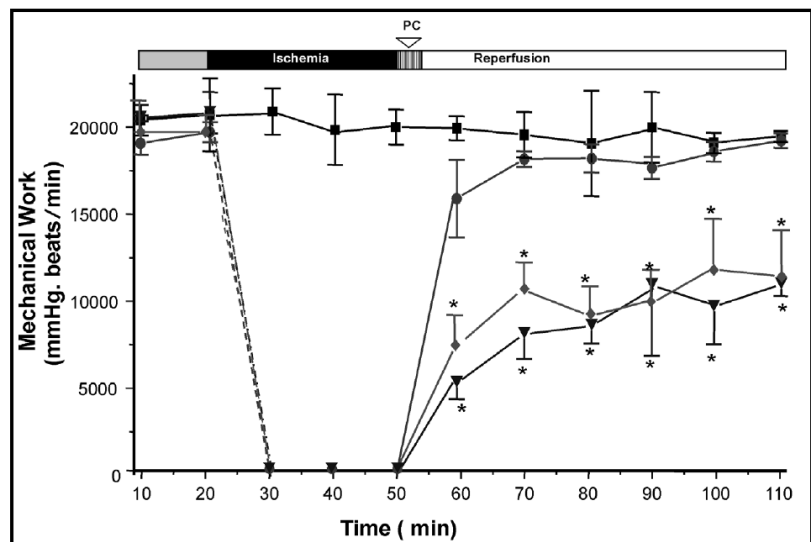


Fig. 4. Effect of glycolytic inhibition on the mechanical function in post-conditioned hearts. Iodoacetic acid (IAA) or 2-deoxy-D-glucose (2-DG) was perfused into post-conditioned hearts only during reperfusion. Control hearts with and without 2-DG (\blacksquare); I/R₆₀ + PC (\bullet); I/R₆₀ + PC + IAA (\blacktriangledown) and I/R₆₀ + PC + 2-DG (\blacklozenge). Data represent the mean \pm SD of three different experiments. *P \leq 0.05 vs Control.



conditioning partially protected heart function (Figure 4). After 10 min of reperfusion, the recovery in the mechanical function of IAA-treated hearts was only 20% of that observed in post-conditioned hearts without the glycolytic inhibitor. An increase in heart function was observed after longer reperfusion, although maximum recovery was only 60% of the functional recovery in post-conditioned hearts without IAA. Another group of hearts received pyruvate and 5 mM of 2-deoxy-D-glucose instead of glucose, and then were subjected to ischemia and to the post-conditioning protocol before reperfusion. Post-ischemic function in these hearts was severely compromised as in the hearts perfused with IAA. Conversely, mechanical work in control hearts perfused with these substrates remained unchanged along all the

protocol (Figures 3 and 4).

Glucose utilization and lactate production

Glucose utilization was determined as the formation of tritiated water from [5-³H] glucose in cardiac effluents. Glucose utilization was greatly enhanced during the first three minutes of reperfusion and it remained significantly greater (P \leq 0.05) during the reperfusion phase in the post-conditioned hearts (Figure 5). We also measured lactate in the eluates of the isolated hearts at the indicated times. Lactate production was almost the same before ischemia in post-conditioned hearts and in hearts without post-conditioning (Figure 6). During the first minutes of reperfusion, an important increase in lactate production was observed in I/R₆₀ hearts that diminished after 10

Fig. 5. Glycolysis measurement in post-conditioned hearts. Production of tritiated water from [5-³H] glucose. Control hearts (■); I/R₆₀ (▲); I/R₆₀ + PC (●). Each value is the mean ± SD of three different experiments in duplicate. *P ≤ 0.05 vs control.

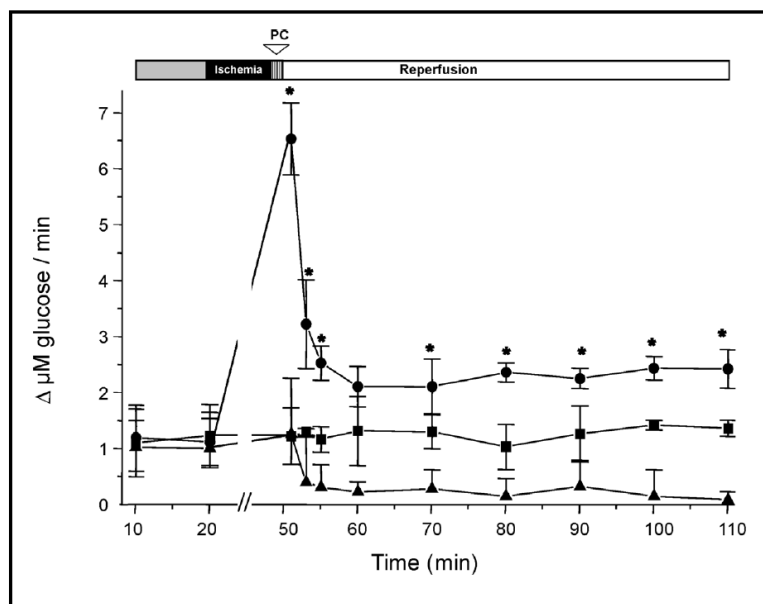
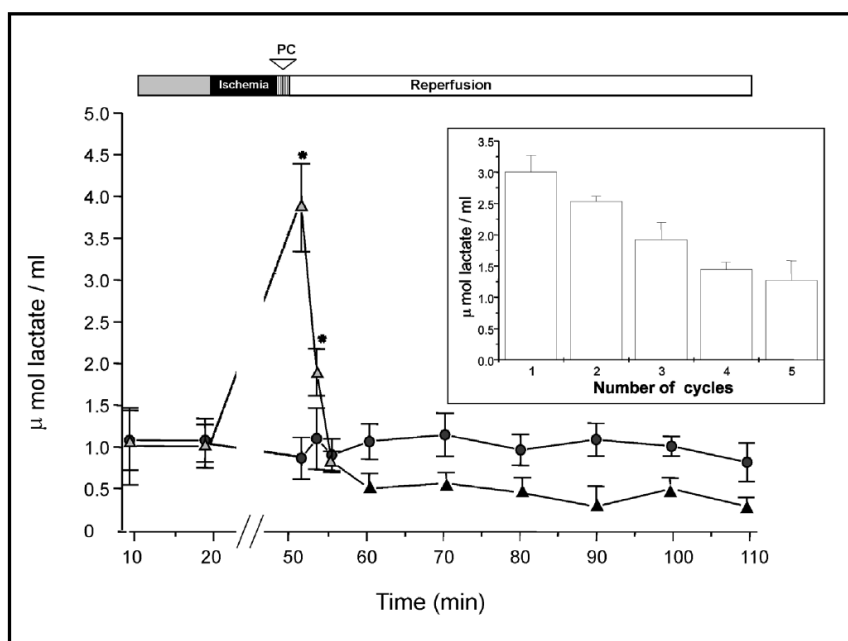


Fig. 6. Lactate content in post-conditioned hearts. Lactate content in eluates from post-conditioned hearts was determined as described under “Materials and Methods”. In the insert is shown lactate efflux during the post-conditioning cycles. I/R₆₀ (▲); I/R₆₀ + PC (●). Data represent the mean ± S.E of three different experiments. * P ≤ 0.05 vs Control.



minutes of reperfusion, and remained significantly lower than lactate content in post-conditioned hearts ($P \leq 0.05$). Conversely, in the post-conditioned hearts, lactate was slowly washed out from the myocardium during the post-conditioning cycles. As a consequence, at the first minute of long reperfusion, lactate efflux in I/R hearts was 4.3 higher than that in post-conditioned hearts ($3.9 \pm 0.5 \mu\text{mol/ml}$ vs $0.9 \pm 0.2 \mu\text{mol/ml}$).

Hexokinase activity in post-conditioned hearts

As hexokinase has been pointed out as a control point in glycolytic flux in the working heart, its activity was measured in hearts subjected to post-conditioning. A remarkable increment in hexokinase activity was determined only during ischemic conditions, but it dropped during reperfusion in both post-conditioned and in non post-conditioned hearts. Accordingly, the enzyme content

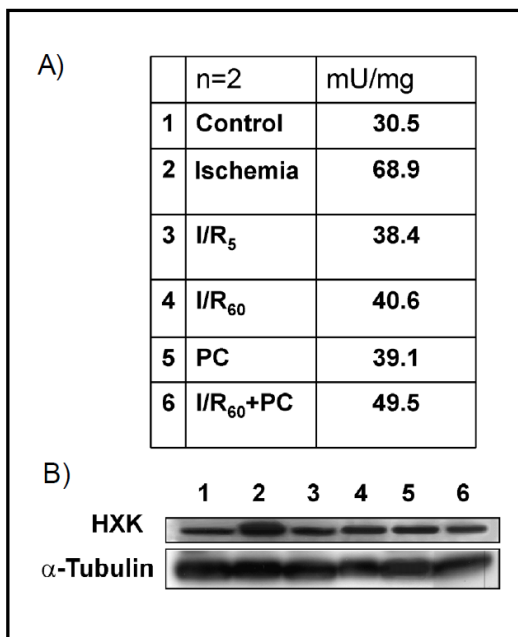


Fig. 7. Hexokinase activity in post-conditioned hearts. A) Activity was determined in cytoplasmic fractions by using a coupled hexokinase/glucose-6-phosphate dehydrogenase reaction. Data represent the mean of two different preparations in duplicate. B) Hexokinase content in the same fractions was evaluated by western blot and compared with tubulin content.

in the hearts subjected to the different protocols showed no differences, except in the ischemic hearts (Figure 7).

ATP and phosphocreatine content in post-conditioned hearts

Table 1 shows that post-conditioned hearts, as compared to control hearts, preserved ATP content and phosphocreatine levels up, to after 60 min of reperfusion.

When IAA was administrated during reperfusion a significantly diminution in ATP was observed, sustained the idea that glycolysis remained activated during reperfusion. Similarly, it was observed that ATP and phosphocreatine contents were depleted after reperfusion at lower values than those detected after 30 min of ischemia. That ATP derived from glycolysis is paramount for heart recovery is demonstrated in Figure 3. In such conditions, pyruvate-oxidizing hearts, perfused with the glycolytic inhibitor IAA and subjected to post-conditioning after ischemia-reperfusion, did not recover heart function and showed ATP values close to ischemic-reperfused

nmol/mg protein	Control	Ischemia	I/R ₆₀	I/R ₆₀ +PC	I/R ₆₀ +PC+IAA
ATP	19.6±2.2	10.6±1.4*	5.4±1.6*	17.6±2.4	9.21±1.6
PCr	27.3±2.5	8.3±2.8*	2.3±0.3*	22.1±4.7	n.e

Table 1. Cytosolic ATP and phosphocreatine content in post-conditioned hearts. High energy phosphates were measured as described under "Materials and Methods". Data represent the mean ± S.D of three different experiments. * $P \leq 0.05$ vs Control. n.e = no evaluated.

hearts (9.2 ± 1.6 nmol ATP/mg protein vs 5.4 ± 1.6 nmol ATP/mg protein). As mentioned before, control hearts perfused with IAA or 2-deoxy-D-glucose along with pyruvate, showed similar function as that shown by control hearts without any treatment, discarding and inhibitory effect of these compounds on mitochondrial oxidative capacity.

Discussion

In the normal heart, the large amount of ATP necessary to sustain contractile function and basal metabolism is generated primarily by mitochondrial oxidative metabolism. The ability of mitochondria to sustain ATP synthesis is highly compromised during ischemia and in such a situation, anaerobic glycolysis becomes an important source for ATP production. It is known that under low oxygen availability, mammalian cells activate adaptation responses, including transcriptional activation of several hypoxia-inducible genes: erythropoietin, glycolytic enzymes, and glucose transporters (GLUT). As a result, glycolysis becomes the major source of ATP production instead of oxidative phosphorylation. Therefore, the aim of this study was to investigate the relevance of the glycolytic pathway for preserving cardiac function in the post-conditioned heart. The results obtained here showed an increase in the insertion of GLUT-4 during ischemia, which remained so up to early reperfusion and showed a tendency to return to control values in post-conditioned hearts only after 60 min of reperfusion (Fig. 2). This is indicative of an enhancement of glycolytic flux by post-conditioning during ischemia and early reperfusion. Previous reports indicate that enhanced glucose uptake and augmented insertion of GLUT-4 transporter, mediated by p38 MAP-kinase, occur due to brief episodes of ischemia before prolonged

ischemia-reperfusion (pre-conditioning) [20]. Also, pre-conditioning increases lactate production and glucose uptake during low flow ischemia [21] and facilitates glycolysis in an early period of reperfusion in the rat heart [22].

A higher rate of glucose oxidation in the post-conditioned hearts may reflect an increase of viable myocytes as compared to I/R hearts. In this respect, our experiments showed that glucose consumption was significantly increased during the early reperfusion phase in the post-conditioned hearts (Figure 5). This result is comparable to that obtained in isolated hearts of transgenic mice over-expressing hexokinase B, in which a sustained increase in glycolysis and lactate production was maintained during the reperfusion phase [13]; however, we did not observe and increase in hexokinase activity in the post-conditioned hearts.

Our results showed that ATP content after the post-conditioning maneuver and before long reperfusion, significantly increased as compared to reperfused hearts without post-conditioning. The relevance of glycolytic ATP in heart recovery after reperfusion has been demonstrated by several groups [8]. For example, Wang et al. 2005 showed that perfusion with high glucose/high insulin improves cardiac efficiency in the isolated reperfused heart after low-flow ischemia [23]. Cross et al. 1995 demonstrated that the utilization of extra glycolytic substrate, either during ischemia or during early reperfusion, enhances functional heart recovery [24]. Accordingly, we showed here that perfusion of IAA or 2-deoxy-D-glucose inhibited the protective effect of post-conditioning (Fig. 3). These data are comparable to Jeremy's findings that the inhibition of glycolysis during reperfusion impairs heart recovery and induces a marked rise in left ventricular end-diastolic pressure, indicating that glycolysis plays a crucial role during functional and metabolic recovery of the post-ischemic myocardium [8]. However, addition of IAA prior to ischemia, would likely affect heart function during ischemia as well as during reperfusion, if less ATP was produced from anaerobic glycolysis. Indeed, our results showed that the ATP produced during prolonged ischemia contributed to sustain 60 % of control heart function at the end of reperfusion (Figure 4). Certainly, IAA is not a specific glycolytic inhibitor, but several reports indicate that a low concentration of IAA, as the one used here, neither inhibits other enzymes, such hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase [25], succinate dehydrogenase [26], nor does it inhibit mitochondrial oxidative capacity from reperfused hearts even at higher doses (e.g., 0.3 mM

IAA) [27]. In this sense, we suggested that glycolysis also contributed to maintain the mechanical function at early reperfusion in the post-conditioned hearts, as the protective effect of the maneuver was significantly inhibited in hearts in which iodoacetate was administered only during reperfusion.

However, as previous works have associated iodoacetate-inhibition of anaerobic glycolysis with marked contracture-rigor, it was possible that IAA-poisoned hearts would result in cell death, hindering the inhibition of post-conditioning protection. It is worth noting that, in canine hearts treated with IAA, depletion of ATP was observed very early at ischemia without lactate accumulation or obvious ultra structural evidence of lethal injury. This suggests that totally ischemic myocytes tolerate a very low level of high energy phosphates if lactate is not accumulated [28]. Consistent with this concept is the reduction in contracture associated with increased lactate efflux in reperfused hearts, in which the use of myocardial carbohydrate was stimulated [29]. The results obtained here show that lactate clears up within the short cycles of post-conditioning, avoiding the deleterious effect of concomitant acidosis, but glycolysis remained activated, providing a complementary source of ATP. In this respect, a speculative explanation could be that hexokinase-mitochondrial interaction during post-conditioning could have a non-enzymatic role in cardioprotection. Binding to hexokinase to the mitochondrial permeability transition pore has been proposed to provide a link between glucose phosphorylation and mitochondrial oxidative phosphorylation, thereby preventing lactate accumulation [30]. The continuous glycolytic ATP production could be used to maintain Na^+/K^+ ATPase activity, preventing the injury caused by Na^+ accumulation via Na^+/H^+ exchange. This has been suggested to occur in models of lactate-induced damage, in which reduction of glycolytic flux during low-flow ischemia leads to inhibition of Na^+/K^+ ATPase activity, increased intracellular Na^+ , and decreased post-ischemic functional recovery [31]. Also, preferential fueling of Na^+/K^+ -ATPase from glycolytically derived ATP has been suggested to sustain normal Na^+ homeostasis in the perfused rat heart [16]. Besides, the prevailing notion is that glucose-derived ATP is directed toward ion transport processes [8]. Calcium transport in sarcoplasmic reticulum (SR) membranes was demonstrated to depend on glycolytic ATP [22] and recently Zima et al. reported an important functional role for glycolysis in intracellular calcium regulation, in terms of the close proximity of the glycolytic enzymes and the Ca^{2+} transport systems of the

sarcoplasmic reticulum [32]. They showed that sugar phosphates, metabolized during glycolysis, modulate local sarcoplasmic reticulum (SR) Ca²⁺ release in cat ventricular myocytes. The effect of sugar phosphates on SR Ca²⁺ release was mediated by altering the activity of two major Ca²⁺ transport systems of the SR, the RyR, and the SR Ca²⁺-ATPase. Other workers reported that accumulation of sugar phosphates due to inhibition of glycolysis caused intracellular Ca²⁺ overload [17]. The authors' data, considered in the light of the foregoing observations, support the notion that in the post-conditioned heart, a functional compartmentation of energy

metabolism could play a significant role in cardiac protection against reperfusion damage.

Acknowledgements

This work was partially supported by the grant 46456-M to CZ from the National Council of Science and Technology (CONACyT), México, and by the grant from the Doctorate Program in Biomedical Sciences of the National Autonomous University of Mexico (UNAM) and CONACyT to FC.

References

- ▶1 Becker LC, Ambrosio G: Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis* 1987;30:23-44.
- ▶2 Forman MB, Virmani R, Puett DW: Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation* 1990;81:69-78.
- ▶3 Hearse DJ, Bolli R: Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res* 1992;26:101-108.
- ▶4 Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, Vinten-Johansen J: Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H579-H588.
- ▶5 Philipp S, Yang XM, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV: Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase c-adenosine A2b receptor cascade. *Cardiovascular Res* 2006;70:308-314.
- ▶6 Yang XM, Proctor JB, Cui L, Krieg T, Downey JM, Cohen MV: Multiple, brief coronary occlusions during early reperfusion protect rabbit hearts by targeting cell signaling pathways. *J Am Coll Cardiol* 2004;44:1103-1110.
- ▶7 Cohen, M., Yang, X-M., James, D: The pH hypothesis of post-conditioning. Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation* 2007;115:1895-1903.
- ▶8 Jeremy R, Ambrosio G, Pike M, Jacobbus W, Becker L: The functional recovery of post-ischemic myocardium requires glycolysis during early reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1993;25:261-276.
- ▶9 Mallet R, Hartman D, Bungler R: Glucose requirement for postischemic recovery of perfused working heart. *Eur J Biochem* 1990;188:481-493.
- ▶10 Bungler R, Mallet R, Hartman D: Pyruvate-enhanced phosphorylation potential and inotropism in normoxic and postischemic isolated working heart. Near complete prevention of reperfusion contractile failure. *Eur J Biochem* 1989;180:221-233.
- ▶11 Xu KY, Zweier JL, Becker LC: Functional coupling between glycolysis and sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ transport. *Circ Res* 1995;77:88-97.
- ▶12 Van Emous, J, Vleggeert-Lankamp, C, Nederhoff, M, Ruigrok, T, Van Echteld C: Postischemic Na⁺-K⁺-ATPase reactivation is delayed in the absence of glycolytic ATP in isolated rat hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2001;280:H2189-H2195.
- ▶13 Liang Q, Donthi R, Kralik P, Epstein P: Elevated hexokinase increases cardiac glycolysis in transgenic mice. *Cardiovasc Res* 2002;53:423-430.
- ▶14 Wanders RJ, Van den Berg GB, Tager JM: A re-evaluation of conditions required for an accurate estimation of the extramitochondrial ATP/ADP ratio in isolated rat liver mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1984;767:113-119.
- ▶15 Bergmeyer HU: *Methods of Enzymatic Analysis*. Vol III. Weinheim, Verlag Chemie; 1974.
- ▶16 Dizon J, Burkhoff D, Tauskela J, Whang J, Cannon P, Katz J: Metabolic inhibition in the perfused heart: evidence for glycolytic requirement for normal sodium homeostasis. *Am J Physiol* 1998;274:H1082-H1089.
- ▶17 Kusuoka H, Marban E: Mechanisms of the diastolic dysfunction induced by glycolytic inhibition: does adenosine triphosphate derived from glycolysis play a favored role in cellular Ca²⁺ homeostasis in ferret myocardium? *J Clin Invest* 1994;93:1216-1223.
- ▶18 Schaefer S, Carr LJ, Prussel E, Ramasamy R: Effects of glycogen depletion on ischemic injury in isolated rat hearts: insights into preconditioning. *Am J Physiol* 1995;268:H935-H944.
- ▶19 Sherry A, Nunnally R, Peshock R: Metabolic studies of pyruvate- and lactate-perfused guinea pigs hearts by ¹³C NMR: determination of substrate preference by glutamate isotopomer distribution. *J Biol Chem* 1985;260:9272-9279.
- ▶20 Fischer Y, Thomas J, Sevilla Muñoz P, Becker C, Holman G, Kozka I, Palacin M, Testar X, Kammermeier H, Zorzano A: Insulin-induced recruitment of glucose transporter 4 (GLUT4) and GLUT1 in isolated rat heart myocytes. Evidence of the existence of different intracellular GLUT4 vesicle populations. *J Biol Chem* 1997;272:7085-7092.
- ▶21 Janier M, Vanoverschelde J, Bergmann S: Ischemic preconditioning stimulates anaerobic glycolysis in the isolated rat heart. *Am J Physiol* 1994;267:H1353-H1360.
- ▶22 Yabe K, Nasa Y, Sato M, Iijima R, Takeo S: Preconditioning preserves mitochondrial function and glycolytic flux during an early period of reperfusion in perfused rat hearts. *Cardiovasc Res* 1997;33:677-685.

- ▶23 Wang P, Lloyd SG, Chatham JC: Impact of high glucose/high insulin and dichloroacetate treatment on carbohydrate oxidation and functional recovery after low-flow ischemia and reperfusion in the isolated perfused rat heart. *Circulation* 2005;111:2066-2072.
- ▶24 Cross H, Clarke K, Opie L, Radda G: Is lactate-induced myocardial ischaemia injury mediated by decreased pH or increased intracellular lactate? *J Mol Cell Cardiol* 1995;27:1369-1381.
- ▶25 Chatham J, Gilbert HF, Radda GK.: Inhibition of glucose phosphorylation by fatty acids in the perfused rat heart. *FEBS Lett* 1988;238:445-449.
- ▶26 Yang WC: Effect of iodoacetate and iodoacetamide on oxygen uptake of heart mitochondria. *Science* 1957;125:1087.
- ▶27 Harrison GJ, van Wijhe MH, de Groot B, Dijk FJ, Gustafson LA, van Beek JH: Glycolytic buffering affects cardiac bioenergetic signaling and contractile reserve similar to creatine kinase. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003;285:H883-H890.
- ▶28 Jennings RB, Reimer KA, Steenbergen C: Myocardial ischemia revisited. The osmolar load, membrane damage, and reperfusion. *J Mol Cell Cardiol* 1986;18:769-80.
- ▶29 Webb JL: Iodoacetate and iodoacetamide. In *Enzyme and Metabolic Inhibitors*. Webb JL, editor. New York, Academic Press, Inc. 1966, pp 1-283.
- ▶30 Cesar MC, Wilson JE.: Further studies on the coupling of mitochondrially bound hexokinase to intramitochondrially compartmented ATP, generated by oxidative phosphorylation. *Arch Biochem Biophys* 1998;350:109-117.
- ▶31 Cross H, Opie L, Radda G, Clarke K: Is high glycogen content beneficial or detrimental to the ischemic rat heart? A controversy resolved. *Circ Res* 1996;78:482-491.
- ▶32 Zima AV, Kocksämper J, Blatter LA: Cytosolic energy reserves determine the effect of glycolytic sugar phosphates on sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ release in cat ventricular myocytes. *J Physiol* 2006;577:281-293.

Mecanismos moleculares involucrados en las estrategias mecánicas para evitar el daño por reperfusión en el miocardio isquémico.

Molecular mechanisms involve in mechanical maneuvers to prevent reperfusion injury in the ischemic myocardium

Francisco Correa y Cecilia Zazueta.

Correspondencia:

M en C. Francisco Correa Segura

Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez"

Juan Badiano #1 Col. Sección XVI, México D.F 04480

Tel. 5573-2911 ext 1465.

correasegura@salud.gob.mx

Resumen

El tamaño del infarto está determinado no solamente por la duración y la severidad de la isquemia, sino también por los procesos patológicos que ocurren en la reperfusión (daño por reperfusión). Aunque existen numerosas estrategias farmacológicas en las cuales se administran fármacos antes del inicio de la reperfusión, y que logran reducir el tamaño del infarto, se han descrito dos alternativas mecánicas que han logrado también reducir notablemente la lesión por reperfusión. El pre-acondicionamiento, que consiste en la aplicación de breves ciclos de isquemia y reperfusión, antes de una isquemia prolongada, es capaz de limitar el tamaño del infarto de manera constante. La reproducibilidad de este fenómeno usando diferentes protocolos en un variado número de especies y de preparaciones experimentales, lo condujo rápidamente a ser descrito como el "patrón de oro" para la cardioprotección. Por otro lado, el post-acondicionamiento, definido como breves ciclos de reperfusión interrumpidos por la isquemia (o hipoxia) y que se aplica después de una isquemia prolongada y antes del inicio de la reperfusión, fue introducido recientemente como una estrategia mecánica para disminuir el daño por reperfusión. El post-acondicionamiento que interviene durante los primeros minutos de reperfusión ha demostrado reduce el tamaño del infarto significativamente. Las dos maniobras reducen la activación y disfunción endotelial, la respuesta inflamatoria a la reperfusión, la necrosis y la apoptosis a corto y largo plazo. En esta revisión describiremos los mecanismos moleculares que el pre y el post-acondicionamiento activan y que se han asociado con la cardioprotección. El conocimiento de estos mecanismos es esencial para desarrollar nuevos protocolos para conseguir la protección terapéutica de pacientes con enfermedades isquémicas cardíacas.

Palabras clave: Cardiopatías isquémicas, pre-acondicionamiento, post-acondicionamiento, corazón.

Abstract

Infarct size is determined not only by the duration and severity of ischemia, but also by pathological processes initiated at reperfusion (reperfusion injury). Numerous pharmacological strategies have been reported which administer drugs at or just before the onset of reperfusion, with subsequent salubrious effects, notably a reduction in infarct size. However, two mechanical strategies alternatives show high efficiency to reduce the reperfusion injury. Pre-conditioning presented an experimental phenomenon that was the most markedly protective intervention able to limit infarct size in a consistent and reproducible manner. The wide reproducibility of this phenomenon using a variety of preconditioning protocols in a number of species and experimental preparations and with a number of endpoints of protection, rapidly led to ischemic preconditioning being established as a “gold standard” for cardioprotection. In other hand, post-conditioning, defined as repeated brief cycles of reperfusion interrupted by ischemia (or hypoxia) applied at the onset of reperfusion, was recently introduced as a mechanical strategy to attenuate reperfusion injury. Post-conditioning intervenes only during the first few minutes of reperfusion and reduces the infarct size significantly. Both maneuvers are efficient to reduce endothelial activation and dysfunction, the inflammatory response to reperfusion, necrosis, and apoptosis both acutely and long-term. In this revision we describe the molecular mechanism activated by pre and post-conditioning, that has been associated with cardioprotection. Knowledge of such mechanisms is now essential to maximize the likelihood of successful development of rational approaches to therapeutic protection for patients with ischemic heart disease.

Key words: Ischemic heart disease, pre-conditioning, post-conditioning, heart.

Introducción

Las cardiopatías isquémicas son la principal causa de mortalidad a nivel mundial. Según la Organización Mundial de la Salud serán la principal causa de muerte en el mundo en el año 2020. Es por ello necesario estudiar nuevas estrategias terapéuticas para prevenir y tratar estas patologías, con el objetivo final de preservar la viabilidad del miocardio y la vida del paciente. La reperfusión arterial coronaria es el tratamiento indicado para reducir el tamaño del infarto en la patología isquémica cardiaca. Paradójicamente, el restablecimiento del flujo coronario puede producir daños adicionales sobre el miocardio isquémico, condición a la que se conoce como daño letal inducido por reperfusión.¹⁻³

El daño por reperfusión es consecuencia de un sin número de mecanismos que se activan tanto en el interior de la célula, como en el exterior de la misma. Fisiológicamente este daño se traduce en disfunciones del endotelio, del sistema vascular, del metabolismo y de la contracción; en la descompensación en el flujo de sangre y en fenómenos de muerte celular, como la necrosis y la apoptosis. En este sentido, la sobrecarga de calcio y el incremento en la producción de especies reactivas de oxígeno (ERO) durante la reperfusión activan la transición de la permeabilidad mitocondrial, este fenómeno es considerado un evento clave en la muerte celular del miocardio. La transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza por la apertura de un poro no específico entre las membrana interna y externa mitocondrial, que provoca un colapso total del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y sirve como vía de salida a pequeñas moléculas como el citocromo c y a otros factores pro-apoptóticos que promueven el inicio y la ejecución de la necrosis o la apoptosis.⁴⁻⁶

En el estudio del miocardio isquémico-reperfundido, tan variados son los mecanismos de daño, como la estrategias descritas para su protección.

Destacan los tratamientos con sustancias antioxidantes, la utilización de fármacos que actúan sobre el calcio intracelular y de compuestos que previenen la disfunción mitocondrial.⁷⁻⁹ Sin embargo, hay alternativas de naturaleza mecánica que han demostrado ser altamente efectivas. A pesar de que las estrategias que trataremos en esta revisión son relativamente nuevas, cabe mencionar que la idea nace desde los años 80's, entonces se observó que la reperfusión de bajo flujo, en comparación con la reperfusión de flujo normal, mejoraba la actividad contráctil del corazón reduciendo parcialmente el daño por reperfusión.¹⁰ En concreto, en esta revisión se tratará de las dos estrategias mecánicas más estudiadas a la fecha, la primera de ellas consiste en la adaptación del corazón a la hipoxia crónica, mediante una serie de oclusiones breves antes de una isquemia prolongada y del restablecimiento del flujo coronario. Esta maniobra, conocida como pre-acondicionamiento aumenta la recuperación de la función cardiaca y reduce el tamaño del infarto.¹¹ La segunda estrategia fue reportada en el año 2003 por el grupo de Zhao, demostraron que en un modelo canino episodios breves de isquemia-reperfusión llevados a cabo de forma cíclica después de un periodo prolongado de isquemia pero antes de establecer la reperfusión, reducen el tamaño del infarto.¹² El post-acondicionamiento tiene una clara ventaja sobre el pre-acondicionamiento al ponerlo en un escenario clínico, pues se podría aplicar a sujetos con infarto (isquemia). En esta revisión, se describirán los conceptos clásicos y los datos más recientes sobre los posibles mecanismos que intervienen en la protección derivada del pre-acondicionamiento y del post-acondicionamiento.

El pre-ajuste

El primer informe citado en la literatura referente a una maniobra mecánica fue en 1986, por el grupo de Murry y col.¹³ Su aportación más importante fue la observación de que el tamaño de infarto resultante de una isquemia de 40 minutos de duración, provocada por la oclusión de la arteria coronaria descendente anterior en un modelo canino, podía ser reducido significativamente si el corazón se sometía a cuatro episodios breves de 5 minutos de isquemia seguidos por 5 minutos de reperfusión antes de una isquemia prolongada (40 minutos). Este fenómeno se le llamó pre-ajuste (PreC), y en su momento fue el mecanismo de protección fisiológica más poderoso. El grupo atribuyó el efecto protector a una rápida adaptación del metabolismo cardíaco en respuesta a la isquemia. La fácil reproducción del fenómeno en distintas especies animales, en poco tiempo convirtió al PreC en una maniobra cardioprotectora con buenos estándares.

Con base en el trabajo de varios grupos se ha logrado establecer que el PreC en corazón tiene dos fases de protección claramente definidas. La primera de ellas, es una fase temprana o PreC "clásica" que se extiende hasta 2 horas después del episodio de isquemia; y la segunda etapa, que es una fase tardía o "segunda ventana", que ocurre dentro de las primeras 24 a 72 horas después de la maniobra de PreC y de la reperfusión.

Mecanismos moleculares del pre-condicionamiento

Hacia los años 90's la interrogante de cuáles eran los procesos moleculares involucrados en la cardioprotección no era del todo clara, lo que contrastaba con el gran número de publicaciones que se referían al fenómeno. El consenso general era que las vías de señalización que se activaban en el PreC inciden en la mitocondria, pues la relación entre la actividad contráctil del miocardio y la bioenergética del cardiomiocito están centradas en la producción de ATP; así, se proponía que la mitocondria ocupaba un sitio importante de regulación a través de la síntesis de ATP, evitando el estado de transición de la permeabilidad mitocondrial. A la fecha se han descrito otros mecanismos derivados del pre-acondicionamiento, que favorecen el establecimiento de eventos celulares asociados con la cardioprotección (*Cuadro 1*). Estos mecanismos pueden estar relacionados con la liberación de mediadores químicos como la adenosina, norepinefrina, bradikinina, opioides y endotelinas. Se ha propuesto que estos agentes al unirse a sus receptores sobre las células cardiacas activas diferentes vías de señalización, contribuyendo a la protección del miocardio.

Papel de la Adenosina

Uno de los hallazgos más importantes realizados en el estudio de maniobra de PreC es la participación de diversos receptores, los cuales incrementan su actividad en presencia de PreC. En el caso de los receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3), se sabe, que cuando se administra norepinefrina (un activador de estos receptores) durante la reperfusión, se estimula el efecto del PreC, en un modelo de corazón de rata. ¹⁴

La liberación de adenosina no sólo promueve la generación de óxido nítrico (NO) en la maniobra de PreC, sino también activa a sus receptores, en particular al receptor A_2 . Este hecho se puso de manifiesto cuando se demostró que los efectos protectores del PreC desaparecían al administrar antagonistas selectivos de los receptores de adenosina A_2 .¹⁵ La ventana de efectividad del PreC está determinada por 2 factores: el primero es la concentración de adenosina, que debe ser lo suficientemente alta para inducir la generación de NO mediante la activación de los receptores de adenosina A_2 ; y el segundo factor es una baja concentración de xantina para evitar sus efectos perjudiciales de esta. Lo que está muy claro es que el bloqueo farmacológico de una vía o de un receptor involucrado en la cardioprotección inhiben el efecto protector del PreC, por el contrario los activadores de los receptores mimetizan lo que ocurre en el PreC.

Papel del óxido nítrico

Los trastornos de la microcirculación y la ausencia de perfusión sinusoidal son dos hechos bien documentados que contribuyen al daño por reperfusión. Aunque la lesión del endotelio y los episodios de coagulación intravascular pueden reducir e incluso bloquear el flujo sanguíneo, un factor determinante es la liberación de sustancias vasoconstrictoras durante la reperfusión, entre las que destacan las endotelinas. Varios estudios muestran que durante la isquemia disminuye la producción de NO, de manera que la célula no puede contrarrestar de forma efectiva el efecto de los elementos vasoconstrictores. Sin embargo, se sabe que a los pocos minutos de realizar el PreC, se libera adenosina al espacio extracelular. La adenosina activa la forma constitutiva

endotelial de la sintasa de óxido nítrico (NOS ϵ), con lo que aumenta la concentración de NO en situaciones de la isquemia. Por otra parte, se ha demostrado también que el PreC inhibe la producción de las endotelinas, hecho que también ayuda a la mejoría de la microcirculación. No se ha detectado la forma inducible de la enzima iNOS en estas condiciones, lo que parece indicar que la iNOS podría participar en una fase tardía del PreC, situación que puede adquirir especial relevancia en el ámbito clínico.¹⁶

Vías de señalización molecular

La activación de los receptores de adenosina A₂ estimula la actividad de varias cinasas intracelulares, tales como la proteína cinasa C (PKC), la proteína cinasa de activación mitogénica (MAPK) y su variante MAPK p38. Se ha podido establecer que de su activación depende la fosforilación de moléculas efectoras como las tirosina cinasas. Todo ello conlleva a un aumento de la tolerancia de los cardiomiocitos y las células endoteliales a la lesión isquémica, como veremos mas adelante.

La importancia de la proteína cinasa C (PKC) en la maniobra del pre-acondicionamiento fue reportado por el grupo de Mitchell y col.¹⁷ La PKC es una serina/treonina cinasa que se activa por cofactores lipídicos. Existen múltiples isoformas de PKC en el corazón, cada una de las cuales tiene un sustrato específico. Las formas clásicas (α , β y γ) son dependientes de diacilglicerol (DAG) y de calcio. Las isoformas (δ , η y ϵ) son independientes de la concentración de calcio y sólo necesitan DAG. La inhibición específica de la PKC con estaurosporina bloquea el desarrollo del PreC. Por el contrario, la estimulación de la PKC con ésteres de forbol o con DAG puede mimetizar la protección brindada por el PreC.¹⁸ Los eventos intracelulares que ocurren

luego de la activación de la PKC son de gran interés en la actualidad y es por esta razón que se están desarrollando numerosas investigaciones en este sentido. Las tirosina cinasas, de la misma manera que la PKC, pertenecen a una familia de enzimas que tienen la capacidad de fosforilar proteínas. Las tirosina cinasas fosforilan los residuos tirosina de determinadas proteínas y juegan un papel importante como mediadoras en muchos eventos que involucran señales de transducción intracelular. Se ha sugerido que estas dos vías forman parte de una cascada de señalización. Al administrar a corazones reperfundidos un inhibidor de la tirosina cinasa junto con PMA (forbol 12-miristato 13-acetato), un activador directo de la PKC, se observó que el PMA redujo el tamaño de infarto en forma similar al pre-acondicionamiento. Sin embargo, dicha protección desapareció cuando se administró el inhibidor de la tirosina cinasa.¹⁹ Si la PKC y la tirosina cinasa están involucradas en el fenómeno de PreC, es probable que estos dos componentes sean un paso más de una larga cascada de cinasas. Una de las mayores cascadas de cinasas, por lo menos en el corazón de mamífero, es la de la familia de las proteínas cinasa activadas por mitógenos (MAP cinasas). Estas enzimas pueden ser activadas por tirosina cinasas, PKC, proteínas G acopladas a receptores y ciertos tipos de estrés celular. Existen al menos tres cascadas de MAP cinasas identificadas en el corazón, éstas son: las cinasas reguladas extracelularmente (ERK) y dos familias de MAP cinasas activadas por estrés oxidativo: la cinasa c-Jun N-terminal (JNK) y la p38/cinasa reactivadora. La cascada que involucra la MAP-ERK es la mejor estudiada, es activada por factores de crecimiento y receptores acoplados a proteínas G27. Sin embargo, no existe evidencia experimental que involucre a esta cinasa en el PreC. Por

el contrario, las MAP cinasas JNK y/o p38 podrían intervenir en el PreC. Existen al menos dos isoformas de MAP-JNK en el corazón: MAP-JNK1 y MAP-JNK2. De gran importancia es el hecho que las dos isoformas de la MAP-JNK están activadas durante la reperfusión. Se ha demostrado que MAP-JNK1 y MAP-JNK2 son activadas por la reperfusión, pero no son modificadas por la isquemia, de esta manera, breves períodos de isquemia seguidos por breves períodos de reperfusión (tal como ocurre en el PreC) podrían activar la cascada que involucra a la MAP-JNK. Además, la estimulación de receptores acoplados a una proteína G y de la PKC también podrían activar la MAP-JNK. Otro miembro de estas cinasas es la MAP-KAPK-2, que fosforila una proteína de choque térmico denominada HSP27. La fosforilación de la HSP27 promueve la polimerización de los filamentos de actina incrementando la estabilidad del citoesqueleto. La sobreexpresión de HSP27 en miocitos aislados de rata les confirió protección frente a la isquemia, mientras que la disminución en la expresión de esta proteína exacerbó el daño isquémico.²⁰ Además, se sabe que isquemias prolongadas (30 minutos) provocan que el citoesqueleto se desordene. Así, la activación de la cascada de la MAP cinasa p38/HSP27 podría explicar los efectos benéficos del PreC sobre el citoesqueleto celular.

Canales de potasio dependientes de ATP

Los canales de potasio (K^+ ATP) han sido involucrados como parte de los mecanismos activados por el PreC. Los canales de K^+ ATP se han descrito en diversos tejidos. Estos canales son de conductancia intermedia y se inhiben por concentraciones fisiológicas de ATP. En la actualidad se sabe que otros moduladores endógenos modifican la actividad de estos canales. Entre ellos

podemos destacar el pH, los ácidos grasos, el óxido nítrico, nucleótidos y varios ligandos (adenosina, acetilcolina, benzopirenos, cianoguanidinas). En cuanto al PreC, en un principio se pensó que los canales involucrados eran los ubicados en el sarcolema y que éstos activaban un efecto protector al acortar la duración del potencial de acción. Sin embargo, se ha demostrado que los canales involucrados en el PreC son los ubicados en la mitocondria (mitoK⁺ ATP). Estos canales son similares estructuralmente a los de la membrana plasmática, pero presentan importantes diferencias en lo que respecta a su respuesta farmacológica. No está claro, por lo menos hasta este momento, por qué la apertura de los mitoK⁺ ATP podría tener efectos cardioprotectores,²¹ sin embargo se ha sugerido que la apertura de los mitoK⁺ ATP despolariza la membrana mitocondrial interna con la consecuente entrada de K⁺ al interior de la mitocondria, reduciendo la entrada de Ca²⁺ a la matriz mitocondrial y evitando la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. Datos recientes apoyan que los mitoK⁺ ATP pueden actuar como otros mediadores en la transducción de señales del PreC. El grupo de Wang y col. (1999),²² describió que la protección brindada por el diazóxido (un activador de canales mitoK⁺ATP) puede ser anulada con la administración de un antagonista de la PKC. Así, la apertura de los mitoK⁺ ATP sería un paso más en la cadena de eventos intracelulares que ocurren en el PreC. Se conoce mucho acerca de los mecanismos intracelulares involucrados en el PreC, pero una interrogante sin contestar sigue siendo cuál es el efector final responsable de la protección miocárdica.

Finalmente, es preciso señalar que la mayoría de los estudios que han evaluado los efectos del PreC se han realizado en modelos de animales sanos

y pocos lo han hecho en animales con algún tipo de patología (hipertrofia, hipercolesterolemia, etc.). En este sentido hay que destacar que entre el 30 y 40% de los pacientes con cardiopatía isquémica, presentan algún grado de hipercolesterolemia, por lo tanto, sería relevante para comprender el mecanismo involucrado en el fenómeno de isquemia y reperfusión utilizar por ejemplo, animales con niveles elevados de colesterol en sangre. Al respecto se han hecho algunos estudios que han ofrecido resultados contradictorios. El grupo de Ferdinandy en 1998,²³ observó que la protección por el PreC se mantenía en animales hipercolesterolémicos, al igual que en ratas control pre-tratadas con farnesol (un metabolito intermediario en la síntesis del colesterol). Por otro lado, se ha demostrado que el efecto protector del PreC se pierde con una dieta hipercolesterolémica en conejos; sin embargo, al tratar a los animales con pravastatina, un inhibidor de la HMG-CoA reductasa, se recuperó la cardioprotección por PreC.²⁴

Podemos concluir que en modelos animales el pre-acondicionamiento es la intervención mecánica con capacidad cardioprotectora más poderosa que se conoce en la actualidad. Su efecto ha sido reproducido en numerosas especies animales y se han descrito muchos de los mecanismos intracelulares que el pre-acondicionamiento activa. Sin embargo, su extrapolación a la práctica clínica continúa siendo limitada, ya que el cardiólogo puede diagnosticar la enfermedad coronaria, pero no predecir el momento en que se producirá el evento isquémico. En la *figura 1* se integran algunos de los mecanismos de cardioprotección inducidos por el PreC.

El post-acondicionamiento

El término post-acondicionamiento fue utilizado por primera vez por Zhao y col. En el año 2003,¹² tras demostrar que breves episodios de reperfusión interrumpidos por breves episodios de isquemia de forma cíclica, aplicados después de una isquemia prolongada protegen al corazón del daño letal inducido por reperfusión. Este grupo aplicó 3 ciclos de 30 segundos de reperfusión/isquemia después de una isquemia regional de 60 minutos en corazones caninos. Los resultados más evidentes fueron la disminución del tamaño de infarto en un 40%, y la atenuación de la disfunción endotelial. Este hallazgo atrajo la atención de muchos grupos a nivel mundial. La mayoría ha reportado que la maniobra de post-acondicionamiento disminuye el tamaño del infarto, con protocolos muy particulares y en diferentes modelos animales, motivo de una revisión sería la descripción de cada uno de los protocolos utilizados. Sin embargo, los mecanismos a través de los cuales el post-acondicionamiento protege no son del todo claros. En esta parte de la revisión mencionaremos aquellos mecanismos que reúnen suficiente evidencia experimental, de manera que podamos tener una visión actual de los mecanismos o vías que activan esta maniobra mecánica.

El post-acondicionamiento se presenta como un “nuevo” mecanismo de protección endógena con mayores posibilidades de ser extrapolado al ámbito clínico, particularmente en aquellos pacientes sometidos a angioplastia primaria.

Efecto protector del post-acondicionamiento (PC)

Dependiendo de la especie, el modelo o los factores que active, la maniobra del PC logra reducir el tamaño del infarto hasta en un 70% respecto a un corazón con la misma área de riesgo (corazón control). Estos hallazgos han sido comprobados por un gran número de grupos de investigación incluyendo el nuestro. Además, se ha

demostrado que muchos de los eventos que ocurren durante los primeros minutos de la reperfusión (*Cuadro 2*) son revertidos por el PC.

Mecanismos propuestos activados por el post-acondicionamiento

Efecto del pH

El grupo de Cohen y col. (2007),²⁶ reportó que una lenta reintroducción de oxígeno y una acidosis prolongada del tejido durante la reperfusión, mejoraba la condición del corazón frente a la reperfusión, esta protección se redujo en presencia de agentes alcaloides, así como con atrapadores de radicales libres, como el N-2-mercaptopropilglicina. Estos datos sugieren que la viabilidad del tejido cardíaco tras el PC, podría estar relacionado con un ambiente ácido o un pH bajo en el tejido. En este sentido, se sabe que un pH ácido evita la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). En esta condición, la reintroducción gradual de oxígeno podría reducir la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO) en el tejido, evitando el estrés oxidativo por efecto de la reperfusión. Sin embargo, a la fecha no se ha medido el pH, ni los productos ácidos generados durante la maniobra de PC.

Inhibición de la actividad de neutrófilos, disfunción endotelial y la respuesta inflamatoria

La evidencia experimental sugiere que en los primeros minutos de la reperfusión se mimetiza lo que ocurre durante la respuesta inflamatoria. En ambos casos, hay activación de neutrófilos, así como activación de células endoteliales; conforme avanza el tiempo de reperfusión hay reclutamiento de neutrófilos que de inicio se adhieren al endotelio y finalmente migran al parénquima. Tanto los neutrófilos como las células endoteliales sintetizan mediadores pro-inflamatorios (factor de necrosis

tumoral α [FNT α], interleucina 6 [IL-6], IL-8) así como ERO que en pocos minutos causan daño tisular irreversible.

Se ha demostrado que la maniobra de PC disminuye la disfunción endotelial, reduce la adherencia de neutrófilos al endotelio así como su acumulación en el miocardio reperfundido y que además no hay acumulación de FNT α .²⁷ Por otro lado, se ha observado cardioprotección al depletar la población de neutrófilos en modelos de oclusión coronaria en rata utilizando antisueros. De manera separada, tanto la depleción de neutrófilos como el PC redujeron el tamaño del infarto. Sin embargo, la combinación de ambas no potenció el efecto de la maniobra. Se sabe que los neutrófilos, al igual que los oxidantes y las moléculas pro-inflamatorias contribuyen de manera significativa a la patogénesis del daño por reperfusión, entonces es concebible que los mecanismos que los regulan pueden estar mediados por el PC.

Proteína G acoplada a receptores

La proteína G acoplada a receptores (GRP) ha sido implicada en la cardioprotección derivada del post-acondicionamiento. La estimulación de esta proteína por adenosina u opioides al inicio de la reperfusión, está asociada con una disminución en el tamaño del infarto.²⁸ Basta la estimulación de uno de los receptores para producir un efecto protector. Es muy interesante el hecho de que el bloqueo de los receptores inhibe el efecto protector del PC frente a la reperfusión. A continuación se revisará a detalle la implicación de la proteína G y de sus tres principales receptores en el post-acondicionamiento:

- Receptores de adenosina

De los cuatro subtipos de receptores de adenosina (A_1 , A_{2A} , A_{2B} , A_3), los receptores A_{2A} y A_3 tienen un efecto cardioprotector cuando se activan durante la reperfusión.²⁹

Se ha demostrado que la administración de agonista del receptor A_{2A} (ATL146e)

reduce el tamaño del infarto en un modelo de ratón normal, pero no tiene efecto al administrarlo en un modelo de ratón *knock-out* para el receptor A_{2A} . Estos resultados sugieren que la adenosina actúa atenuando el daño por reperfusión a través de un mecanismo anti-inflamatorio. De acuerdo con estas observaciones, el efecto anti-inflamatorio del receptor de adenosina A_{2A} se estimula durante el PC debido a que: 1) los niveles de adenosina se elevan durante la isquemia y el PC evita que esos niveles regresen a su basal; 2) la inhibición no selectiva de los receptores de adenosina y la específica del receptor A_{2A} limitan de manera muy notoria el efecto cardioprotector de PC y 3) la reducción en la acumulación y la adherencia de neutrófilos junto con la preservación del endotelio vascular son consistentes con el efecto fisiológico de la adenosina en modelos de isquemia y reperfusión. Recientemente, el grupo de Philipp y col. (2006)³⁰ ha sugerido que el PC activa al receptor A_{2B} y a la proteína cinasa C, más que al receptor A_{2A} . Se sabe que el agonista de receptor A_{2B} (MRS 1754) bloquea el efecto de PC, ya que bajo estas condiciones no hay reducción en el tamaño del infarto; sin embargo a la fecha no hay un modelo de *knock-out* que pueda afianzar este hallazgo.

- Receptores de bradiquinina

El grupo de Yang y col. (2004)³¹ reportó que la administración de bradiquinina durante la reperfusión reduce el tamaño del infarto a través un mecanismo relacionado con la inducción de cinasas de sobrevivencia y la vía de producción de óxido nítrico. El grupo de Bell y col. (2003),³² reportó resultados similares en un modelo de isquemia y reperfusión. Lamentablemente, a la fecha no hay ningún reporte que relacione la administración de la bradiquinina y el PC.

- Receptores a opioides

Se conocen tres subtipos de receptores a opiodes μ , δ y el κ . Los receptores δ y κ se expresan en cardiomiocitos. En el corazón se sintetizan tres péptidos opioides: endorfinas, enkefalinas y dinorfinas. La liberación de los péptidos opioides y la subsiguiente estimulación de los receptores δ y κ en corazón ofrecen cardioprotección. Así pues, se ha demostrado que la administración de opioides de manera exógena al inicio de la reperfusión disminuye el tamaño del infarto.³³ Sin embargo, la estimulación del receptor opioide κ durante el periodo de reperfusión no ofrece ninguna cardioprotección, lo cual sugiere que el mecanismo de acción de la activación de estos receptores obedece a la activación de cinasas de salvamento (RISK). En este sentido se ha identificado la participación de la GSK3, pues al ser fosforilada y por tanto inactivada, se obtiene un efecto cardioprotector. En este escenario de síntesis y liberación de péptidos opioides por el corazón, en modelos de isquemia/reperfusión, queda claro, que estos péptidos juegan un papel parcial en la cardioprotección derivada del PC. El grupo de Kin y col(2005),³⁴ ha descrito la participación de los péptidos opioides en un modelo de PC; este grupo observó que el efecto del PC se pierde al administrar naloxona, este agonista bloquea en particular los receptores δ y κ , cuando se administra 5 minutos antes de la reperfusión.

Otras Vías de señalización en el post-acondicionamiento

- PI3K y ERK_{1/2}

Después de la maniobra de post-acondicionamiento, se activan cinasas de sobrevivencia al daño por reperfusión RISK, por sus siglas en inglés (*reperfusion injury survival kinase*), la PI3K y la MEK-ERK_{1/2}. La vía de activación de la cinasa PI3K/AKT está ligada a la síntesis de óxido nítrico, este último es un importante regulador de la cardioprotección mediada por PC. La participación de esta cinasa y su relación con la síntesis de óxido nítrico ha llevado a sugerir que los canales de potasio mitocondriales

activados por ATP y el poro de la transición de la permeabilidad (PTPm) son mecanismos blancos de la cardioprotección derivada del PC (*Figura 2*). La regulación de este PTPm es crucial ya que es un punto clave en la supervivencia o en la muerte celular. Por otro lado, la inhibición de la actividad de la cinasa PI3K limita la reducción del tamaño del infarto en corazones que se sometieron a la maniobra de PC. De igual manera la activación de la cinasa MEK-ERK_{1/2} es un punto clave en la protección de un corazón con la maniobra de PC. Se sabe que la estimulación de la MEK-ERK_{1/2} durante los primeros minutos de la reperfusión abate los efectos de la reperfusión, por otro lado la inhibición farmacológica de la MEK-ERK_{1/2} inhibe el efecto del PC en un modelo de corazón aislado de conejo. La participación de ambas cinasas es consistente con la estimulación de la GPCR (proteína G acoplada a receptores) por ligandos endógenos.³⁵

- Proteína cinasa C (PKC)

La proteína cinasa C ha sido un elemento clave en la cardioprotección derivada tanto del pre- como del post-acondicionamiento. Se sabe que los ligandos de la GPCR estimulan a la fosfolipasa C y la generación de inositol tri-fosfato y diacilglicerol que estimulan la actividad de la PKC. En modelos murinos, se sabe que las isoformas de la PKC que predominan son la δ y la ϵ , ambas isoformas están involucradas en la patogénesis del daño por isquemia/reperfusión. La isoforma δ se transloca a la mitocondria en los primeros minutos de la reperfusión induciendo una mayor producción del anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$), la translocación de PKC δ se ha relacionado también con disfunción mitocondrial y con liberación de citocromo c.³⁶ Por otro lado, la isoforma ϵ de la PKC tiene la particularidad de inhibir la formación del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial. El grupo de Zatta y col. (2006),³⁷ reportó que en un modelo de PC en rata, el uso de un agonista no selectivo de la PKC (queleritrina) inhibe el efecto cardioprotector del PC. El grupo de Penna y col. (2006),

obtuvo resultados similares al usar un inhibidor de la PKC ϵ (KIE-1). Observaron que el tamaño del infarto no disminuyó en presencia del inhibidor en corazones post-acondicionados.^{37,38} La maniobra del PC incrementa los niveles de la PKC ϵ respecto a un miocardio sin la maniobra, lo cual sugiere que además de ser translocada a la mitocondria, la PKC ϵ también se transloca a otros sitios. Por el contrario, la translocación de la isoforma PKC δ se reduce en corazones post-acondicionados. Los resultados hasta el momento sugieren que la cardioprotección del PC es dependiente de la actividad de la PKC y que la maniobra mecánica incrementa los niveles de PKC ϵ , que a su vez reprime los efectos no protectores de la PKC δ .³⁰

Especies reactivas de oxígeno (ERO)

La generación de radicales libres durante la reperfusión ha sido implicada como responsable en la patogénesis del daño por reperfusión. Particularmente, el anión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) ha sido señalado como el responsable de la peroxidación de las membranas celulares y de la estimulación de la expresión de las moléculas de adhesión P-selectina e ICAM- 1 en el endotelio vascular, esto último favorece la adhesión de los neutrófilos al endotelio vascular.

Las ERO, incluyendo el $O_2^{\cdot-}$ y sus productos (H_2O_2 , y radical hidroxilo [OH^{\cdot}]) y el óxido nítrico y sus productos (especialmente peroxinitrilo [$ONOO$]), se incrementan durante la reperfusión de un miocardio isquémico y representan uno de los mayores detonantes del daño por reperfusión. Bajo condiciones de estado estacionario, los ERO son producidos en la mitocondria cuando se reduce el oxígeno a agua. Bajo estas condiciones los ERO son parte importante de la homeostasis celular interviniendo en procesos de señalización, de diferenciación, de mitosis y de la respuesta inmune. A concentraciones por arriba de las fisiológicas, los ERO son considerados como los principales responsables del daño por reperfusión. Es

interesante por ejemplo, que la administración de ERO en concentraciones similares a las producidas durante la reperfusión provoca en un corazón los daños característicos de la reperusión, sin haber cursado por ella.³⁹ En el corazón, los ERO son sintetizados por los cardiomiocitos, el endotelio vascular coronario y en células inflamatorias como los neutrófilos. Los ERO provocan la oxidación de lípidos de membrana, la desnaturalización de proteínas y provocan además, la ruptura del ADN. Como se menciona los ERO tienen un papel dual, lo que los convierte en moléculas de señalización ó bien en activadores de mecanismos de daño, en este sentido el desempeño de una u otra función está basado en diversos factores que se relacionan con: 1) la concentración sitio-específica de los ERO, 2) la transformación de ERO en especies mucho más reactivas (peroxinitrilo), 3) los mecanismos que favorecen la liberación de hierro, que alimenta la reacción de Fenton y 4) la activación o el cambio de función de las enzimas generadoras de ERO. Por ejemplo, la actividad basal de la xantina deshidrogenasa cambia a actividad de oxidasa bajo condiciones de isquemia, además, las citocinas y trombinas que se liberan en la reperfusión pueden activar a la NADPH oxidasa del endotelio favoreciendo la producción de ERO.

En la maniobra de post-acondicionamiento se ha propuesto que hay una reducción en la producción de ERO y ésta podría ser un mecanismo de cardioprotección en la maniobra mecánica frente a la reperfusión. Se ha demostrado en cultivos celulares que la exposición parcial (reducida) a oxígeno disminuye la formación de ERO simulando lo que podría ocurrir en el PC. En este modelo se demostró que la disminución en la generación de $O_2^{\cdot -}$ está asociada con la reducción de la sobrecarga de calcio en la mitocondria y con la inhibición de la muerte celular.⁴⁰ En modelos animales se ha asociado la maniobra de PC con una menor señal del dihidroéolidio, que se utiliza como un detector del estado oxidativo celular en el miocardio. Este resultado concuerda con la reducción en la lipoperoxidación de lípidos de membrana que reportan muchos grupos de investigación en modelos de oclusión coronaria con

maniobra de PC y reperfusión.^{12,41} Además, se ha demostrado que la maniobra de PC atenúa la generación de ERO del endotelio vascular coronario en el área reperfundida, después de 24 horas de reperfusión. Esta reducción es en parte responsable de preservar la función endotelial del epicardio de las arterias coronarias, en un modelo *in vivo* de corazón con PC.⁴² A pesar de los datos que demuestran que el post-acondicionamiento reduce la generación de ERO, hay un grupo de investigación que ha perfundido antioxidantes como N-acetil-cisteína al inicio de la reperfusión y que ha demostrado que el efecto cardioprotector del PC se pierde por efecto de este antioxidante, dejando claro el efecto dual de los mismos.⁴³ Por otro lado, se sabe que el PC mantiene las reservas antioxidantes del miocardio. Se ha demostrado que el PC mantiene los niveles de glutatión (GSH), el mayor sistema celular antioxidante, así, el PC no sólo evita el estallido del estrés oxidativo en el miocardio por ERO, sino que también mantiene los niveles de antioxidantes endógenos.⁴⁴

Sobrecarga de calcio

En los primeros minutos de la reperfusión hay una acumulación masiva de calcio en el citosol, el cual es responsable de activar fosfolipasas, proteasas y nucleasas. En la mitocondria, el Ca^{2+} entra a través del uniportador de calcio permitiendo la acumulación masiva de este ión en el organelo, promoviendo la apertura de un poro no específico transmembranal (PTPm) y un aumento en la generación de ERO, estos procesos conllevan a la muerte celular.⁴⁵ en este sentido se sabe que evitando la sobrecarga de calcio durante la reperfusión, con inhibidores específicos de la entrada masiva de calcio (por ejemplo el Ru360), se inhibe el daño por reperfusión en un modelo de corazón aislado.⁴⁶

En corazones con la maniobra de PC se ha reportado , por ejemplo, que la maniobra reduce la acumulación de calcio en la mitocondria en un modelo de cardiomiocitos. En este modelo, el grupo de Sun y col. (2005),⁴⁷ demostró que la sobrecarga de calcio disminuía tras 1 hora, cuando sometían a los cardiomiocitos a una reoxigenación parcial (maniobra de PC), mientras que si lo hacían de manera directa el efecto de sobrecarga de calcio duraba hasta 6 horas.

Transición de la permeabilidad mitocondrial

La génesis de la lesión por reperfusión después de un periodo de isquemia, está íntimamente ligada a la función mitocondrial. La transición de la permeabilidad mitocondrial se caracteriza por la apertura de un poro no específico dependiente de voltaje entre las membrana interna y externa mitocondrial, que se denomina poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm). La formación de este poro provoca un colapso total del potencial de membrana, el desacoplamiento de la cadena respiratoria y sirve como vía de salida a pequeñas moléculas ≤ 1500 Da y a otros factores pro-apoptóticos que promueven el inicio y la ejecución de la necrosis o apoptosis. Una pieza clave en el daño de la reperfusión es la regulación de la apertura de este poro, pues la sobrecarga de calcio, así como el estallido del estrés oxidativo son fenómenos que promueven su apertura durante los primeros minutos del reperfusión. Otros inductores de la apertura de este poro durante la reperfusión son la alcalinización del pH intracelular y la fosforilación de proteínas cinasas, entre otros factores. Es por ello que la inhibición farmacológica de este poro con ciclosporina A, o con análogos de este inmunosupresor, evitan el daño por reperfusión. En cuanto a la regulación de este poro durante la maniobra de post-acondicionamiento, se sabe que mitocondrias aisladas de corazones sometidos a la maniobra de PC, son igual de resistentes a la inducción de la transición de la permeabilidad, que las de corazones

perfundidos con un análogo de la ciclosporina A.⁴⁸ Experimentos posteriores demostraron que la disminución en la apertura del PTPm se debía a la participación de la fosforilación de la una proteína cinasa AKT.⁴⁹

El papel del post-acondicionamiento en la apoptosis

La apoptosis es un evolucionado y conservado mecanismo de muerte celular, que juega un papel crucial en muchos eventos biológicos, incluyendo el desarrollo, el mantenimiento de la homeostasis y la remoción celular. La liberación de citocromo c de la mitocondria es un acontecimiento clave en la vía intrínseca de la apoptosis. El mecanismo por el cual esta proteína es liberada al citosol es aún debatido, ya que al menos se han descrito dos vías diferentes. La primera involucra la formación de un canal conductor de citocromo c, formado por oligómeros de la proteína BAX, la segunda propone que la liberación de citocromo c está relacionada con la apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm).

En un modelo de isquemia-reperfusión se sabe que la apoptosis juega un papel muy importante en la muerte celular. Se sabe que la inhibición farmacológica de la cascada de señalización apoptótica durante la fase de reperfusión, detienen los procesos de muerte celular y mejora la función contráctil del corazón.⁵⁰

El conocimiento del papel de la apoptosis en la cardioprotección por post-acondicionamiento es limitado. Se sabe que el PC inhibe a proteínas cinasas como la JNK y la p38MAPK que son reguladores del factor pro-apoptótico BAX. De este modo se ha sugerido que podría haber una disminución en la señalización apoptótica por BAX.⁵¹ Este posible mecanismo y algunos otros discutidos en la revisión se encuentran esquematizados en la *Figura 2*.

Conclusiones

No cabe duda que la reperfusión es el único mecanismo para salvar al corazón de un daño isquémico. Sin embargo, las propuestas que veían a la reperfusión como una etapa oportuna de cardioprotección han quedado de lado, en el sentido de ver al tiempo de reperfusión como una oportunidad de aplicar cualquier tipo de terapias que indujera cardioprotección. A pesar de los cientos de trabajos que han propuesto aplicar estrategias cardioprotectoras al tiempo de la reperfusión, sólo unas pocas han sido puestas en práctica.⁵² En este sentido, el mejor entendimiento de los mecanismos que ocasionan el daño por reperfusión nos permitirá acercarnos hacia nuevas opciones terapéuticas. La maniobra de pre-acondicionamiento, que en modelos animales es una estrategia infalible frente al daño por reperfusión, no es aplicable en humanos, debido a que no se puede determinar el momento en el que una persona sufrirá un evento isquémico. Por otro lado, la maniobra de post-acondicionamiento reduce significativamente el daño por reperfusión y, aunque los mecanismos que activa no están del todo claros, tiene amplias posibilidades de ser aplicada en seres humanos, representando una estrategia cardioprotectora superior a la producida por cualquier fármaco aplicado durante la reperfusión. La maniobra de post-acondicionamiento ha puesto de manifiesto la importancia de los primeros minutos de la reperfusión, que son determinantes, por ejemplo, para el desarrollo del tamaño del infarto. Al limitar el daño del miocardio con una manipulación de naturaleza mecanicista, que luce simple en su implementación, podría obtenerse un beneficio clínico terapéutico, sobre todo en los terrenos de la cirugía de revascularización coronaria y en la terapia intervencionista. Es por ello que, con base en las evidencias experimentales, quienes trabajamos para instituciones involucradas en el estudio y tratamiento del corazón, debemos impulsar la utilización de estrategias alternativas que disminuyan la mortalidad y aumenten la sobrevida de los pacientes, teniendo

presente que en México como en el mundo, las enfermedades isquémicas ocupan los primeros lugares en las estadísticas de mortalidad.

Agradecimientos: Francisco Correa reconoce el apoyo otorgado por CONACyT así como del Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Se reconoce también el apoyo del CONACyT a través de los proyectos 090742 a FC y 80791 a CZ.

Referencias

1. Becker LC, Ambrosio G. Myocardial consequences of reperfusion. *Prog Cardiovasc Dis.* 1987; 30: 23-44.
2. Forman MB, Virmani R, Puett DW. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 1990; 81: 69-78.
3. Hearse DJ, Bolli R. Reperfusion induced injury: manifestations, mechanisms, and clinical relevance. *Cardiovasc Res.* 1992; 26:101-8.
4. De Moissac D, Gurevich R, Zheng H, Singal P, Kirshenbaum L. Caspase activation and mitochondrial c release during hypoxia-mediated apoptosis of ventricular myocytes. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2000; 32: 53-63
5. Borutaite V, Budriunaite A , Morkuniene R and Brown G. Release of mitochondrial cytochrome c and activation of cytosolic caspases induced by myocardial ischemia. *Biochim. Biophys. Acta.* 2001; 1537: 101-109.
6. Freude B, Masters TN, Robicsek F, Fokin, Kostin S, Zimmermann R, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000; 32:197-208.
7. Haramaki N, Packer L, Assadnazari H, Zimmer G. Cardiac recovery during post-ischemic reperfusion is improved by combination of vitamin E with dihydrolipoic acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1993; 196: 1101-1107.
8. Yoon S, McMillin-Wood J, Michael L, Lewis R. Entman M. Protection of canine cardiac mitochondrial function by verapamil-cardioplegia during ischemic arrest. *Circ Res.* 1985; 56: 704-708.
9. García-Rivas G de J, Guerrero-Hernández A, Guerrero-Sema G, Rodríguez-Zavala J, Zazueta C. Inhibition of the mitochondrial calcium uniporter by the oxo-bridged dinuclear amine complex (Ru360) prevents from irreversible injury in the post-ischemic heart. *FEBS J.* 2005; 272: 3477-3488.

10. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J. Reperfusion conditions: importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1986; 92: 613-620.
11. Murry C, Jennings R, Reimer K. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
12. Zhao ZQ, Corvera JS, Halkos ME, Kerendi F, Wang NP, Guyton RA, et al. () Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2003; 285: H579–H588.
13. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 1986; 74:1124-1136.
14. Banerjee A, Locke-Winter C, Rogers KB, Mitchell MB, Brew EC, Cairns CB, et al. Preconditioning against myocardial dysfunction after ischemia and reperfusion by an alpha 1-adrenergic mechanism *Circ Res.* 1993; 73:656-670
15. Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, et al. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A2 receptors. *Hepatology.* 1999; 29:126-132.
16. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell Catafau J, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic Biol Med.* 2002; 33:1200-1208.
17. Mitchell MB, Meng X, Ao L, Brown JM, Harken AH, Banerjee A. Preconditioning of isolated rat heart is mediated by protein kinase C. *Circ Res.* 1995; 76:73-81.
18. Downey J, Cohen M, Ytrehus K, Liu Y. Cellular mechanisms in ischemic preconditioning: The role of adenosine and protein kinase C. En: *Cellular, biochemical and molecular aspects of reperfusion injury.* Ann NY Acad Sci. 1994; 723: 82-98.

19. Baines C, Cohen M, Downey JM. Signal transduction in ischemic preconditioning: The role of kinases and mitochondrial KATP channels. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1999; 10: 741-754.
20. Cohen M, Baines C, Downey J.I ischemic preconditioning: from adenosine receptor to KATP channel. *Annu Rev Physiol.* 2000;62:79-109.
21. Gross G, Fryer R. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res.* 1999; 84: 973-979.
22. Wang Y, Hirai K, Ashraf M. Activation of mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel for cardiac protection against ischemic injury is dependent on protein kinase C activity. *Circ Res.* 1999; 85: 731-741.
23. Ferdinandy P, Csonka C, Csont T, Szilvassy Z, Dux L. Rapid pacing- induced preconditioning is recaptured by farnesol treatment in hearts of cholesterol-fed rats: role of polyprenyl derivatives and nitric oxide. *Mol Cell Biochem.* 1998; 186 (1-2): 27-34.
24. Ueda Y, Kitakaze M, Komamura K, Minamino T, Asanuma H, et al. Pravastatin restored the infarct size-limiting effect of preconditioning blunted by hypercholesterolemia in the rabbit model of myocardial infarction. *J Am Coll Cardiol.* 1999; 34: 2120-2125.
25. Vinten-Johansen J. Postconditioning: a mechanical maneuver that trigger biological and molecular cardioprotective response to reperfusion. *Heart Fail Rev.* 2007; 12: 235-244.
26. Cohen MV, Yang X-M, Downey JM. The pH hypothesis of postconditioning: Staccato reperfusion reintroduces oxygen and perpetuates myocardial acidosis. *Circulation.* 2007; 115:1895-1903.
27. Baxter GF. The neutrophil as a mediator of myocardial ischemia-reperfusion injury: time to move on. *Basic Res Cardiol.* 2002; 97: 268-275.

28. Olafsson B, Forman MB, Puett DW, Pou A, Cates CU, Friesinger GC, et al. Reduction of reperfusion injury in the canine preparation by intracoronary adenosine: importance of the endothelium and the no-reflow phenomenon. *Circulation*. 1987; 76:1135–1145.
29. Yang Z, Day YJ, Toufektsian MC, Ramos SI, Marshall M, Wang XQ, et al. Infarct-sparing effect of A₂ adenosine receptor activation is due primarily to its action on lymphocytes. *Circulation*. 2005; 111: 2190-2197.
30. Philipp S, Yang X-M, Cui L, Davis AM, Downey JM, Cohen MV. Postconditioning protects rabbit hearts through a protein kinase C-adenosine A_{2b} receptor cascade. *Cardiovasc Res*. 2006; 70:308-314.
31. Yang XM, Krieg T, Cui L, Downey JM, Cohen MV. NECA and bradykinin at reperfusion reduce infarction in rabbit hearts by signaling through PI3K, ERK, and NO. *J Mol Cell Cardiol*. 2004; 36: 411–421.
32. Bell RM, Yellon DM. Bradykinin limits infarction when administered as an adjunct to reperfusion in mouse heart: the role of P18K, Akt and eNOS. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35:185–193.
33. Gross GJ. Role of opioids in acute and delayed preconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2003; 35: 709–718.
34. Kin H, Zatta AJ, Jiang R, Reeves JG, Mykytenko J, Sorescu G, et al. Activation of opioid receptors mediates the infarct size reduction by postconditioning. *J Mol Cell Cardiol*. 2005; 38: 827.
35. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raïsky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Post-conditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation*. 2005; 111:194–197.
36. Churchill EN, Szwedda LI. Translocation of deltaPKC to mitochondria during cardiac reperfusion enhances superoxide anion production and induces loss in mitochondrial function. *Arch Biochem Biophys*. 2005; 439:194-199.

37. Zatta AJ, Kin H, Lee G, Wang N, Jiang R, Lust R, et al. Infarct-sparing effect of myocardial postconditioning is dependent on protein kinase C signalling. *Cardiovasc Res.* 2006; 70: 315-324.
38. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 2006; 101:180-189.
39. Ytrehus K, Myklebust R, Mjos OD. Influence of oxygen radicals generated by xanthine oxidase in the isolated perfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 1986; 20: 597–603.
40. Sun H-Y, Wang NP, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton RA, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. *Am J Physiol.* 2005; 288: H1900-1908.
41. Halkos ME, Kerendi F, Corvera JS, Wang NP, Kin H, Payne CS, et al. Myocardial protection with postconditioning is not enhanced by ischemic preconditioning. *Ann Thorac Surg.* 2004; 78: 961-969.
42. Mykytenko J, Kerendi F, Reeves JG, Kin H, Zatta AJ, Jiang R, et al. Long-term inhibition of myocardial infarction by postconditioning during reperfusion. *Basic Res Cardiol.* 2007; 102: 90-100.
43. Penna C, Rastaldo R, Mancardi D, Raimondo S, Cappello S, Gattullo D, et al. Post-conditioning induced cardioprotection requires signaling through a redoxsensitive mechanism, mitochondrial ATP-sensitive K⁺ channel and protein kinase C activation. *Basic Res Cardiol.* 2006; 101: 180–189
44. Serviddio G, Di Venosa N, Federici A, D'Agostino D, Rollo T, Prigigallo F, et al. Brief hypoxia before normoxic reperfusion (postconditioning) protects the heart against ischemia-reperfusion injury by preventing mitochondria peroxyde production and glutathione depletion. *FASEB J.* 2005; 19: 354-361

45. Crompton M, Costi A. Kinetic evidence for a heart mitochondrial pore activated by Ca^{2+} , inorganic phosphate and oxidative stress A potential mechanism for mitochondrial dysfunction during cellular Ca^{2+} overload. *Eur J Biochem.* 1988; 178: 489–501.
46. Correa F, Soto V, Zazueta C. Mitochondrial permeability transition relevance for apoptotic triggering in the post-ischemic heart. *Int J Biochem Cell Biol.* 2007; 39: 787-798.

Wang L, Cherednichenko G, Hernandez L, Halow J, Camacho SA, Figueredo V, et al. Preconditioning limits mitochondrial Ca^{2+} during ischemia in rat hearts: role of K(ATP) channels. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280: H2321-H2328.
47. Sun H Y, Wang N P, Kerendi F, Halkos M, Kin H, Guyton R A, et al. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca^{2+} overload. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005; 288: H1900–H1908.
48. Argaud L, Gateau-Roesch O, Raisky O, Loufouat J, Robert D, Ovize M. Postconditioning inhibits mitochondrial permeability transition. *Circulation.* 2005; 111: 194 –197.
49. Bopassa JC, Ferrera R, Gateau-Roesch O, Couture-Lepetit E, Ovize M. PI 3-kinase regulates the mitochondrial transition pore in controlled reperfusion and postconditioning. *Cardiovas Res.* 2006; 69: 178-185
50. Zhao ZQ, Morris CD, Budde JM, Wang NP, Muraki S, Sun HY, et al. Inhibition of myocardial apoptosis reduces infarct size and improves regional contractile dysfunction during reperfusion. *Cardiovasc Res.* 2003; 59: 132-142.
51. Sun HY, Wang NP, Halkos M, Kerendi F, Kin H, Guyton RA, et al. Postconditioning attenuates cardiomyocyte apoptosis via inhibition of JNK and

p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Apoptosis*. 2006; 11: 1583-1593.

52. Bolli R, Becker L, Gross G, Mentzer RM, Balshaw D Jr, Lathrop DA. Myocardial protection at a crossroads: the need for translation into clinical therapy. *Circ Res*. 2004; 95: 125-134.

53. Hausenloy DJ, Yellon DM. Preconditioning and postconditioning: united at reperfusion. *Pharmacol Ther*. 2007; 116: 173-19

Cuadro 1. Eventos celulares asociados a la cardioprotección inducida por el pre-acondicionamiento

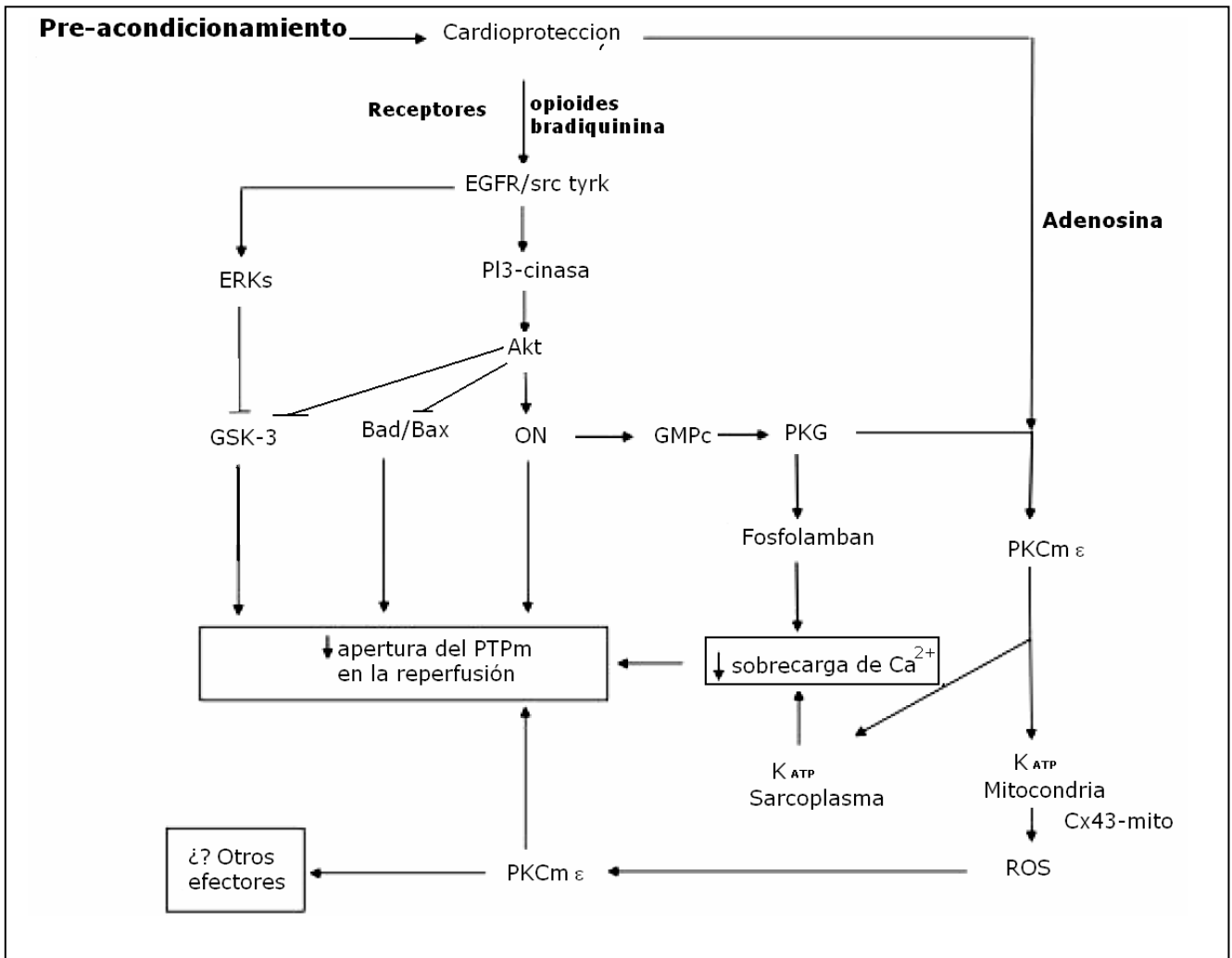
Durante la isquemia

- Limitación al paso de iones a través de las membranas plasmática y mitocondrial.
- Reducción del metabolismo celular.
- Reducción del consumo de ATP.
- Menor utilización de la vía de la glucólisis.
- Mayor eficiencia en la transferencia de energía intracelular.
- Disminución en la producción de H^+ .
- Mantenimiento del equilibrio iónico durante períodos de hipoxia prolongados.
- Transformación hacia un fenotipo tolerante a la hipoxia.

En la reperfusión

- Reducción de la producción de especies reactivas de oxígeno.
 - Mantenimiento del potencial redox intracelular.
 - Reducción de la apoptosis.
 - Preservación de la integridad mitocondrial.
 - Protección de la macrocirculación y la microcirculación.
 - Atenuación de la activación leucocitaria.
 - Reducción en la producción de citocinas.
-

Figura 1



Cuadro 2. Algunos eventos que ocurren con el inicio de la reperfusión y que el post-
acondicionamiento revierte. Modificado de Vinten J., 2007²⁵.

Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

Células endoteliales

Neutrófilos

Expresión de P-selectina

Disfunción de células endoteliales

 Daño en la síntesis y en la liberación de óxido nítrico

Expresión de citocinas

 Factor de necrosis tumoral α

 Interleucinas 6 y 8

Recalcinización

 Activación del intercambiador sodio-protón (Na/H)

Acumulación masiva de calcio

 En la mitocondria

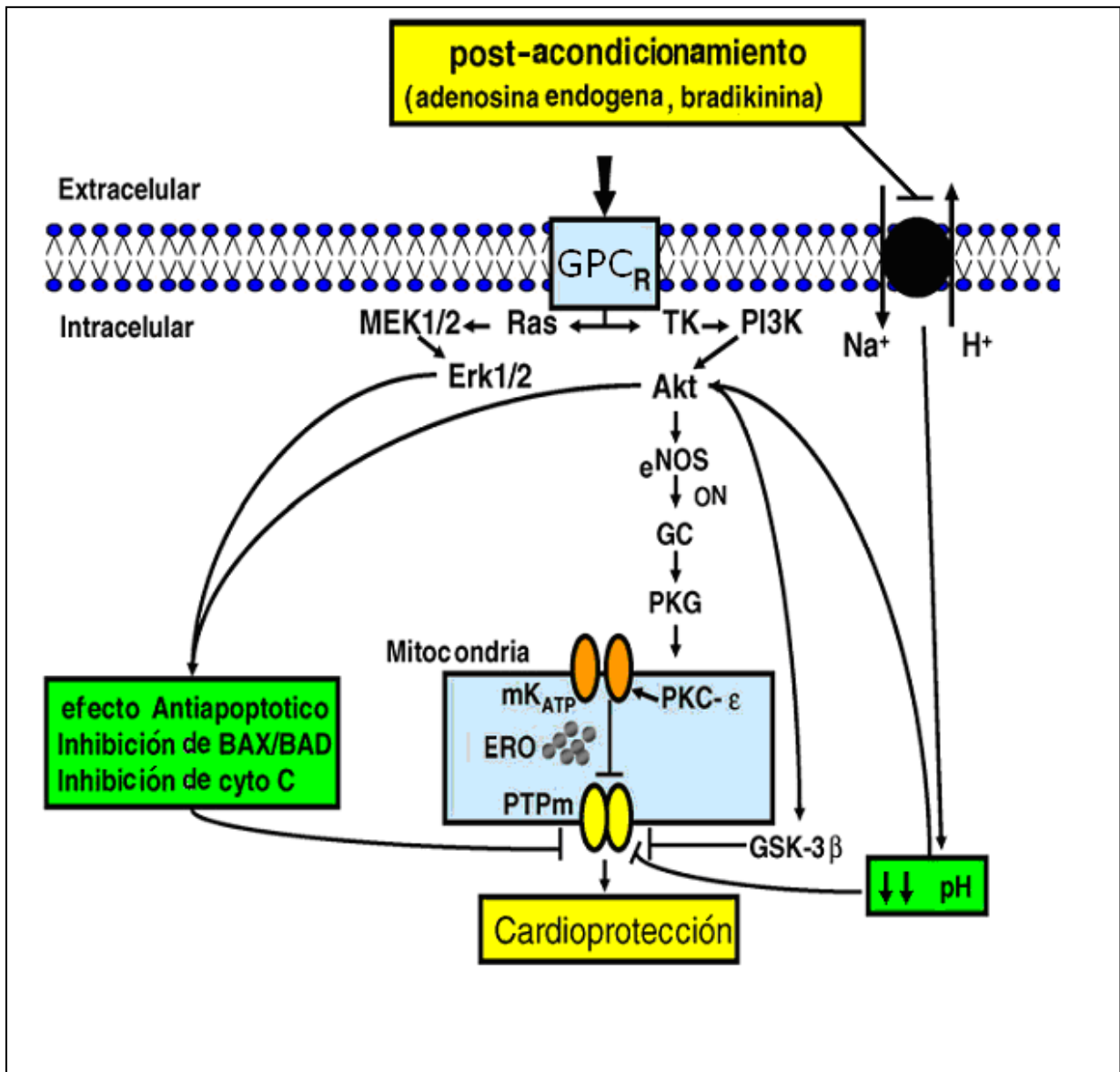
 En citosol

Apertura del poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial

Activación de cinasas de rescate (PI-3Cinasa, ERK 1/2)

Hipercontractura

Figura 2



Modificado de Hausenloy D., 2007.⁵³

Pies de figuras

Figura 1. Esquema que representa algunas de las vías que están involucradas en la cardioprotección activadas por el pre-acondicionamiento. La maniobra de pre-acondicionamiento promueve la acumulación de varios ligandos acoplados a receptores de proteína G, como los opioides y bradiquinina. Akt fosforila un gran número de sustratos, dentro de los cuales se incluyen a miembros pro-apoptóticos de la familia Bcl-2, como Bad y Bax, inhibiendo su acción. El óxido nítrico (NO) generado por la eNOS promueve la activación de PKG a través de la elevación de los niveles de GMPc. Los sustratos de PKG pueden ser proteínas reguladoras de retículo sarcoplásmico, como el Fosfolamban, que promueve la sobrecarga de calcio en retículo, reduciendo la sobrecarga de este catión en el citosol e inhibiendo la transición de la permeabilidad mitocondrial. La activación de PKC ϵ promueve la apertura de los canales de potasio en la mitocondria, la apertura de estos canales induce la aparición de especies reactivas de oxígeno, que activan de nueva cuenta a PKC ϵ . La inhibición de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm) puede ocurrir vía activación de PKC ϵ y de la apertura de los canales mitocondriales de potasio activados por ATP.

Figura 2. Este esquema muestra la relación entre diversos mecanismos de cardioprotección activados por el post-acondicionamiento. Muchas de las vías de la señalización convergen en la mitocondria y en específico en el poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial (PTPm), la formación de este poro es un evento clave en el mecanismo de cardioprotección por post-acondicionamiento. (GPC_R) proteína G acoplada a su receptor, (ERO) especies reactivas de oxígeno, (PTPm) poro de la transición de la permeabilidad mitocondrial y (PKC ϵ) proteína cinasa C.